

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESARROLLO, EVALUACION Y
CARACTERIZACION DE FASES
REACTIVAS SENSIBLES A DIFERENTS
ANALITOS Y SU EMPLEO EN SENSORES
OPTICOS EN FLUJO.**

JOSEFA MARIA BARRERO MORENO

MADRID 1994

19.026



* 5 3 0 9 5 5 6 5 2 X *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica

**DESARROLLO, EVALUACIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE FASES
REACTIVAS SENSIBLES A DIFERENTES
ANALITOS Y SU EMPLEO EN SENSORES
ÓPTICOS EN FLUJO.**

JOSEFA MARÍA BARRERO MORENO

MADRID 1994

*A Jesús y Amalia Josefá, mis padres,
a los que admiro y adoro.*

*En memoria de mi hermano y de Juan Fran,
junto a los que viví momentos maravillosos.*

A mi familia, por su cariño y apoyo

Al finalizar el presente trabajo deseo expresar mi gratitud a todas aquellas personas y organismos que de alguna manera contribuyeron a la realización del mismo. A la Dra. Concepción Pérez Conde, directora de este trabajo, por sus discusiones científicas e ideas siempre acertadas pero sobre todo por sus excepcionales cualidades humanas, por la sensibilidad, comprensión y cariño que siempre me profesó y a la Universidad Complutense por la concesión de una beca predoctoral.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Carmen Cámara, Catedrático de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid que fue la persona que me introdujo en el campo de sensores ópticos, ella siempre me brindó su ayuda y me contagió su alegría y vitalidad en momentos difíciles.

De igual manera quiero dar las gracias a la Dra. M^a Cruz Moreno Bondi, pionera en el campo de sensores de fibra óptica en España, por haber sido "mi ejemplo" y contar en todo momento con su inestimable ayuda que me brindó siempre desinteresadamente.

Asímismo agradecer al Dr. Polo, Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid su acogida en el mismo y a la Dra. Carmen San José, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología III, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid el haber puesto a mi disposición todo lo necesario para la obtención del reactivo pioverdina utilizado en esta memoria, y a Leo por haber hecho mucho más agradable mi estancia en dicha facultad.

Mi más sincero agradecimiento para mis compañeros de laboratorio, que han llegado a formar mi "segunda familia" y que hicieron más agradable estos años de trabajo, especialmente a Paula Pulido por su colaboración desinteresada en la realización de una parte de este proyecto, a lo largo de la cual compartimos muchas horas de trabajo y de amistad, y a Nur Kayali por su "asistencia técnica" siempre rápida y eficaz.

Quiero expresar asímismo mi agradecimiento a mis amigos por el estímulo y la ayuda que en todo momento de ellos he recibido y la paciencia y tolerancia que han demostrado tener

Por último mi recuerdo más especial para mis padres, por su sacrificio desinteresado, sus palabras, su ejemplo y su cariño.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.- Objeto del trabajo.....	1
2.- Propiedades químicas e importancia biológica del hierro y del aluminio.....	3
2.1.- Hierro	3
2.2.- Aluminio.....	9
3.- Sensores químicos de naturaleza óptica.....	14
3.1.- Definición y clasificación de sensores	14
3.2.- Fases sólidas en sistemas de flujo	21
3.2.1.-No integradas en el sistema de detección.	23
3.2.2.- Sistemas integrados en la detección: Sensores ópticos en flujo.	26
3.3.- Instrumentación	30
3.3.1.- Fuentes de radiación.	31
3.3.2.- Selectores de longitud de onda y acopladores ópticos.....	32
3.3.3.- Detectores de radiación.....	34
3.3.4.- Fibra óptica. Transmisión de la radiación.	34
3.3.5.- Terminal sensible.....	38
3.4.- Fase sensora o reactiva	39
3.4.1.- Indicadores	39
3.4.2.- Soportes.....	40
3.4.3.- Métodos de inmovilización.	42
4.- Medida de la propiedad óptica sobre superficies sólidas	50
4.1.- Absorbancia.	50
4.2.- Reflectancia difusa.	52
4.3.- Luminiscencia.	56
4.3.1.- Fluorescencia	60
4.3.2.- Fosforescencia	65

5.- Parámetros de calidad y campos de aplicación de los sensores ópticos.	67
6.- Revisión bibliográfica sensores ópticos	71
6.1.- Determinación de pH	71
6.1.1.- Sensores tipo sonda.	72
6.1.2.- Sensores en flujo.	76
6.1.3.- Sensores de pH como transductores para otras especies	80
6.2.- Determinación de Fe(III).	81
6.2.1.- Sensores tipo sonda	81
6.2.2.- Sensores en flujo	82
6.2.3.- Determinación de Fe(III) empleando fases sólidas	82
6.3.- Determinación de Al(III).	84
6.3.1.- Sensores tipo sonda	84
6.3.2.- Sensores en flujo	85
6.3.3.- Determinación de Al(III) utilizando fases sólidas	86
II. PARTE EXPERIMENTAL.....	88
1.- Aparatos, material y reactivos	88
1.1.- Descripción de los reactivos utilizados como fase reactiva en esta memoria	
1.1.1.- Cromazurol S (CS).....	88
1.1.2.- Pioverdina: biosíntesis y purificación	92
1.2.- Aparatos y materiales	96
1.2.1.- Aparatos	96
1.2.2.- Materiales	97
1.3.- Reactivos	98
2.- Procedimientos operatorios.....	100
2.1.- Dispositivos de medida	100
2.1.1.- Medidas de reflectancia	100
2.1.2.- Medidas de fluorescencia	105

2.2.- Preparación de las fases reactivas: inmobilizaciones	106
2.2.1. Inmovilización del indicador cromazurol S.....	106
2.2.1.1.- en intercambiadores iónicos	106
2.2.1.2.- en vidrio de poro controlado	107
2.2.1.3.- en vidrio sol-gel.....	107
2.2.1.4.- en gel de sílice.....	108
2.2.2. Inmovilización de pioverdina.....	109
2.2.2.1.- en CPG	109
2.2.2.2.- en sol-gel.....	110
2.3.- Realización de medidas para la determinación de diversos analitos.....	111
2.3.1.- Determinación de Al(III) mediante un sensor de reflectancia.....	111
2.3.1.1.- Primer procedimiento: Medidas al equilibrio.	111
2.3.1.2.- Segundo procedimiento: Medidas en flujo continuo....	112
2.3.2.- Determinación de Fe(III) mediante un sensor de reflectancia.....	113
2.3.3.- Determinación de Fe(III) mediante medidas de luminiscencia....	114
2.3.3.1.- En flujo continuo.....	114
2.3.3.2.- Con sistema de inyección en flujo.	115
2.3.4.- Determinación de pH.	116
III. RESULTADOS Y DISCUSION	117
1.- Sensor de reflectancia en flujo continuo para la determinación de aluminio con CS inmovilizado	117
1.1.- Fase reactiva: CS inmovilizado en soportes poliméricos	117
1.1.1.- Estudio de la inmovilización del reactivo.....	117
1.1.1.1.- Elección del soporte. Ensayos cualitativos	117
1.1.1.2.- Parámetros que influyen en la inmovilización.	119
1.1.2.- Estudio de la determinación del Al(III) sobre el soporte sólido. .	121
1.1.2.1. Estudio de las características espectrales	121
1.1.2.2.- Efecto del pH, naturaleza y concentración de la disolución reguladora.	123
1.1.2.3. Estudio del tiempo de respuesta	126
1.1.2.4. Efecto de la temperatura	128
1.1.2.5. Regeneración	129
1.1.2.6. Características analíticas	130
1.1.2.6.1. intervalo de linealidad	130
1.1.2.6.2. límite de detección, límite de cuantificación y precisión	132

1.1.2.6.3. Estudio interferencias.....	132
1.1.3.- Conclusiones	134
1.2.- Determinación de aluminio con otras fases sólidas	134
1.2.1.- Estudio de la inmovilización del reactivo.....	135
1.2.1.1.- Elección del soporte, ensayos cualitativos.....	135
1.2.2. Selección de la longitud de onda óptima.....	140
1.2.3.- Concentración de CS	140
1.2.4.- Influencia del pH en la formación del complejo.....	141
1.2.5.- Naturaleza y concentración de la disolución reguladora	142
1.2.6.- Regeneración.....	143
1.2.7.- Cinética de la reacción	144
1.3.- Comparación de las diferentes fases reactivas.....	146
2.- Sensor de reflectancia en flujo continuo para la determinación de Fe(III) con CS inmovilizado y su aplicación analítica.....	147
2.1.- Elección del soporte.....	147
2.2.- Caracterización del sensor Fe(III)- Cromazurol S inmovilizado en gel de sílice.....	151
2.2.1.- Selección de la longitud óptima.....	151
2.2.2.- Regeneración de la fase reactiva	151
2.2.3.- Influencia de la fuerza iónica.....	152
2.2.4.- Concentración de Cromazurol S	152
2.2.5.- Influencia del pH en la formación del complejo.....	154
2.2.6.- Naturaleza y concentración de la disolución reguladora.....	155
2.2.7.- Cinética de la reacción	156
2.2.8.- Características analíticas	158
2.2.8.1. Intervalo de linealidad.....	158
2.2.8.2. Límite de detección, límite de cuantificación y precisión.....	160
2.2.8.3. Estudio de interferencias.....	160
2.3.- Aplicación a muestras de aguas	162

3.- Sensor de fluorescencia para la determinación de Fe(III) en flujo continuo con pioverdina inmovilizada.....	164
3.1.- Estudio previo del comportamiento en disolución acuosa del complejo pioverdina-Fe(III)	165
3.1.1.- Estudio de las características espectrales.....	165
3.1.2.- Estudio de la influencia del pH.....	166
3.1.3.- Estudio de la naturaleza y concentración de la disolución reguladora	167
3.1.4.- Influencia de la fuerza iónica.....	168
3.1.5.- Características analíticas	169
3.1.5.1.- Intervalo de linealidad.....	169
3.1.5.2.- Límite de detección, límite de cuantificación y precisión	170
3.1.5.3.- Estudio de interferencias.....	170
3.2.- Caracterización en flujo continuo del sistema pioverdina-Fe(III) inmovilizado sobre CPG y su aplicación analítica	172
3.2.1.- Influencia del tamaño de poro	173
3.2.2.- Concentración de reactivo.....	174
3.2.3.- Estudio de las características espectrales.....	174
3.2.4.- Influencia del pH	178
3.2.5.- Naturaleza y concentración de disolución reguladora.....	179
3.2.6.- Efecto de la fuerza iónica	181
3.2.7.- Influencia del flujo en la respuesta del sensor.....	182
3.2.8. Regeneración del sistema.....	183
3.2.9.- Características analíticas	184
3.2.9.1. Intervalo de linealidad.....	184
3.2.9.2. Límite de detección, límite de cuantificación y precisión	186
3.2.9.3. Estudio de interferencias.....	187
3.2.10. Aplicación a muestras de aguas.....	189
3.3. Caracterización en flujo continuo del sistema pioverdina-Fe(III) inmovilizado en vidrio sol-gel y su aplicación analítica.....	190
3.3.1.-Concentración de reactivo y tamaño de por	191
3.3.2.- Características espectrales	193
3.3.3.- Influencia del pH.....	194
3.3.4.- Naturaleza y concentración de la disolución reguladora.....	195
3.3.5.- Efecto de la fuerza iónica	196
3.3.6.- Influencia del flujo de muestra	197
3.3.7.- Regeneración del sistema.....	198
3.3.8.- Características analíticas	199
3.3.8.1.- Intervalo de linealidad.....	199

3.3.8.2.- Límite de detección, límite de cuantificación y precisión	201
3.3.8.3.- Estudio de interferencias.....	201
3.3.9.- Aplicación a muestras de aguas	203
3.4.- Comparación de la respuesta del sensor caracterizado en flujo continuo para la detrminación de Fe(III) utilizando como soporte sólido CPG y vidrio so-gel ...	204
4.- Caracterización en FIA del sistema Fe(III)-pioverdina inmovilizado en vidrio so-gel y su aplicación analítica	206
4.1.- Optimización de variables	207
4.2.- Características analíticas.....	208
4.3. Aplicación a muestras de suero humano	211
5.- El reactivo pioverdina como indicador fluorescente	213
5.1. Cálculo del pKa de pioverdina.....	213
5.2.- Potencial analítico de pioverdina inmovilizada como sensor de pH.....	224
IV. CONCLUSIONES	230
V BIBLIOGRAFIA	235

I. INTRODUCCIÓN

1. OBJETO DEL TRABAJO

El continuo crecimiento de la actividad industrial ha modificado notablemente tanto la vida del hombre como su entorno. La presencia en el medio ambiente de contaminantes con el consiguiente peligro para la salud y efectos nocivos sobre el ecosistema, hace necesario disponer de una legislación que controle la presencia y concentración de distintos elementos potencialmente interferentes en los efluentes procedentes de diferentes industrias.

Por otra parte, numerosos procesos industriales y biotecnológicos, requieren un control riguroso de diversos parámetros que resultan críticos durante las etapas de producción .

La realización ideal de este control hace necesario disponer de métodos rápidos que proporcionen una sensibilidad adecuada y una selectividad que permita monitorizar "in situ" al analito.

Los sensores ópticos en flujo que emplean reactivos inmovilizados proporcionan una técnica innovadora para monitorizar "in situ" y por lo tanto en tiempo real al analito de interés, evitando la recogida, manipulación y almacenamiento de la muestra.

Los reactivos inmovilizados en soportes sólidos presentan otras ventajas adicionales como son aumento notable de la sensibilidad debido a su efecto de concentrar al analito y un gasto mínimo de reactivo.

Para que el sensor resulte operativo es necesario que tanto el soporte sólido como el mecanismo de inmovilización se seleccionen adecuadamente con el fin de obtener una "fase sensible" estable y de alta reactividad con la especie objeto de estudio.

El objeto fundamental de la presente memoria se ha centrado en la evaluación de diferentes "terminales sensibles" a los analitos hierro y aluminio con el fin de seleccionar los más adecuados para el desarrollo de sensores, en flujo, de fluorescencia o de reflectancia, para la determinación de dichos iones .

Los "fases sensibles" evaluadas se han modificado bien cambiando el soporte con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas o el tiempo de respuesta o bien variando el reactivo con el fin de mejorar la sensibilidad o la selectividad del mismo.

La falta de selectividad inherente a los métodos espectroscópicos moleculares se ha obtenido utilizando en algunos de los sensores elaborados un reactivo de origen natural sintetizados por bacterias que exhiben una alta especificidad hacia el ion hierro (III).

En todos los sensores desarrollados se han seguido la misma sistemática de trabajo que puede resumirse en las siguientes puntos:

- 1.- Construcción del "terminal sensible" al analito a determinar, lo que supone la selección del reactivo indicador, del soporte sólido y del mecanismo de inmovilización .
- 2.- Desarrollo de dispositivos de medida necesarios para la cuantificación de la propiedad óptica, fluorescencia y reflectancia, lo que supone el diseño y la adaptación de la célula de flujo al equipo de medida empleado.
- 3.- Caracterización de la fase reactiva con el fin de optimizar las variables físicas o químicas que influyen en el proceso.
- 4.- Caracterización analítica del sensor con el fin de establecer sus parámetros de calidad: sensibilidad, límite de detección, precisión, selectividad y estabilidad.
- 5.- Por último, aplicación si procede de los sensores caracterizados a la determinación de los analitos en diversas muestras.

2.- PROPIEDADES QUÍMICAS Y ASPECTOS MÁS RELEVANTES DEL HIERRO Y DEL ALUMINIO.

2.1.- HIERRO

El hierro y algunos de sus minerales fueron conocidos y utilizados por el hombre prehistórico. La "Edad del hierro" que sucedió a la del bronce ha dejado constancia de que en épocas antiquísimas el hombre supo obtener y forjar el hierro, construyendo utensilios y armas de este metal que han llegado a nuestros días. Así mismo, utilizó ciertos pigmentos naturales, la mayoría minerales de hierro, en ciertas pinturas rupestres.

Actualmente, la producción de hierro, aceros y ferroaleaciones es un índice del desarrollo tecnológico de una nación. En los laboratorios de análisis, el hierro y sus derivados, constituye quizás el grupo de productos que con mayor frecuencia necesitan del análisis, no sólo para fijar la riqueza del mismo en las materias primas y productos acabados, sino también para determinar el porcentaje de impurificación por este metal, dada su abundancia, en numerosos productos naturales.

En el Sistema Periódico, el hierro se encuentra en el grupo VIII de transición (I), junto con el cobalto y el níquel. Tiene una estructura cortical externa que responde a la expresión $3d^6 4s^2$. Ordinariamente funciona con los estados de oxidación (II) y (III) originando compuestos ferrosos y férricos respectivamente. En condiciones excepcionales funciona como Fe (IV), muy poco estable, y como Fe(VI) (ferratos).

El metal puro es blanco plateado, tenaz, dúctil, buen conductor del calor y susceptible de imantación. Es estable al aire seco pero se ataca en presencia de aire húmedo formando entonces una capa de óxido hidratado de color pardo rojiza.

En la Figura 1 se representa el diagrama E-pH del hierro. El bajo potencial del sistema Fe(II)/Fe ($E^0 = -0.41$ v) en todo el margen de pH indica que el hierro elemental es bastante reductor y, en consecuencia, fácilmente oxidable. El potencial del sistema

Fe(III)/Fe(II) es bastante elevado en medio ácido ($E^0 = 0.77$ v), pero disminuye al aumentar el pH, en medio alcalino, el sistema se hace tan reductor que el Fe(II), estable en medio ácido, es oxidado rápidamente por el oxígeno disuelto o por el ambiental.

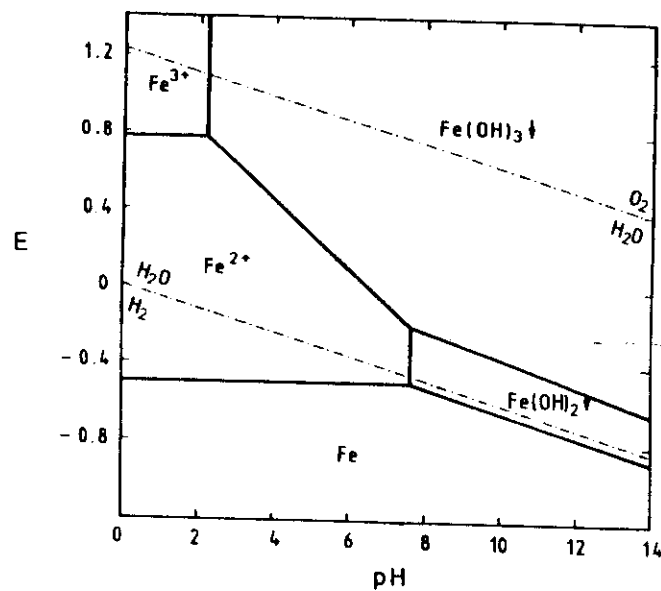


Figura 1: Diagrama E-pH del hierro. $C = 10^{-2}M$

Los compuestos de Fe(III) son más abundantes e importantes desde el punto de vista analítico que los de Fe(II). El Fe^{3+} es un catión más ácido que el Fe^{2+} ; en consecuencia, necesita mayor acidez para su estabilización en medio acuoso. El ión Fe^{3+} es incoloro, si bien las disoluciones de Fe(III) casi siempre poseen color amarillo debido a las especies básicas $Fe(OH)^{2+}$, $Fe_2(OH)_2^{4+}$ y $Fe(OH)_2^+$ cuya concentración puede ser importante en medios poco ácidos y pueden precipitar sales básicas de color pardo-rojizo (Figura 2.a).

El Fe(II) sería estable en disolución acuosa si se impidiese su oxidación a Fe(III). A pH próximos a 8 precipita el hidróxido $\text{Fe}(\text{OH})_2$ y no presenta carácter anfótero marcado, si bien en medios muy alcalinos existen en bajas concentraciones las especies aniónicas FeO_2H^- y FeO_2^{2-} . También se conocen las especies FeOH^+ y $\text{Fe}(\text{OH})_2$ (Figura 2b.)

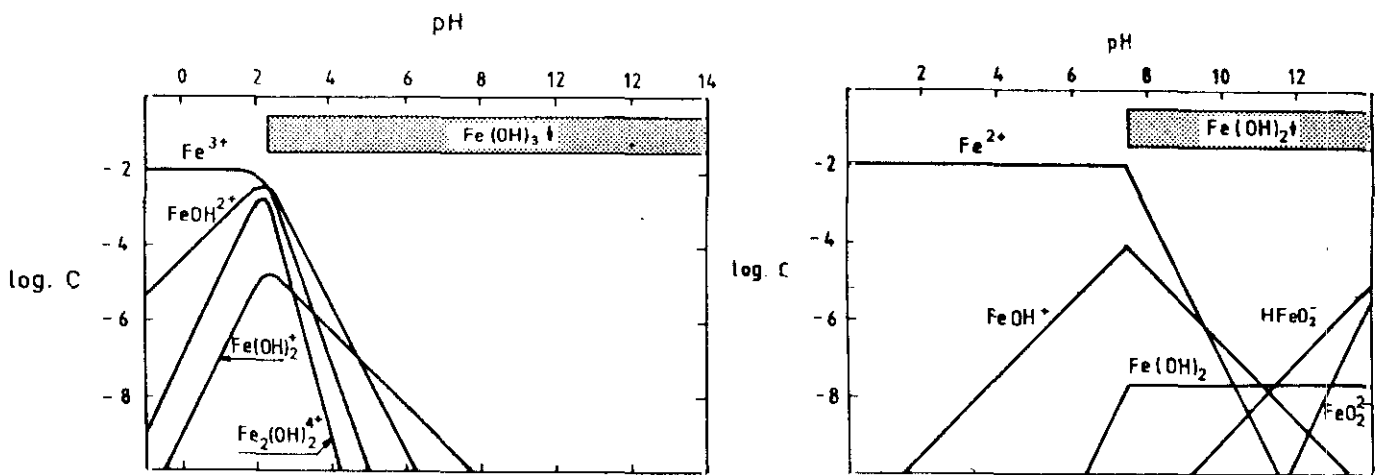


Figura 2: a. Diagrama log C-pH para Fe(III) 10^{-2}M . b. Diagrama log C-pH para Fe(II) 10^{-2}M

Hierro como elemento esencial en ciclos biológicos

El hierro es un micronutriente necesario para el crecimiento del fitoplancton por su importante acción catalítica en la producción de la clorofila. Recientemente se ha considerado la concentración de hierro como un factor limitante en la producción primaria en ciertas áreas de los océanos (2-3), hipótesis que ha despertado gran interés por el papel que puede jugar el hierro en la moderación del cambio climático global y de ahí la importancia de su determinación en ambientes acuáticos.

El hierro presente en los océanos procede principalmente de la atmósfera (2), ríos (4), aguas termales (5) y regeneración sedimentaria continental (6). La eliminación de hierro se debe principalmente a procesos biológicos por ser un nutriente de numerosos microorganismos. La concentración de hierro presente en agua marina ($<1\text{nM}$ en la superficie de los océanos), aumenta con la profundidad. Existen datos sobre la distribución vertical de hierro en los océanos (2,7,8) pero es preciso un estudio profundo sobre su papel

en los ciclos biológicos oceanicos, la naturaleza química y el estado de oxidación de este elemento en diferentes fases (disuelto o en partículas coloidales).

Las predicciones termodinámicas indican que virtualmente todo el hierro contenido en agua marina (condiciones oxidantes) debería ser Fe(III) que es insoluble (9), sin embargo existe una cantidad de este ión superior a la esperada teniendo en cuenta únicamente su solubilidad (2,8,10). Este hecho puede atribuirse a diferentes causas: tendencia del ión férrico a formar partículas coloidales amorfas, formación de complejos con ligandos orgánicos y presencia de Fe(II) disuelto. El Fe(II) es rápidamente oxidado a Fe(III) con un tiempo de vida medio del orden de unos minutos a pH 8.2 (11-13).

Hierro en el campo de la medicina

El concepto actual de la terapéutica por el hierro empezó en el siglo XVII, al popularizarse el uso de este elemento para tratar la enfermedad llamada "clorosis" (anemia por deficiencia de hierro). La deficiencia en este elemento puede dar lugar a serios problemas. Como es sabido, el átomo de hierro constituye el núcleo de la hemoglobina de la sangre, por lo que, en ciertos análisis clínicos, es necesaria su determinación ya que una concentración inferior a la normal de hemoglobina en sangre hace que disminuya la capacidad del individuo para el cambio de O₂ y CO₂ en la membrana alveolar de los pulmones y en las capas capilares periféricas, donde tiene lugar la función respiratoria interna.

Un enfermo puede tener deficiencia de hierro y no presentar síntomas de anemia, pues no todo el hierro del organismo está formando parte de la hemoglobina. Del total de hierro que existe en el organismo, prácticamente la totalidad está unido a las proteínas en forma de hierro funcional (hemoglobina y enzimas catalasa y citocromo), como hierro de almacenamiento o como hierro de transporte (14). Casi la totalidad del hierro en suero está unido a una beta-globulina, la transferrina, en forma de un complejo Fe(III)-proteína (15) pero sólo un porción de la molécula de esta proteína está saturada con hierro. La cantidad de hierro que puede fijar la transferrina cuando se encuentra totalmente saturada se denomina capacidad total de fijación de hierro. El resto está conjugado a los aminoácidos libres (16).

No es posible diagnosticar la causa de una deficiencia crónica de hierro o de una anemia sólo a partir del nivel del hierro sérico, también se necesita la determinación de la capacidad total de fijación de hierro. Mediante la determinación de hierro en suero se podría detectar esta deficiencia del metal antes de que aparezca la anemia. El primer paso en el análisis espectrofotométrico del hierro sérico consiste en la ruptura del complejo existente entre el hierro y la proteína con la que está combinado, mediante la acción de un ácido. Pueden seguirse entonces tres vías: a) eliminación de las proteínas por precipitación con ácido tricloroacético, b) establecimiento de unas condiciones tales que permitan que las proteínas sigan en disolución sin interferir con el análisis subsiguiente y c) en los análisis automatizados, diálisis del hierro que lo separa de las proteínas.

El hierro es tóxico cuando su concentración en suero supera la capacidad total de fijación de hierro. Los síntomas más comunes de intoxicación por hierro son vómitos, dolor abdominal, cefalea y diarrea, si bien la ingestión de menos de 35 mg de hierro elemental por Kg de peso corporal no produce intoxicación significativa.

Problemática determinación de hierro.

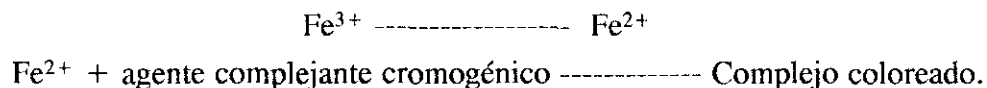
Gran parte de los trabajos existentes en la bibliografía refleja las dificultades encontradas en la determinación de este elemento. La biogeoquímica marina del hierro es complicada debido a los procesos redox, la baja solubilidad y la participación de este elemento en los ciclos biológicos. Conocer la distribución y el comportamiento del hierro en aguas naturales es difícil debido a los niveles de concentración tan bajos y a la frecuente contaminación por parte de los reactivos y material utilizado.

El hierro ha sido determinado fotométricamente en aguas naturales por varios autores (17-19) Normalmente se necesitan procedimientos de preconcentración (20,21) para la determinación de hierro en ambientes marinos por los bajos niveles de concentración (normalmente ng/ml). Estos métodos normalmente alargan el tiempo de análisis pudiendo alterarse los contenidos de Fe(III) y Fe(II) por el oxígeno atmosférico en el transcurso del análisis. Entre ellos se ha descrito la determinación de hierro por preconcentración y posterior detección quimioluminiscente (22). La determinación de hierro ha sido llevada a cabo en un sistema de análisis por inyección en flujo (23)

Existen muchos métodos disponibles para determinar la concentración de hierro en suero siendo la detección espectrofotométrica el más empleado dado que existen numerosos compuestos que forman complejos coloreados tanto con el Fe(II) como con el Fe(III), a continuación enumeramos los más comúnmente empleados.

El reactivo tiocianato forma un complejo de color rojo con el Fe(III). El método que emplea esta reacción es simple, rápido y aplicable a disoluciones fuertemente ácidas. El sistema no cumple perfectamente la ley de Beer y la longitud de onda de medida depende de la concentración de tiocianato. El método se usa normalmente entre 1-10 mg/l.

Generalmente se prefieren reactivos que complejen al Fe(II) por presentar menores interferencias que los que reaccionan con el Fe(III). Todos los métodos para la determinación de hierro basados en reactivos que complejan Fe(II) tienen en común una reacción en la que el hierro férrico Fe(III), es reducido a Fe(II) mediante la adición de un agente reductor como hidrazina, ácido ascórbico, o hidroxilamina. Una vez producida la reducción se emplea un agente cromogénico que forma un complejo coloreado con el ión ferroso.



Los agentes complejantes del ión ferroso más utilizados son reactivo FerroZine 3-(2-piridil)-5,6bis(4-ácido fenilsulfónico)-1,2,4-triazina que forma un complejo de color magenta, 1-10 fenantrolina reacciona formando un complejo naranja-rojizo, mercaptoacetado, tripiridiltriazina, batofenantrolinente y derivados de la ferroína entre otros.

Las características de los métodos espectrofotométricos más utilizados para la determinación de hierro en suero (24) se refleja en la tabla 1.

Aunque parecería lógico esperar que la absorción atómica se popularizara rápidamente para la determinación de hierro en suero no ha sido así. Esta técnica proporciona resultados de poca fiabilidad en la determinación directa del hierro sérico a concentraciones bajas, a causa de las limitaciones de sensibilidad, interferencias de las matrices e incapacidad de la absorción atómica para distinguir el hierro hemoglobínico del

hierro de transporte. La extracción del hierro quelado con metil-isobutil-cetona lograba mejorar los resultados.

Actualmente se encuentra en el comercio un instrumento, el FerroChem 3050 (Environmental Sciences Associates Company, ESA, Bedford, MA) en el cual la medición automatizada del hierro sérico se basa en principios coulombimétricos (25).

Tabla I. Características analíticas de los métodos espectrofotométricos más frecuentes para la determinación de hierro sérico.

Método	Intervalo linealidad	Precisión	Interferencias
1-10 Fenantrolina	0.4 -- 1.3 ppm	3 %	Cu > 1 ppm. AEDT, Citrato
Ferrozine	0.4 -- 1.6 ppm	6-7 %	Cu > 1 ppm AEDT, Citrato

2.2.- ALUMINIO

El aluminio es el elemento más abundante (7%) y difundido en los 19 Km exteriores de la corteza terrestre. Aunque jamás se encuentra nativo, sus minerales se cuentan por centenares, desde los numerosos silicatos naturales (feldespato y mica) y sus productos de descomposición geológica (caolines y arcillas) hasta los minerales considerados como menas para la obtención del metal (bauxita y criolita fundamentalmente).

Es un metal de color blanco argenteo, tenaz, dúctil y maleable, buen conductor del calor y la electricidad; pertenece al grupo III a de la tabla periódica y tiene una estructura cortical, $2p^6 3s^2 3p^1$ (1) Contrariamente a lo que cabría esperar por su carácter reductor ($E^0 Al^{3+}/Al^0 = -1.66$ v) no se altera por el agua ni por el aire húmedo y resiste fuertemente la

corrosión debido al fenómeno de pasivación (formación de una pequeña capa de óxido que protege al metal y evita que la oxidación prosiga).

En sus compuestos el aluminio actúa exclusivamente con el grado de oxidación (III). El catión Al^{3+} es incoloro y tiene un comportamiento analítico ácido-base representado en el diagrama $\lg C$ -pH. Este diagrama es uno de los posibles ya que existen bastantes variedades de óxido de aluminio con solubilidades ligeramente diferentes (Figura 3).

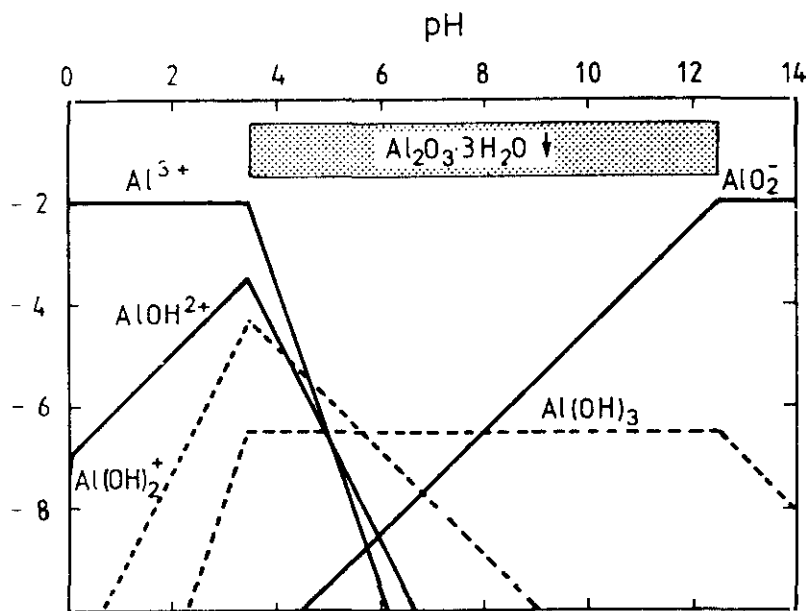


Figura 3.: Diagrama $\log C$ -pH para $\text{Al(III)} 10^{-2}$ M.

En medios ácidos predomina el catión Al^{3+} que coexiste con cationes básicos, AlOH^{2+} y Al(OH)^+ fundamentalmente (las líneas correspondientes a las formas Al(OH)^{2+} y Al(OH)_3 se han trazado discontinuas por no conocerse con exactitud sus constantes). Estas especies básicas son las causantes de que precipiten, antes que el hidróxido, sales básicas de aluminio. A pH próximo a 3.5 precipita el óxido hidratado (comúnmente denominado hidróxido) que se redisuelve en medio fuertemente alcalino, pH 12.5, originando el ión aluminato AlO_2^- .

Un elevado porcentaje de los materiales metálicos empleados actualmente tanto en aplicaciones estructurales como en piezas de tecnología avanzada y en aeronáutica emplean

aluminio o sus aleaciones (26). La principal causa de este hecho es el carácter de metal ligero ($d=2.699 \text{ gr/cm}^3$ a 20°C) del aluminio, que lleva a reducciones de peso considerables en dichas piezas, junto con sus excelentes propiedades mecánicas y de resistencia frente al ataque por corrosión.

Todas estas propiedades se ven modificadas en mayor o menor grado y en distinto sentido por la presencia de elementos aleantes, que pueden hacer notar su influencia incluso en concentraciones del orden de trazas. En general, la adición de aleantes al aluminio pretende elevar su resistencia mecánica logrando la aparición de fases que, por su naturaleza y morfología modifican las propiedades del sistema; es el caso por ejemplo de los duraluminios en los que la presencia de cobre en unas determinadas concentraciones lleva a la aparición de inclusiones por tratamiento térmico, o, simplemente, envejecimiento natural.

En cuanto a la influencia de aleantes frente a la corrosión, hay que tener en cuenta que el aluminio puro es un metal de buenas características en este sentido, pasivándose por formación de una capa de Al_2O_3 muy adherente y protectora. Los aleantes tienden a mejorar problemas como los derivados del ataque por picadura, consecuencia de la rotura de la capa pasiva.

Otras veces el aluminio se emplea como aleante de otros metales para mejorar su resistencia a la corrosión, siendo este efecto importante en aleaciones con contenido de aluminio en el intervalo 0.20-0.30%.

Aluminio en los seres vivos.

Los iones metálicos en general no son capaces de atravesar las membranas lipídicas del organismo ("interfase"), pero si reaccionan con diversos ligandos (ácidos carboxílicos, aminoácidos...) pasan a ser biodisponibles por el mismo. El Al^{3+} es un ión de muy baja biodisponibilidad no siendo prácticamente absorbido por las paredes intestinales. Sólo una pequeña fracción se absorbe por un mecanismo hasta ahora desconocido, pasando al torrente circulatorio, esta fracción es rápidamente eliminada por el riñón sano. De esta forma el aluminio no es "bioacumulado" por el organismo sano y por ello se le ha considerado hasta los años 70 como un elemento no tóxico.

Ahora bien, cuando las defensas del organismo son "engañadas" por ejemplo: inyectando aluminio directamente al torrente circulatorio o bien están deterioradas como en enfermos con insuficiencia renal, este elemento pasa a representar rápidamente una seria amenaza para los procesos metabólicos llegando a ser notoriamente tóxico.

A principios de los años 60, cuando comenzaron a utilizarse equipos para el tratamiento de riñón artificial, se emplearon con agua del grifo. Este tratamiento condujo a que si bien los resultados inmediatos eran buenos, los pacientes sometidos a un tratamiento prolongado sufrían el síndrome llamado "demencia de diálisis" (27). Alfrey y colaboradores (28) en 1976 propusieron que este síndrome se debía a la acumulación de aluminio procedente del agua empleada. Los síntomas de la "demencia de diálisis" son: dificultad en el habla, cambios de personalidad, convulsiones, pudiéndose originar la muerte del paciente.

Por este motivo los líquidos de diálisis son ahora tratados para eliminar o al menos reducir al mínimo el contenido de aluminio. El principal esfuerzo está aplicado a sondear el agua, la cual está sujeta a una serie de procesos de filtraciones, de ósmosis inversa y cambio iónico que reducen enormemente los niveles de aluminio. La cantidad deseada de este elemento en líquidos de diálisis sería inferior a 30 $\mu\text{g/l}$; idealmente debería ser menor de 10 $\mu\text{g/l}$ (29).

Pero el aluminio no sólo penetra en el organismo por el agua o los líquidos de diálisis, existen otras posibles vías a través de las cuales el aluminio puede entrar en los seres humanos, estas vías son: *a) el medio ambiente* y *b) la dieta* alimenticia (en especial por aditivos en comidas y bebidas) y los *medicamentos* (antiácidos, antidiarreicos, etc).

Esta abundancia de fuentes de penetración de aluminio en el cuerpo hace que personas con insuficiencia renal deban someterse periódicamente a controles de los niveles de aluminio en suero, no permitiéndose contenidos superiores a 10 ng/ml (2 ng/ml en personas sanas).

Problemática en la determinación de aluminio.

La determinación de aluminio a bajos niveles de concentración en muestras biológicas o en otro tipo de muestras conlleva el enfrentarse a una serie de problemas. Los más importantes son la contaminación y la sensibilidad.

El primer problema, bien conocido por todos, que se plantea al analizar aluminio es la facilidad de contaminación de las muestras durante todas las etapas del análisis, desde la toma de muestra y almacenamiento, a la manipulación en los procedimientos que preceden a la introducción de la muestra en el sistema de medida.

El polvo atmosférico, el agua utilizada, los reactivos, los materiales de laboratorio son fuentes importantes de contaminación, especialmente, los recipientes de vidrio. Es recomendable a la hora de analizar aluminio usar cuarzo o material de plástico como: policarbonato, polipropileno y teflón. Todos los materiales usados deben estar lavados con ácido nítrico, de alta pureza, al 30% en agua desionizada, en el momento de usarlos (30). Debe mencionarse que el ácido nítrico suprapur, se vende en botellas de vidrio y esto a la larga puede contaminarlo. Es aconsejable trabajar con reactivos purificados.

El segundo problema deriva de la extremada baja concentración que se requiere determinar en muchos casos lo que conlleva el empleo de técnicas de alta sensibilidad como absorción atómica con atomización electrotérmica (GFAAS), espectrometría de emisión de plasma con acoplamiento inductivo (ICP-AES) entre las atómicas o la espectrofluorimetría entre las técnicas moleculares.

3. SENSORES QUÍMICOS DE NATURALEZA ÓPTICA

3.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE SENSORES.

El incremento de la actividad industrial ha modificado notablemente tanto el modo de vivir del hombre como las cualidades del entorno donde desarrolla sus actividades. Esta interacción recíproca hombre-medio ambiente ejerce un notable efecto sobre la calidad de vida del hombre por lo que en los últimos años la población ha experimentado una progresiva concienciación sobre la importancia de la calidad del medio ambiente (agua, suelo y aire) que ha llevado a la elaboración en todo el mundo de programas de protección medioambiental así como la reglamentación de niveles máximos permisibles de compuestos o elementos potencialmente contaminantes. Esto ha llevado a acuerdos internacionales sobre el control de emisión de clorofluorocarbonos y ácidos, entre otros muchos contaminantes, a la atmósfera. Esta situación ha ampliado notablemente los campos tradicionales de análisis de control incluyendo ahora zonas de alto riesgo y residuos peligrosos.

La necesidad de obtención rápida de datos e incluso la opción de seguimiento en continuo de un gran número de compuestos de interés en diferentes emplazamientos hace inoperante el análisis químico tradicional que conlleva problemas de obtención de muestra representativas transporte de las mismas al laboratorio, su posterior análisis y tratamiento de datos. Ello consume un tiempo excesivo. Se trata pues, de cambiar la filosofía del análisis, posibilitar las medidas "in situ", en tiempo real y "on-line" en la misma línea de producción de procesos industriales. Estos antecedentes han sido propicios para el gran incremento experimentado en los últimos años de una técnica relativamente nueva como son los sensores de naturaleza óptica con fibra óptica que en su filosofía incluyen todas las características que necesita actualmente los métodos de análisis, medidas "in situ", en tiempo real, y multideterminaciones favoreciendo de esta manera el coste de análisis.

La **definición** más generalizada de un sensor es la siguiente: *"sensor es un instrumento capaz de registrar de forma continua y reversible un parámetro físico (sensor*

físico) o la concentración de una especie química (sensor químico)." (31). El sensor puede ser clasificado como biosensor si la especie detectada es una especie bioquímica o si la reacción en que está basada es bioquímica (32). En algunos casos se consideran también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, o que sólo permiten una determinación. Otros autores denominan a estos dispositivos "sondas" (31), pero nosotros mantendremos para ellos la nomenclatura de sensores de acuerdo con aquellos autores que los han diseñado.

Un sensor químico que responda a una especie química concreta consta básicamente de dos partes (33) según se refleja en la Figura 4, una zona química que sirve de reconocimiento e interacción con la especie de interés, responsable de un cambio ya sea físico o químico del sistema cuya intensidad esta relacionada con la concentración del analito y un transductor físico, es decir, una zona de medida en la que dicho cambio es transformado en una señal analítica susceptible de ser medida.

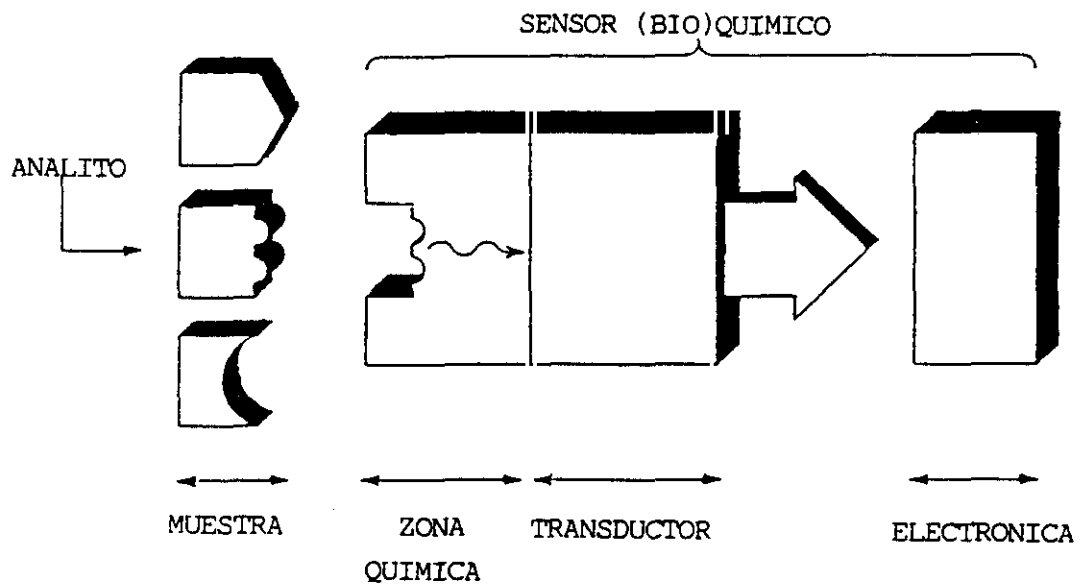


Figura 4. Partes de un sensor

En la zona de reconocimiento, la información química relativa al analito se transforma en información física (se genera una señal óptica, eléctrica, etc) que es recogida por un transductor apropiado que la transforma en una señal medible.

Los sensores químicos de fibra óptica se denominan optrodos (34) u optodos (35) por proporcionar señal óptica en lugar de eléctrica (electrodo), o bien sensores ópticos, Son numerosas las revisiones y los libros publicados en los últimos años que recogen las principales características, ventajas y perspectivas de estos dispositivos así como los diversos campos de aplicación y situación comercial de los mismos (36-40).

La complejidad de los sensores ópticos puede variar considerablemente en función de los requisitos impuestos según los objetivos a cumplir. La enorme variedad existente de los mismos hace difícil realizar una única clasificación. A continuación se exponen las **clasificaciones** utilizadas comúnmente en el campo de sensores.

***.- En función de la naturaleza del analito se pueden dividir en:**

- *Sensores químicos*: son aquéllos que responden a una especie particular o compuesto. En este grupo se incluyen los sensores de pH, iones, gases, y como grupo especial los biosensores.

- *Sensores físicos*: son sensibles a variaciones de parámetros físicos tales como temperatura, presión, tamaño de partícula etc.

***.- Atendiendo a la naturaleza del transductor, los sensores para especies químicas se pueden clasificar (33) en:**

- *Electroquímicos*: miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema (potencial, intensidad de corriente, conductividad, etc) la cual es función de la concentración del analito.

- *Ópticos*: responden a cambios en alguna propiedad óptica (absorbancia, reflectancia, luminiscencia) del sistema relacionada con la concentración de la especie a cuantificar.

- *Térmicos*: se cuantifican calores de reacción.
- *Piezoeléctricos*: se miden cambios de masa, viscosidad, etc.

***.- En función del tipo de interacción con el analito se pueden clasificar en:**

- *sensores reversibles*: cuando la fase reactiva no se consume durante su interacción con el analito.

- *sensores irreversibles*: cuando existe consumo de la fase reactiva. Estos sensores pueden subdividirse en regenerables y no regenerables, según que pueda o no recuperarse su estado original para realizar una nueva medida tras su tratamiento con un reactivo adecuado.

***.- Según el terminal sensible y la función que ejerce la fibra Boisdé clasifica los sensores en (41) :**

- *sensores u optodos activos (intrínsecos)* en los que las propiedades de la fibra se modifican por la acción de la zona externa que rodea a la misma. Los principales parámetros que se ven afectados en la fibra son: tiempo de propagación de la luz a través de la fibra, potencia óptica transmitida por la fibra, distribución de la potencia óptica en varios modos de propagación, estado de polarización de la radiación transmitida por la fibra, la radiación dispersada desde el material del núcleo de la fibra, luz generada en la fibra debido a interacciones físicas. Este tipo de sensores son muy poco empleados como sensores químicos, si bien son de uso general en el área de sensores físicos (determinación de presión y temperatura). Dentro de los sensores químicos intrínsecos se engloban los sensores de onda evanescente.

- *sensores u optodos semiactivos* en los que la variación en la señal óptica medida se debe a una reacción química que se produce entre el medio circundante (donde se encuentra el analito) y un reactivo específico colocado en el terminal de la fibra óptica.

- *sensores u optodos pasivos (extrínsecos)*, en los cuales la fibra óptica es una mera guía de la radiación. La señal óptica medida proviene de una propiedad natural del medio y la fibra óptica solo sirve para transportar la señal hasta el detector sin tomar "parte activa"

en este proceso. Son los más fáciles de realizar, por ello son los más utilizados en la mayoría de las aplicaciones industriales.

***.- Los sensores pueden medir diferentes propiedades ópticas y por ello se pueden clasificar en sensores de:**

- *absorbancia*
- *reflectancia*
- *luminiscencia*
 - a) de fluorescencia
 - b) de quimioluminiscencia
 - c) de fosforescencia
- *dispersion de la radiación Raman*
- *índice de refracción*

***.- Según la forma externa (configuración) los sensores pueden ser (42):**

- *sensores tipo sonda*: que pueden ser utilizados tanto en modo continuo como en modo discontinuo o discreto. Necesitan una conexión entre el detector y el terminal sensible en contacto con la muestra, esta conexión puede ser óptica (lo más frecuente es un cable de fibra óptica) o conexión eléctrica (electrodos enzimáticos o electrodos modificados químicamente).

- *sensores tipo célula de flujo*: que únicamente pueden ser utilizados en modo continuo. Su principal característica es que la fase sensora se dispone en el sistema de detección, es decir, los procesos de reacción/retención (sobre la fase reactiva) y detección son simultáneos. Este tipo de sensores según queda reflejado en la figura 5 puede o no disponer de fibra óptica.

Los *sensores* desarrollados en *esta memoria* corresponden según esta última clasificación a *sensores ópticos tipo célula de flujo* por ello se estudiarán con más detalle en el apartado I.3.2.2.

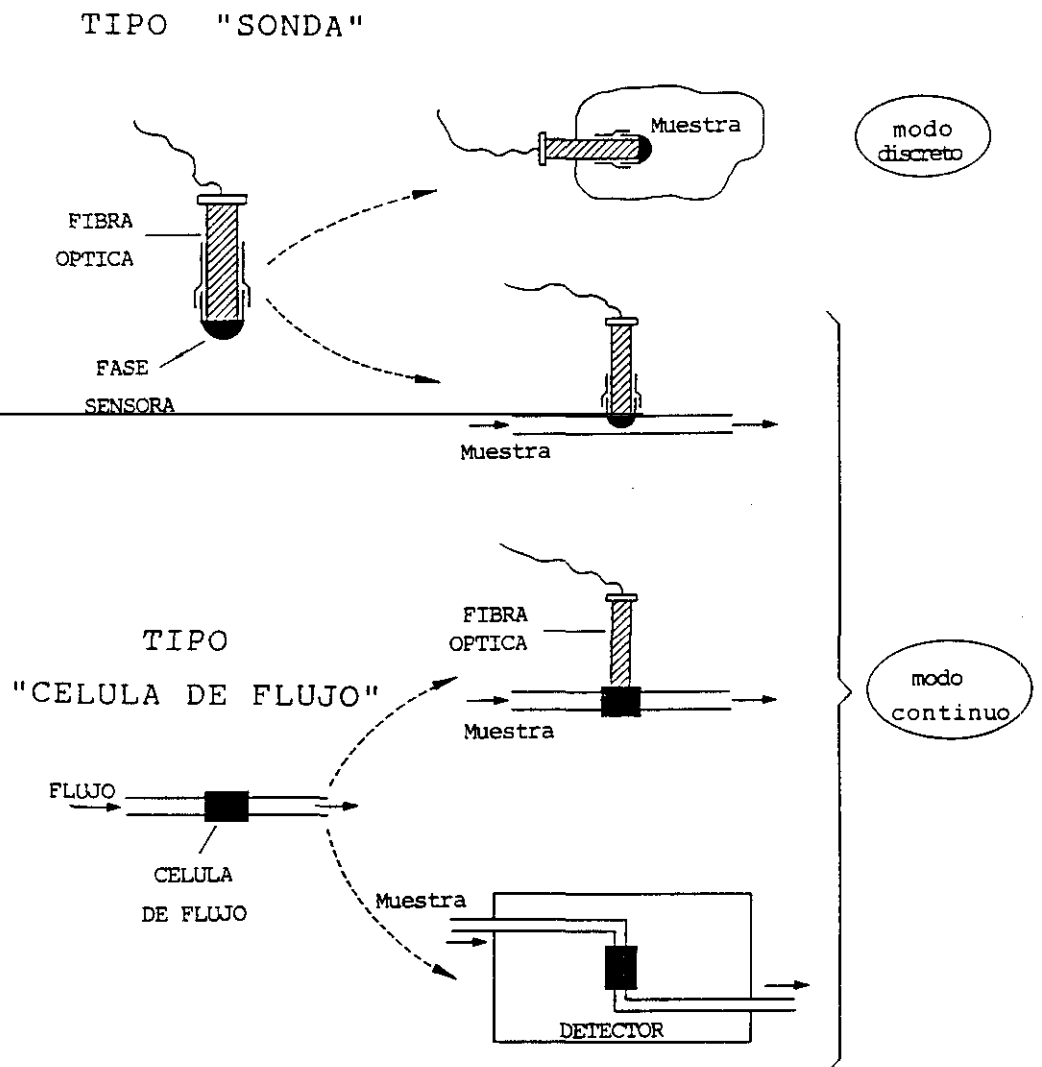


Figura 5. Clasificación de los sensores ópticos en función de su forma externa

*.- Según su complejidad y evolución pueden distinguirse (40):

- *sensores de primera generación*: corresponden a este tipo aquellos sensores que detectan un analito gracias a que éste posee alguna característica óptica susceptible de ser medida directamente, por ejemplo un sensor de naturaleza óptica para estudiar la presencia de ión uranilo (fluorescente) en aguas subterráneas lo constituye un haz de fibras ópticas que conducen radiación procedente de un láser hacia este analito y la luz emitida por éste hacia el detector. Estos sensores carecen de terminal sensible

- *sensores de segunda generación*: puesto que la inmensa mayoría de analitos de interés no poseen en sí mismos propiedades susceptibles de medida se necesita un terminal sensible a dicho analito. Se detecta en este caso el cambio de propiedad existente en dicho terminal como consecuencia de la reacción o interacción del analito con el compuesto que existe en el terminal sensible. Ejemplos típicos son sensores de pH con indicadores ácido-base en el extremo de la fibra óptica.

- *sensores de tercera generación*: supone el grado máximo de dificultad tanto en la instrumentación como en el fundamento básico, puesto que incluye más de una reacción, generalmente una de ellas implica la producción de un compuesto que será detectado a través de una segunda reacción. Supone este caso una determinación de tipo indirecto puesto que la señal analítica no es generada directamente por la especie de interés. Este tipo de sensores es aplicado generalmente con biomoléculas. La determinación de glucosa mediante la medida del oxígeno consumido en su oxidación enzimática constituye un ejemplo de este tipo de sensores

El tiempo de respuesta del sensor, como era de espera, aumenta al incrementar la complejidad del mismo, siendo máximo para sensores de tercera generación y mínimo en los de primera generación. La figura 6 muestra de forma esquemática esta clasificación.

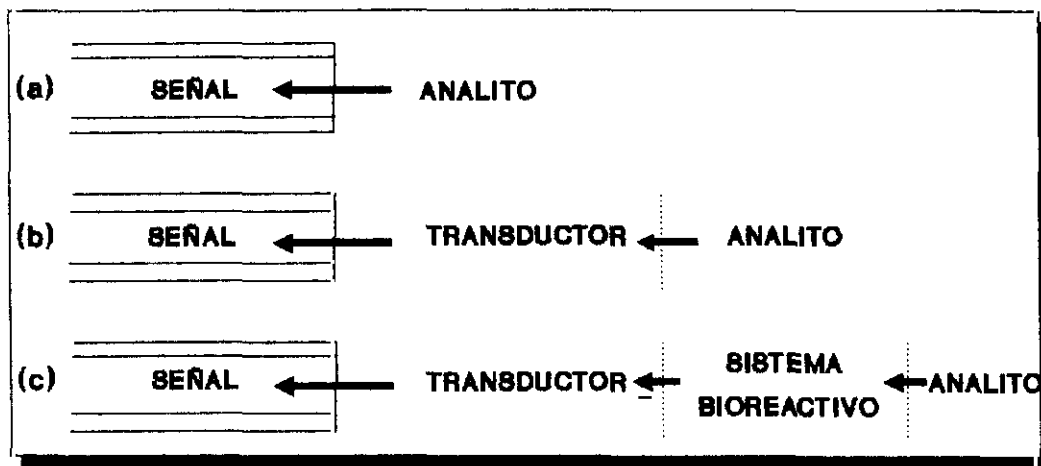


Figura 6: Representación esquemática de la obtención de información óptica en sensores de primera, segunda y tercera generación.

3.2. FASES SÓLIDAS EN SISTEMAS EN FLUJO.

La introducción de **fases sólidas** en los sistemas en flujo tradicionales proporciona un **incremento de sensibilidad** como consecuencia de la posibilidad de preconcentración del analito sobre la interfase sólida y/o una disminución de la dilución (43) y en algunos casos un **incremento de selectividad**.

La fase sólida puede formarse a lo largo del flujo como resultado de una reacción química (precipitación) o sobre una superficie sólida como resultado de una reacción

electroquímica (técnicas de stripping), o bien puede disponerse la fase sólida en diversas posiciones de un sistema de inyección en flujo según se indica en la figura 7. Si la detección se produce sobre la misma fase sólida nos encontraremos ante sistemas simultáneos de reacción/detección o retención/detección. En la fase sólida puede estar inmovilizado alguno/s de los componentes de la reacción (reactivo, producto de reacción, catalizador...).

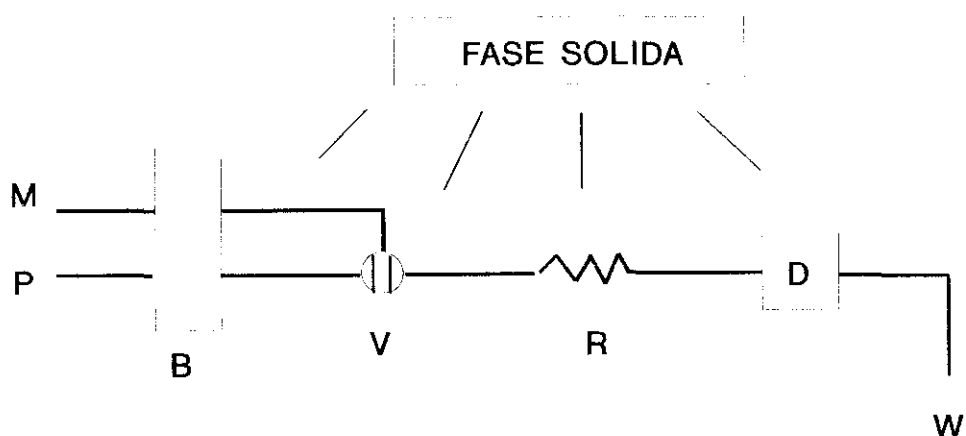


Figura 7: Diferentes posiciones de fases sólidas en un sistema en flujo.

Los sistemas en flujo continuo que incluyen fases sólido-líquido pueden clasificarse en función del momento en que se realice la detección en:

Retención y posterior detección, es decir, tras la etapa de retención/preconcentración, el analito es arrastrado de la fase sólida, empaquetada en pequeñas columnas, por medio del eluyente, hacia el sistema de detección.

Integración del proceso de retención y detección: La fase sólida sensora empaquetada en células de flujo se sitúa en el detector siendo posible además de la preconcentración del analito la detección del mismo sobre la misma fase reactiva sin necesidad de elución por lo que éste no sufre dispersión en el sistema de flujo.

3.2.1. FASES SÓLIDAS NO INTEGRADAS EN EL SISTEMA DE DETECCIÓN.

Existen numerosos trabajos en la bibliografía que utilizan sistemas en flujo en combinación con gran variedad de fases sólidas previamente a la detección con diferentes finalidades, generalmente mejorar las características analíticas.

Son posibles diferentes vías para llevar a cabo la **preconcentración** y consecuentemente un aumento de sensibilidad (43). En primer lugar es posible el acoplamiento de una unidad de separación convencional como minicolumnas o formación de un precipitado.

La utilización de minicolumnas para la preconcentración del analito conlleva la reacción de éste con el reactivo adecuado que se encuentra soportado en la columna. La disposición de esta minicolumna dentro de un sistema en flujo puede ser variable (en el bucle de inyección, entre el sistema de inyección y de detección o en el flujo de muestra). Los materiales de relleno utilizados en las minicolumnas son muy diversos, en la bibliografía hay descritas columnas rellenas con material adsorbente como C₁₈ (44), alúmina (45,46), sílice, e intercambiadores comerciales (47) o preparados por activación de un soporte inerte con una molécula quelatante (48).

Normalmente este tipo de minicolumnas se utilizan para preconcentración y posterior detección de la muestra por espectrometría atómica, ya sea de emisión por plasma (ICP) o espectrometría de absorción atómica (AA). Recientemente se ha publicado una revisión de este acoplamiento (49). Atienza y colaboradores han revisado exhaustivamente métodos que utilizan sistemas de flujo con minicolumnas preconcentradoras y diferentes sistemas de detección para la determinación en aguas naturales tanto de compuestos orgánicos y aniones (50) como de cationes (51).

La formación in situ de un precipitado y su retención en un filtro es otra vía con la que se han conseguido factores de preconcentración elevados tanto en determinaciones directas como indirectas de especies individuales o en multideterminaciones (52). Kuban (53) ha hecho una revisión muy completa de las técnicas de precipitación continua con/sin posterior redisolución del precipitado en análisis por inyección en flujo y su eficacia en

separaciones y preconcentraciones de varias clases de analitos (aniones inorgánicos, iones metálicos y compuestos orgánicos) en matrices acuáticas.

Otra manera de aumentar la sensibilidad en un sistema en flujo, especialmente FIA gracias a la introducción de interfases sólidas, se debe a la **disminución de la dilución** por el empleo tanto de reactivos como de catalizadores sólidos que pueden empaquetarse en minicolumnas (reactores redox o enzimáticos) o en membranas. El empleo de estos reactivos sólidos se ha utilizado con dos propósitos: convertir el analito en una especie adecuada para su posterior reacción o generar "in situ" reactivos que son inestables y por lo tanto difícil de manipular.

Los primeros "reactores sólidos", utilizados en un sistema FIA fueron los reactores tipo redox, con ellos ha sido posible la determinación de nitrato previa reducción a nitrito con partículas de cinc empaquetadas en un reactor (54) especiación de nitrógeno (55) y la determinación fotométrica de paracetamol con un reactivo imina previa oxidación del analito con hexacianoferrato potásico inmovilizado en un intercambiador aniónico (56). En estos reactores pueden empaquetarse reactivos inestables en disolución (57)

La inmovilización de enzimas en soportes adecuados ha sido un hecho determinante para el acoplamiento de reactores enzimáticos con sistemas FIA tanto para la determinación de sustratos (58,59) como para la determinación de actividad enzimática (60).

La utilización de **fases sólidas en sistemas en flujo** puede **mejorar la selectividad** con diversos modos de actuación, tales como: eliminación de las especies interferentes, utilización de métodos basados en velocidad de reacción cuando existen enzimas inmovilizadas o acoplamiento del sistema de inyección con técnicas de separación como HPLC.

El aumento de la selectividad por **eliminación de interferencias** puede conseguirse tanto por la introducción de fases sólidas como por la formación éstas en el sistema de flujo. Algunos métodos se basan en la retención del analito (61) o de las especies potencialmente interferentes (62,63) sobre una columna de adsorción o de intercambio iónico, que puede contener agentes enmascarantes, otros métodos se basan en el

acoplamiento de estas minicolumnas con técnicas de separación como sucede en la determinación de Pb por generación de hidruros (64).

Uno de los métodos más usuales para aumentar la selectividad es la utilización de membranas pues en función de su naturaleza permiten el paso selectivo de diferentes especies tales como gases, moléculas menores de determinado peso molecular, especies iónicas etc. Para que dicha separación se efectue con un buen rendimiento se necesita un tiempo determinado de contacto entre la disolución y la membrana, condición contradictoria a la filosofía de un sistema FIA con medidas en no equilibrio (tiempo muy corto de contacto entre ambos). Por tanto el empleo de membranas en sistemas en flujo derivaría en una menor sensibilidad, problema que puede subsanarse empleando técnicas de preconcentración. Las membranas más comúnmente utilizadas pertenecen a uno de los siguientes tipos:

- Membranas de difusión de gases y silicona que permiten la determinación de compuestos en estado gaseoso (como O₃, ClO₂) (65-67) o aquellos que no siendo éste su estado natural puedan sufrir dicha transformación por reacción ácido-base (68-70), calor (71,72) o generación de hidruros.
- Membranas de diálisis, muy útiles para la eliminación de interferencias de proteínas y macromoléculas en muestras biológicas, este es el caso de la eliminación de la interferencia producida por la caseína en determinación potenciométrica de cloruro en leche utilizando un electrodo selectivo de cloruro (73).
- Membranas ionómeras que aumentan la selectividad de biosensores basados en electrodos enzimáticos como ha demostrado Rosario y colaboradores con la determinación de urea en suero humano (74).
- Membranas microporosas utilizadas con éxito como separadores de fases en la generación de hidruros, como paso previo a la etapa de detección.
- Membranas hidrofóbicas inertes (75,76) muy útiles para etapas de limpieza y preconcentración en sistemas de flujo acoplados a cromatografía de gases. Estas membranas se han convertido en una alternativa de gran interés a la extracción líquido-líquido en dichos acoplamientos..

La formación de un precipitado en el sistema en flujo ha permitido la determinación selectiva de Ca en presencia de Al (77).

Los métodos que utilizan **enzimas inmovilizadas** y se basan en la **velocidad de reacción** combinan la selectividad intrínseca que poseen las enzimas con las ventajas de los métodos de análisis basados en la velocidad de reacción (eliminación de interferencias procedentes de la matriz y de las especies que reaccionan más rápida o más lentamente que el analito), por ello la utilización de reacciones bioquímicas con reactivos o catalizadores inmovilizados conllevan un aumento tanto de sensibilidad como selectividad. Estas medidas pueden efectuarse en tres modalidades diferentes: flujo parado (78), cambio iterativo de dirección de flujo (79), y configuraciones abierto-cerrada. (80).

Los inmunoensayos poseen un gran potencial para el incremento de la selectividad de los métodos FIA (81) cuando se inserta en el sistema de flujo una minicolumna que contienen los anticuerpos inmovilizados. El principio de su funcionamiento está basado en la competencia por el enlace de un anticuerpo entre un antígeno (analito) y un antígeno marcado (enzimática o fluorimetricamente) que está presente en la muestra en una cantidad conocida y fija.

Tanto en los últimos años como en un futuro próximo la tendencia en el desarrollo de métodos en flujo continuo, especialmente FIA, desde el punto de vista aplicado ha estado y está orientada a la **multideterminación** y desde el punto de vista tecnológico se centra en un incremento de la **automatización** y de la **miniaturización** del sistema. En ambas áreas el proceso pasa por avances en los sistemas FIA asociados a la utilización de fases sólidas.

3.2.2. FASES SÓLIDAS INTEGRADAS EN EL SISTEMA DE DETECCIÓN: SENSORES ÓPTICOS EN FLUJO.

El **acoplamiento de métodos automáticos en flujo** (plenamente establecidos en el campo de Química Analítica) con una "técnica relativamente nueva" pero ampliamente divulgada como los **sensores ópticos** es una de las tendencias más innovadora en el campo de (bio)sensores químicos.

Es ésta una tendencia que ocupa un lugar preferente en la investigación actual, su atractivo se basa en la posibilidad de aunar las ventajas que presentan ambas técnicas por separado, las inherentes a los métodos de análisis por inyección en flujo (FIA) (**reducción de cantidad y nivel de interferencias, alta reproducibilidad y precisión, alta frecuencia de muestreo, gran sencillez y economía y gran versatilidad**). y las propias de los **sensores ópticos** (gran potencial para medidas rápidas "**in situ**", **a larga distancia y en ambientes peligrosos**, así como la **posibilidad de preconcentración**). Ambas ventajas posibilitan el empleo de sensores ópticos en el seguimiento de especies de interés en una gran variedad de campos..

El empleo de los métodos FIA en combinación con los optrodos se ha sugerido con dos finalidades principales: comprobar el funcionamiento de los sensores y acoplar los sensores ópticos como detectores en sistemas FIA para llevar a cabo análisis químicos convencionales.

El primer propósito constituye un modo sencillo de optimizar los parámetros que afectan al funcionamiento del sensor.

Por otra parte los **sensores ópticos en flujo** ofrecen una alternativa ventajosa frente a los optrodos convencionales (tipo "sonda"). Las **ventajas** citadas incluyen:

- capacidad para renovar y acondicionar de manera reproducible y sencilla la capa sensora,
- facilitar el proceso de regeneración de la fase reactiva (sensores regenerables), o recalibración del sensor,
- evitar variaciones en parámetros que influyen en la respuesta del sensor tales como pH, temperatura o fuerza iónica,
- minimización de los problemas cinéticos de transferencia de masa que se observan a través de membranas y que constituyen uno de los mayores inconvenientes de muchos optrodos,
- adaptabilidad, posibilidad de pretratamientos en línea, automatización, etc.

La **fase reactiva** de un sensor en flujo puede estar constituida por:

1) **inmovilización permanente** de un **reactivo** (82-85) que directa o indirectamente reacciona con el analito para formar un producto detectable ópticamente.

2) **inmovilización permanente** de un **catalizador** (86-89) que facilita la conversión del analito en un producto con propiedades ópticas diferentes.

3) **inmovilización temporal** del **sustrato** (90-92), muy útil para la determinación de sustratos con propiedades ópticas susceptibles de ser medidas o para la determinación de catalizadores.

4) **inmovilización temporal** del **producto de reacción** (93-97), de gran interés en aquellos casos en que no se consigue una inmovilización estable del reactivo sobre la fase sólida o bien cuando la cinética de la reacción de formación de un complejo u otro producto es relativamente desfavorable.

La operatividad de los sensores en flujo supone la necesidad de reversibilidad o al menos regeneración de la fase reactiva. Ambos casos significan la recuperación de la línea base de forma repetitiva y reproducible cada vez que se completa un ciclo de medida.

1) cuando se trata de reacciones reversibles y la muestra inyectada entra en contacto con la superficie reactiva, de forma que el indicador inmovilizado reacciona con el analito, se obtiene una **señal transitoria** (típico pico FIA). La altura de pico, H, puede servir como base para la calibración. La línea base se debe al contacto de la fase reactiva con la disolución reguladora, mientras que el pico FIA se debe al contacto con la muestra. (Figura 8 trazo grueso).

2) en este caso, el analito es retenido sobre la superficie activa, teniendo lugar la reacción, la **señal** en este caso es **acumulativa** por lo que transcurrido cierto tiempo alcanza un valor constante. A continuación el producto de la reacción es eluido con un reactivo apropiado, el cual se inyecta una vez alcanzada la meseta y de esta forma la señal retorna hasta la línea base (Figura 8 trazo fino).

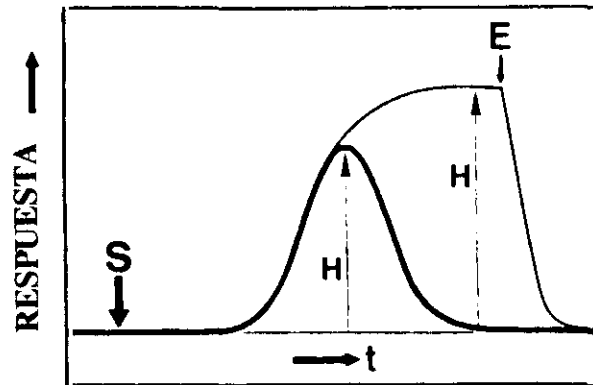
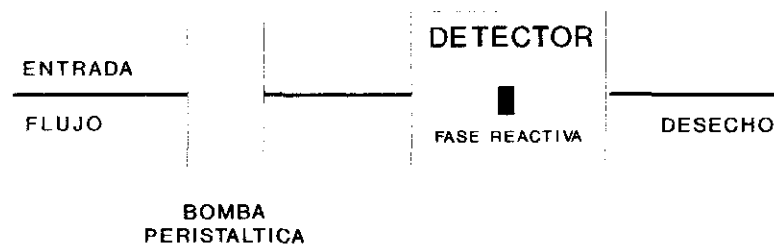


Figura 8. Tipos de señales obtenidas con sistemas en flujo que integran los procesos de retención/reacción y detección en la fase sólida. La señal puede tener forma de pico (trazo grueso) o curva asintóticamente ascendente, que retorna a la línea base una vez bombeado el eluyente (E).

Los sensores ópticos en flujo pueden responder principalmente a dos **configuraciones**, según se muestra en la Figura 9, en ambas la reacción química que da lugar a la señal analítica se produce en la fase sensora que está situada en un sistema en flujo. La fase reactiva puede estar situada físicamente en el sistema de detección (Figura 9a) o puede no estar situada la fase sólida en el detector. En este último caso es preciso el acoplamiento de una fibra óptica para la transmisión de la "señal analítica" desde el soporte sólido hasta el detector (figura 9b).



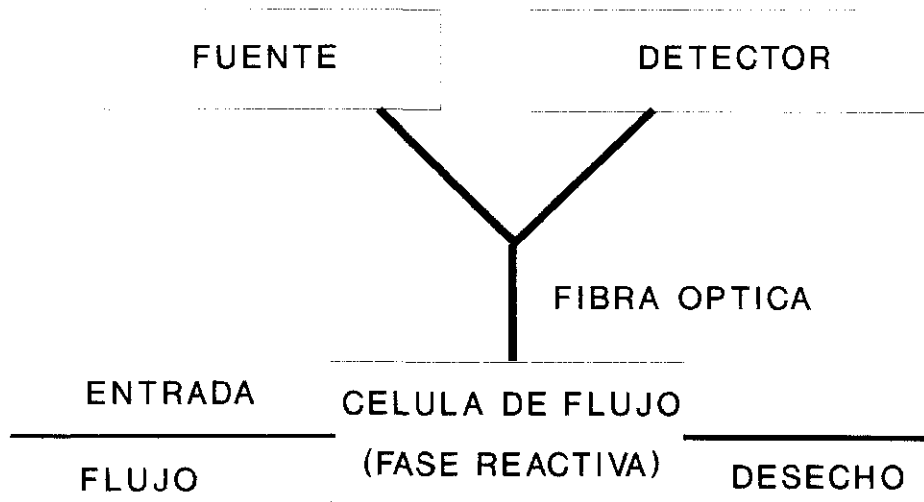


Figura 9. Configuraciones de sensores ópticos en flujo. **a)** sin fibra óptica. **b)** con fibra óptica.

La eficiencia de la integración de los procesos de conversión y detección en un determinado sistema necesita unos **requisitos** que pueden resumirse en:

- la inmovilización permanente o temporal de alguno de los componentes de la reacción química,
- es deseable que la fase sensora actúe de forma reversible o al menos regenerable,
- cinética rápida de los procesos de retención y elución,
- compatibilidad del soporte elegido y sistema de detección

3.3. INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación básica asociada a los sensores (tanto tipo sonda o de flujo) es bastante simple, ya que se utilizan los componentes espectroscópicos convencionales pudiendo incluir o no fibra óptica. Frecuentemente, las medidas de radiación en superficies sólidas puede realizarse modificando levemente los espectrofotómetros convencionales,

modificación que solo conlleva la adaptación del compartimento de la muestra con el objeto de enfocar y alinear correctamente la fibra al sistema óptico del instrumento. Otra posibilidad en el campo de sensores ópticos es el diseño y construcción del equipo por módulos cuyas características y coste económico dependerán de las necesidades concretas (posibilidad de miniaturización y equipos portátiles). En el caso de sensores (en flujo) en los que la reacción/retención y detección se realice simultáneamente el instrumental analítico solo se verá modificado en cuanto a la incorporación del sistema en flujo que dada la versatilidad de estos dispositivos no muestra ninguna complicación.

El diseño de la célula de flujo deber ser optimizado con objeto de que exista una interacción máxima entre la radiación y el frente de moléculas situadas en la "superficie activa". Idealmente todos los materiales absorbentes deben colocarse en el campo visual del detector, la energía absorbida o reflejada por las moléculas debería ser máxima mientras que efectos como la luz dispersada por las ventanas y paredes de la célula y por el material sólido debe ser mínima, por otra parte la geometría de la célula debe llevar a una eficiencia máxima de adsorción/desorción de reactivos y analitos.

En general la instrumentación consta de los siguientes componentes:

3.3.1. FUENTES DE RADIACIÓN.

Puede hacerse uso de lámparas convencionales utilizadas en otras técnicas, tales como láseres, lámparas de xenon, de neon, de halógenos, de wolframio, diodos emisores de luz etc.

La utilización de *láseres* en combinación con sensores ópticos ofrece grandes ventajas por ser unas fuentes de radiación muy intensas lo que permite la conducción de la radiación a través de la fibra óptica a lo largo de grandes distancias con una mínima atenuación, además la naturaleza casi monocromática de la radiación emitida permite la utilización de filtros en lugar de monocromadores. Como contrapartida, sus inconvenientes son su elevado precio, complicado sistema de estabilización y aparición de un fondo espectral indeseable originado por la estimulación de la radiación Raman.

Los *lámparas de descarga de xenon* tanto de corriente continua como pulsada emiten radiación perteneciente a un amplio intervalo espectral (250 - 800 nm), la

intensidad de dicha radiación varía considerablemente con el estado de la lámpara por su tiempo de vida limitado. Estas lámparas requieren además al igual que los láseres un sistema de estabilización importante. Las lámparas de xenon pulsadas son preferibles por su mayor tiempo de vida, menor precio y menor consumo de energía, sin embargo hay que tener en cuenta las fluctuaciones de pulso a pulso de la lámpara.

Las *lámparas de neon* presentan máximos espectrales entre 350 - 700 nm. La intensidad de la radiación emitida es pequeña pero su gran tiempo de vida junto a su bajo precio y baja energía eléctrica requerida, hacen de estas lámparas de descarga en combinación con fibras ópticas y filtros interferenciales una opción interesante.

Las *lámparas de halógenos y de wolframio* son más baratas, pero su uso práctico es muy limitado: producen mucho calor, limitada duración y no emiten por debajo de 400 nm.

Los *diodos emisores de luz*, por su pequeño tamaño, gran duración y baja potencia, se pueden considerar como fuentes de luz ideales en la construcción de instrumentación portátil de optrodos basados en medidas fotométricas. No obstante, la baja intensidad de la luz emitida y la falta de existencia de diodos en todo el intervalo espectral limita sus aplicaciones.

3.3.2. SELECTORES DE LONGITUD DE ONDA Y ACOPLADORES ÓPTICOS.

La señal con interés analítico generada en los sensores ópticos, que puede corresponder a cualquier intervalo del espectro, debe ser discriminada de la luz interferente que normalmente la acompaña (emisión Raman y dispersión Rayleigh principalmente). Para ello pueden utilizarse filtros o monocromadores.

La discriminación de estas radiaciones es de suma importancia en el caso de utilización de fibras únicas en las que a su través viajan tanto la luz procedente de la fuente como la que procede de la muestra. En el caso de análisis por fluorescencia pueden utilizarse filtros interferenciales, más económicos, en lugar de monocromadores siempre y cuando exista un gran desplazamiento de Stokes.

La radiación procedente de la fuente debe acoplarse ópticamente a la fibra óptica así como la radiación emitida por la muestra debe acoplarse al detector, por otra parte el haz de radiación debe diferenciar entre la radiación incidente y la reemitida por la fase sólida, para ello se emplean diversos métodos, utilización de espejos sectorizados o bifurcación de la fibra entre otros.

La utilización de haces de fibras produce pérdidas adicionales porque las fibras de detección no recogen toda la radiación producida por la muestra. Dichas pérdidas aumentan con la distancia entre las de fibra con un menor ángulo de solapamiento. La mayor eficiencia de acoplamiento es cuando la muestra es grande en relación al campo de vista del haz de detección. Pueden utilizarse lentes para aumentar esta eficiencia si la muestra es de pequeño tamaño o se encuentra en un lugar inaccesible. El tamaño del haz de fibras afecta tanto a la cantidad de luz que llega a la muestra como a la cantidad de luz recolectada. (Figura 10). Las fibras únicas ofrecen ventajas por su pequeño tamaño (posibilidad de empleo en cateteres) y menor costo, las fibras ópticas bifurcadas son más voluminosas pero permiten una iluminación más homogénea de las muestras.

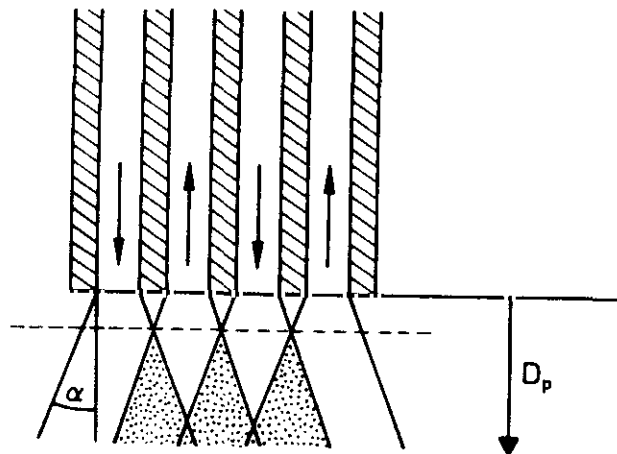


Figura 10. Conos comunes de luz y distancia mínima entre fibra y la capa sensible para mayor sensibilidad en una haz de fibras ópticas

3.3.3. DETECTORES DE RADIACIÓN

Existen actualmente tres tipos de detectores: fotoemisores (tubos fotomultiplicadores y fototubos), detectores de tipo voltaico (fotodiodo de silicio) y de tipo fotoconductor (fototransmisores, fotodiodos, etc). La elección del más apropiado es un compromiso entre la sensibilidad requerida y el coste económico.

Los *tubos fotomultiplicadores* tienen una relación señal/ruido muy favorable y una respuesta rápida por lo que son ideales para medidas de radiación de baja intensidad.

El *fotodiodo de silicio* presenta pequeño tamaño, bajo precio y buena estabilidad así como un intervalo dinámico más amplio que los fotomultiplicadores, sin embargo su sensibilidad es mucho menor.

Los detectores de *tipo fotoconductor* poseen buena sensibilidad en el intervalo 400-900 nm y pueden ser de distintos tipos: 1) de unión fotoconductor que incluye los fototransistores y los fotodiodos "positivo-intrínseco-negativo"; 2) células fotoconductoras de sulfuro de cadmio y seleniuro de cadmio.

3.3.4. FIBRA ÓPTICA: PROPAGACIÓN DE LA RADIACIÓN.

La fibra óptica es capaz de transportar la radiación electromagnética a grandes distancias con pérdidas muy pequeñas en su intensidad. Actualmente y gracias al gran avance que se ha producido en las ciencias de la comunicación se dispone de gran variedad de fibras ópticas.

La sección transversal de una fibra óptica se encuentra representada en la figura 11. En ella se observa que está formada por tres partes: el núcleo y el revestimiento, de materiales transparentes a la radiación empleada y una funda protectora. El núcleo constituye el soporte físico de la radiación óptica que se guía y el revestimiento ayuda al confinamiento de dicha radiación. Finalmente suele recubrirse la fibra por una funda externa, generalmente plástica que proporciona protección mecánica y térmica a la fibra.

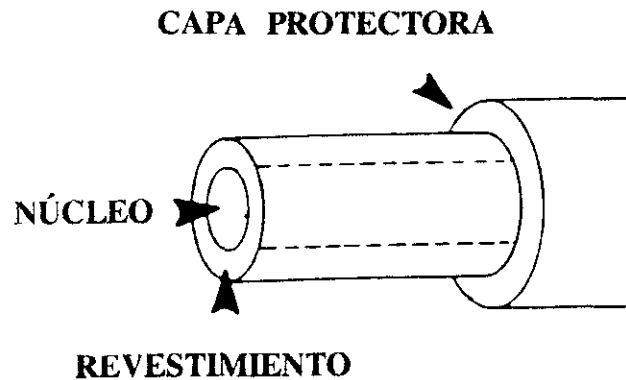


Figura 11. Partes de una fibra óptica.

El principio por el cual la fibra "conduce" la radiación por el camino deseado se basa en la reflexión total (figura 12) que tiene lugar en un material de alto índice de refracción (n_1) al llegar a la interfase con un material (revestimiento) de menor índice (n_2), siempre que la radiación penetre en la fibra con un ángulo menor que el ángulo de aceptación o crítico. La relación entre el ángulo de incidencia y el de refracción viene dada por la ley de Snell:

$$n_1 \operatorname{sen} \alpha_i = n_2 \operatorname{sen} \alpha_r$$

A medida que el ángulo de incidencia (α_i) se va haciendo mayor aumenta el ángulo de refracción (α_r), hasta que para un valor $\operatorname{sen} \alpha_i > n_2/n_1$ es imposible que el rayo sufra refracción sino que es reflejado dentro de la fibra (reflexión total). Para que esto ocurra es importante saber cual es el máximo ángulo de entrada de radiación en la fibra, este ángulo se denomina ángulo de aceptación α_{OL} cuyo valor se expresa en la siguiente ecuación:

$$\alpha_{OL} = \operatorname{arcsen}(n_1/n_0 \cos \alpha_i)$$

donde n_0 es el índice de refracción externo a la fibra. Por consiguiente, toda la radiación con un ángulo de entrada menor o igual al ángulo de aceptación α_{OL} se transmite por la fibra, mientras que si es mayor, se pierde.

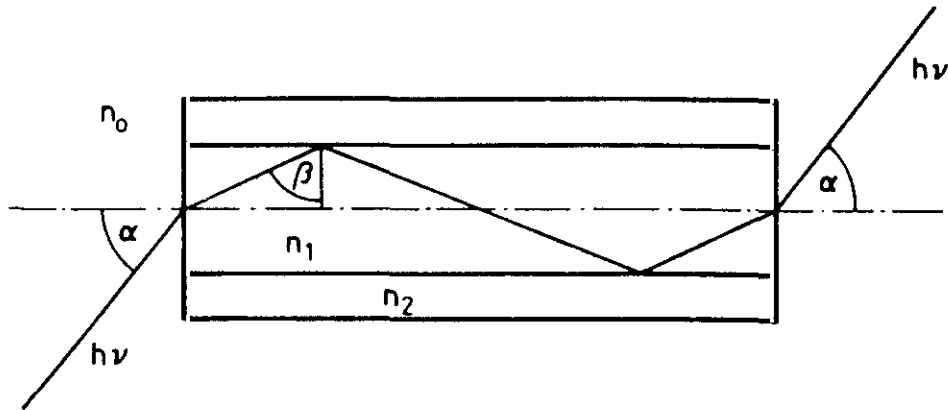


Figura 12: Transmisión de la radiación a través de la fibra óptica

Los parámetros característicos de una fibra óptica los podemos clasificar en estáticos y dinámicos:

Estáticos son aquéllos parámetros que se mantienen constantes a lo largo de la fibra. A esta categoría pertenecen los siguientes parámetros:

- *Apertura numérica (A N)*. Indica la cantidad de luz que es capaz de aceptar la fibra. La apertura numérica describe el cono de radiación que puede penetrar por la fibra para ser "guiada" y normalmente oscila entre 0.18 y 0.66.

$$A N = n_0 \text{ sen } \alpha_{OL}$$

La apertura numérica si $n_0 = 1$ es función únicamente del seno del ángulo de aceptación. Este ángulo depende de la diferencia entre los índices de refracción del núcleo y del revestimiento, cuanto mayor es esta diferencia, mayor es el ángulo y por tanto mayor la apertura numérica de la fibra.

$$A N = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2}$$

- *Diámetro* del núcleo y diámetro del revestimiento, la relación de ambos configura que las fibras sean multimodo o de modo único.

- *Índice de refracción*. Los valores del índice de refracción dan lugar a dos tipos de fibras según que éste sea constante o tenga un gradiente a lo largo de la misma.

En las primeras el índice del núcleo, n_1 y del revestimiento n_2 son constantes, transmitiéndose la radiación en "zig-zag" por reflexión total. Estas fibras se denominan de "salto de índice".

En las segundas el índice de refracción del núcleo n_1 , tiene un gradiente a lo largo de la fibra, pero siempre es mayor que el índice del revestimiento n_2 . En estas fibras que se denominan de "índice gradual", la transmisión tiene lugar en "ondas" por reflexión total y por refracción. En la figura 13 se puede observar un esquema con los distintos tipos de fibra.

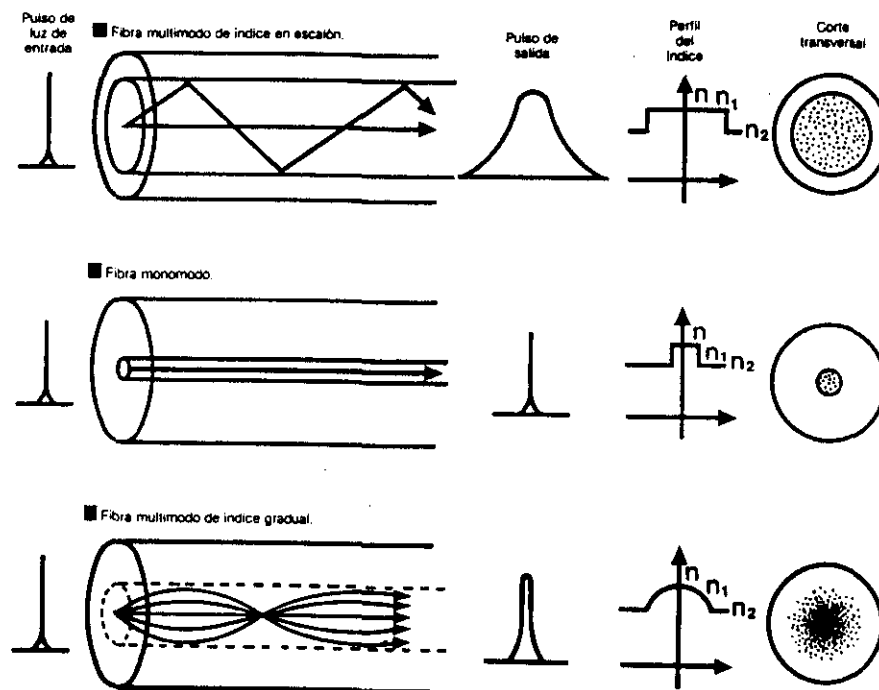


Figura 13. Tipo de fibras ópticas

Dinámicos, son aquéllos parámetros que varían a medida que la radiación avanza por la fibra y definen el grado de distorsión de la señal luminosa. A esta categoría pertenecen:

- *Atenuación*. Este parámetro mide la pérdida de la radiación a lo largo de la fibra, dependiendo de factores intrínsecos y extrínsecos. La atenuación se mide en decibelio/Km (dB/Km) y se calcula como:

$$\text{dB/Km} = -10 \log I/I_0$$

donde I_0 es la intensidad de la radiación que penetra en la fibra e I es la intensidad en un punto dentro de la fibra.

Los factores intrínsecos no se pueden eliminar puesto que dependen de la naturaleza del material empleado, y dan lugar fundamentalmente a pérdida de radiación por absorción. Las fibras de sílice fundida transmiten en el intervalo de 220 a 1300 nm, mientras que las de vidrio lo hacen desde 380 hasta 1300 nm. Las fibras de plástico (poliestireno, polimetacrilato) son mucho más económicas y fáciles de manejar pero únicamente transmiten en el visible. Las pérdidas de radiación debida a factores extrínsecos, que dependen de hechos como la contaminación del vidrio con metales, curvatura, etc, se han minimizado a lo largo de los años puesto que cada vez se consiguen materiales con mayor pureza. En la actualidad se trabaja con fibras con una atenuación del orden de 0.01 - 3 dB/Km.

La curvatura de la fibra también da lugar a pérdidas, pero éstas son inapreciables hasta que se sobrepasa una curvatura crítica. Como regla práctica puede considerarse un radio de curvatura mínimo de valor igual a diez veces el diámetro externo de la fibra.

3.3.5. TERMINAL SENSIBLE.

La preparación del terminal sensible con la fase sensora reactiva puede considerarse la etapa clave en el diseño y desarrollo de los sensores ópticos. En esta etapa se incluye la elección del indicador adecuado, el soporte y el método de inmovilización para la obtención de superficies activas tan sensibles como sea posible. Es un estudio difícil dada la cantidad y variedad tanto de indicadores, como de soportes sólidos y mecanismos de

inmovilización. Es preciso tener en cuenta el analito a determinar para la elección del indicador adecuado, las características de ambos y su posible interacción para la selección del soporte y todo ello condiciona la elección del método de inmovilización más adecuado. A pesar de la cantidad de estudios efectuados no puede generalizarse en cuanto al tipo de soporte y mecanismo de inmovilización ideales sino que esta elección debe basarse en datos experimentales obtenidos para cada indicador en condiciones determinadas. De manera orientativa se pueden ensayar los sustratos que hayan sido utilizados en bibliografía con buenos resultados con reactivos similares a los de interés.

Dada la importancia de esta parte del sensor se estudiará separadamente en el siguiente apartado.

3.4. FASE SENSORA O REACTIVA.

En este apartado se hará una breve descripción de los indicadores y soportes más empleados en la bibliografía haciendo mención especial a los distintos procedimientos para la inmovilización.

3.4.1. INDICADORES.

Se han descrito multitud de reactivos para la determinación de numerosos analitos inorgánicos. Entre ellos existen colorantes, indicadores fluorescentes e incluso moléculas orgánicas normalmente no fluorescentes por sí solas que pueden serlo utilizando reactivos marcadores o derivatizantes.

El indicador debe poseer una función química que le permita ser inmovilizado en un soporte rígido, si no es así es preciso modificarlo para proveerle de una función química que posibilite el proceso de inmovilización. Es deseable que dicho proceso no afecte las propiedades fisico-químicas del reactivo elegido para que la reactividad del mismo en fase sólida sea similar a la que presenta en disolución.

Una de las razones principales de la limitada estabilidad (tiempo de vida) de los sensores ópticos es la fotodescomposición de los indicadores, por ello en la selección del

indicador es de suma importancia que éste presente una gran estabilidad fotoquímica ya que el indicador soportado está sometido a continua radiación durante semanas e incluso meses.

A pesar de los numerosos reactivos conocidos para la determinación de una gran diversidad de analitos se requiere un gran esfuerzo en investigación en cuanto al diseño de nuevas moléculas fluorescentes que puedan ser utilizadas en fase sólida para la determinación de especies de interés para las que no existe indicador adecuado, o para la mejora en cuanto a selectividad de los reactivos ya descritos para diversos analitos.

3.4.2. SOPORTES.

Los reactivos utilizados en sensores ópticos se inmovilizan preferentemente en soportes rígidos y ópticamente transparentes, constituyendo su conjunto la fase sensible al analito a determinar. Como soporte sólido puede utilizarse la superficie del extremo final de la fibra óptica aunque su superficie específica es más bien pequeña por lo que la sensibilidad obtenida es limitada, ésta puede verse compensada con la utilización de una fuente de energía potente como el láser. La elección del soporte tiene un efecto marcado en las características del futuro sensor, principalmente en el tiempo de respuesta e incluso en la selectividad del método.

En todo caso, la elección del soporte polimérico depende de los requerimientos predicibles por las interacciones indicador-analito. Por ejemplo para analitos gaseosos la respuesta está gobernada por el coeficiente de difusión de los gases hacia el soporte, su solubilidad en el mismo y la permeabilidad de éste. Así, cuando se trata de indicadores fluorescentes y desactivadores gaseosos no polares, como oxígeno o dióxido de azufre, el indicador puede disolverse en un polímero adecuado para formar la capa sensible a través de la cual el desactivador pueda difundir libremente pero no las sustancias iónicas mejorando en este caso la selectividad. Se considera que para O_2 y CO_2 la silicona es el soporte de elección por la gran solubilidad que presentan dichos analitos en este soporte además de que impide el paso a sustancias acuosas por su carácter hidrofóbico.

Otro aspecto a tener en cuenta en la elección del soporte es la posible fluorescencia intrínseca de algunos soportes tales como algunos polímeros de poliestireno (excitación UV) que se traduciría en la obtención de señales muy altas correspondiente al blanco. Los

polímeros de polietileno también presentan fluorescencia pero con menor intensidad. Por el contrario cloruro de polivinilo y silicona normalmente no presentan fluorescencia. Algunos aditivos plastificantes añadidos a los polímeros orgánicos para mejorar sus características físicas como maleabilidad y permeabilidad frente a gases también poseen fluorescencia contribuyendo a la señal de fondo.

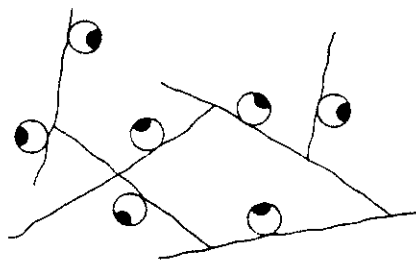
En las situaciones en que el analito no penetre en el interior del polímero o el reactivo a utilizar no sea soluble en tales polímeros, es preciso facilitar el acceso del analito hacia el reactivo que normalmente se efectúa por inmovilización del mismo en la superficie del soporte polimérico permitiendo su contacto con la disolución de muestra.

Son muchos los soportes sólidos utilizados en los procesos de inmovilización, los empleados con más frecuencia son: vidrio en varias formas, celulosa, poliacrilamida, papel de cromatografía, membrana de electroforesis, intercambiadores iónicos etc. La investigación en la utilización de otros muchos soportes debe continuar para aclarar en lo posible las variables que afectan a la radiación observada "emitida" desde el sólido con el fin de poder controlar dichas variables (distribución del analito sobre la superficie, espesor de la fase reactiva). El vidrio presenta la ventaja de no hincharse en disolución acuosa, en forma de bolitas de vidrio de poro controlado presenta además una gran superficie específica. Con la utilización de celulosa como soporte se consiguen tiempos de respuesta pequeños cuando se trabaja con disoluciones acuosas pero sin embargo su estabilidad es limitada por su facilidad de degradación bacteriana. De los entrecruzamientos con poliacrilamida y pometacrilamida resultan soportes muy estables pero que se hinchan en agua. Otros soportes utilizados son las membranas de intercambio iónico empleadas en el caso de inmovilización de moléculas cargadas que quedan fijadas en posiciones accesibles al analito, debido a ello los blancos (señal correspondiente al indicador soportado) son mínimos.

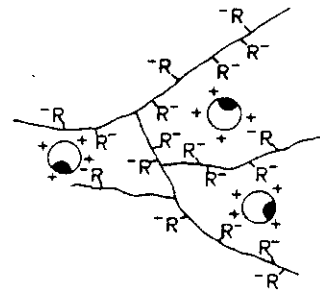
Las superficies activas obtenidas pueden situarse en diferentes posiciones o formas según la configuración del sensor en cuestión. Así, la fase reactiva puede colocarse en el extremo de la fibra óptica (sensores tipo sonda o en flujo, ambos con fibra óptica) o en una célula de flujo que se dispone en el portamuestras del instrumento de medida. (Figura 5)

3.4.3. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN.

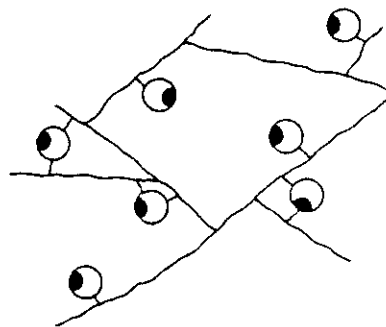
La elección del proceso de inmovilización es crítico en el conjunto de operaciones necesarias para el desarrollo de sensores ópticos. Los métodos más importantes para la preparación de las fases reactivas son: inmovilización mecánica (física), electrostática y covalente (Figura 14). Existen revisiones que cubren todos los aspectos tanto físicos como químicos de gran variedad de reactivos inmovilizados, indicadores, proteínas e incluso células. Los métodos más estudiados son los que involucran la inmovilización de proteínas. Las conclusiones no pueden generalizarse pero sí se puede tener una idea general de los problemas existentes.



Mecánica



Covalente



Electrostática

Figura 14 Tipos de inmovilización.

Inmovilización física. El atrapamiento físico permite una elevada carga de reactivo en la fase sólida pero normalmente ofrece pobres características (gran resistencia) para su utilización en sistemas en flujo. Pueden distinguirse dos tipos: 1) adsorción y 2) la inclusión de la molécula deseada en una red sin posibilidad de desalojo como sucede en el atrapamiento en una matriz de sílice por el procedimiento denominado sol-gel.

Para determinados propósitos es suficiente la **adsorción** sobre una superficie polar del reactivo deseado. Los enlaces formados son interacciones Van der Waals. Es el método más simple y más barato.

Los reactivos pueden ser **confinados** en el interior de cápsulas de solo unos nm de diámetro en el caso de indicadores, aunque normalmente el confinamiento es un método empleado para biomoléculas, ya que el atrapamiento de éstas mantiene una alta actividad enzimática sin variación apreciable de sus propiedades. Un método bastante simple para la inmovilización de indicadores sobre celulosa y materiales relacionados está basado en la creación de una estructura porosa con conexiones internas dentro de un esqueleto de celulosa. La membrana de celulosa se agita en una disolución acuosa de polietilimina o un diaminoalcano de larga cadena quedando el indicador atrapado en el interior de una malla.

El atrapamiento físico de moléculas puede llevarse a cabo en matrices de diferente naturaleza, distintas membranas, geles de poliacrilamida, o en matrices de sílice a temperatura ambiente como en el caso de procedimiento sol-gel. Este método de inmovilización se detalla a continuación por su novedad en la aplicación a sensores químicos de fibra óptica y constituir una de las técnicas de inmovilización empleadas en esta memoria.

Atrapamiento de reactivos por el procedimiento sol-gel. Los recientes avances en la tecnología de la fabricación de cerámica han hecho posible modelar vidrios porosos de sílice a temperatura ambiente según el llamado "proceso sol-gel" (98,99) que consiste en la hidrólisis y posterior condensación de tetraalcoxisilanos en disoluciones hidroalcohólicas.

Gracias a esta técnica es posible "dopar" los vidrios de sílice con compuestos de diversa naturaleza, introduciéndolos junto a los reactivos de polimerización quedando

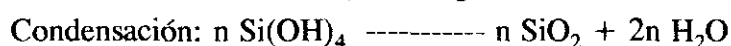
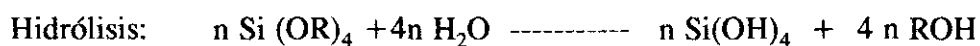
atrapados en las cavidades existentes en el futuro vidrio y al mismo tiempo siendo posible su interacción con especies solubles que accedan a ellos a través de los poros del vidrio. De esta manera es casi generalizada la posibilidad de obtener o fabricar un vidrio apto para determinar especies según nuestras necesidades, sin más que elegir el reactivo adecuado y fabricar un vidrio por el proceso sol-gel con los "ingredientes" adecuados. Algunos grupos de investigación han "atrapado" diferentes reactivos orgánicos en vidrios sol-gel (100-102) y han estudiado sus propiedades fotoquímicas..

El proceso sol-gel es un método atractivo para la inmovilización de (bio)moléculas en matrices de sílice por su preparación a temperatura ambiente, posibilidad de atrapar gran cantidad de reactivo y sencillez. Jhonson y col. (103) en 1971 inmovilizaron tripsina por este procedimiento demostrando su actividad en su nuevo entorno. Braun y colaboradores. (104) han atrapado fosfatas alcalina siguiendo este proceso consiguiendo una biocatalisis estable de la enzima atrapada. Tatsu y col. (105) han inmovilizado por este método glucosa oxidasa para su utilización en un sensor de glucosa.

Todo esto hace que el proceso sol-gel posea un gran potencial para la obtención de fases reactivas de sensores químicos (106-108) sin más que seleccionar los reactivos correctos, puede ser la panacea universal a la hora de diseñar sensores sin más que seleccionar los reactivos correctos. Es preciso además que el soporte obtenido sea funcional, o sea que reaccione con el analito a determinar en un tiempo razonable y esto depende en gran medida de una multitud de parámetros que es necesario controlar en el transcurso del proceso de fabricación del sol-gel (tiempo de envejecimiento, temperatura, etc.).

La obtención de un vidrio por el procedimiento sol-gel implica las siguientes etapas (98)

*- Mezcla: Se produce la hidrólisis y policondensación al mezclar el precursor alcóxido Si(OR)_4 con agua. El tamaño de partícula y el entrecruzamiento entre partículas (densidad) depende tanto del pH como de la relación $R = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{Si(OR)}_4]$.



Si la hidrólisis tiene lugar en medios hidroalcohólicos las reacciones implicadas son más complejas según describen algunos autores (109,110).

*- Gelificación. Las partículas coloidales juntas comienzan a formar una malla tridimensional. La viscosidad aumenta bruscamente y se obtiene un objeto sólido con la misma forma del molde que lo contiene.

*- Envejecimiento: En esta etapa la policondensación continúa; aumenta el espesor de la pared interpartícula y disminuye la porosidad. La fuerza del gel aumenta con el envejecimiento.

*- Secado: El líquido que se encontraba en los poros de la malla es eliminado. En esta etapa se desarrollan fuerzas de capilaridad muy grandes cuando los poros son pequeños (menor de 20 nm).

*- Estabilización química o deshidratación: La eliminación de los grupos silanol de la superficie supone la obtención de un sólido ultraporoso químicamente estable. Este gel poroso fabricado es ópticamente transparente con poros intercomunicados.

*- Densificación: se produce sometiendo el gel poroso a temperaturas altas, puede lograrse una densidad equivalente al cuarzo fundido (eliminando todos los poros). La temperatura de densificación depende de las dimensiones del poro en la malla, la conectividad entre ellos y el área superficial.

La estructura de un gel se establece en el tiempo de gelación; los demás procesos como envejecimiento, secado, estabilización y densificación dependen de la estructura del gel. Las velocidades relativas de hidrólisis y condensación, que ocurren simultáneamente aunque con diferente velocidad, determinan la estructura del gel. Las variables de mayor importancia son temperatura, naturaleza y concentración del electrolito(ácido o base), naturaleza del disolvente y tipo de precursor alcóxido. Es por ello importante conocer cómo actúa cada variable sobre las velocidades de las reacciones de hidrólisis y condensación ya que de ello dependerá la estructura del futuro vidrio puesto que se sabe que una hidrólisis rápida y una condensación lenta favorecen la formación de polímeros lineales mientras que una hidrólisis lenta y una rápida condensación dan lugar a polímeros mayores y más ramificados. De igual manera el tiempo de gelación y la viscosidad del gel

dependen de la temperatura a la que se esté llevando el proceso y de las variables antes mencionadas. Otro parámetro importante a tener en cuenta en la obtención del vidrio poroso es la elección del recipiente empleado, debe evitarse la adhesión del gel al molde para que no existan fuerzas que favorezcan la ruptura del vidrio.

De todo lo expuesto, podemos resumir que antes de lanzarnos a la aventura debemos saber exactamente qué características debe tener el vidrio sol-gel que vamos a fabricar según nuestras necesidades, en nuestro caso para que sea un soporte sólido reactivo y poder utilizarlo como sensor nos interesa una gran área superficial y tamaño de poros adecuados al analito que queramos determinar así como una gran intercomunicación entre dichos poros para que se vea facilitada la reaccionabilidad entre el reactivo "atrapado" en el vidrio sol-gel y el analito a determinar.

La **inmovilización electrostática** es posible cuando la superficie del soporte rígido está provisto de grupos cargados tales como sulfónicos o amonios cuaternarios, el material es capaz de enlazar iones que tenga carga opuesta. (ej poliestireno sulfonado enlaza diversos cationes con distinta fuerza). Este hecho se usa ampliamente para separar aniones o cationes y el enriquecimiento de iones traza. El enlace en la superficie resulta de una interacción electrostática.

Las principales ventajas de esta inmovilización es el fácil procedimiento y su reproducibilidad. La carga de la fase sólida puede ser gobernada por el tiempo de inmovilización. El procedimiento de inmovilización suele ser muy simple, el polímero cargado es sumergido en la disolución del reactivo por un periodo de tiempo definido. Las moléculas indicadoras, se sitúan en sitios en la superficie del polímero por lo que son fácilmente accesible a las especies de interés.

La **inmovilización química** se realiza por formación de un **enlace covalente** del reactivo seleccionado (indicador, enzima, antígeno, anticuerpo o incluso bacterias) en una superficie sólida que debe presentar grupos reactivos, si no es así es necesario un proceso de activación. El enlace covalente puede llevarse a cabo tanto en la superficie del soporte sólido como por entrecruzamiento entre el reactivo (enzimas, proteínas). Si se trata de un indicador el proceso puede ser más complejo y laborioso. La tabla II resume los métodos mas empleados para el enlace covalente de indicadores en soportes de diferente naturaleza.

	Epoxido	Glicidiloxipropiltrimetoxisilano	Carboxilato, aminas tioles, fenoles, alcoholes
	Vinilo	Triacetoxivinilsilano	Nucleófilos fuertes
	Metacrililo	3-metacrioxi-propiltrimetoxi- silano	Nucleófilos fuertes
Acido poliacrí- lico	Carboxietilo $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-Cl}$	SOCl_2 , POCl_3	Aminas, proteínas Alcoholes, aminas, tioles
Poliacrilamida	Carboxietilo	(i) Bases fuertes (ii) Ácidos fuertes	Aminas, proteínas
	Aminas cadena larga	Diamina cadena larga	Ácidos carboxílicos, proteínas
Polietilacrilato	Carboxietilo	(i) Bases fuertes (ii) Ácidos fuertes	aminas, proteínas
Poliestireno^c	Clorometilo	Clorometilación o copolimeri- zación con cloruro de vinil benzoilo.	Aminas, alcoholes, carboxilatos, tioles
	Ión amonio		Especies aniónicas ^d
	Ácido sulfónico	Sulfonación	Especies catiónicas ^e
Copolimero clo- ruro de vinilo, ácido acrílico	Carboxietilo $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-Cl}$	POCl_3	Aminas, proteínas alcoholes, aminas, tioles

a EDC es 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; DCC es dicitohexil carbodiimida.

b Este material puede reaccionar además con glicina para dar un derivado carboximetilado que puede ser acoplado vía amina con grupo espaciador a aminas y proteínas.

c Poliestireno modificado con amina es comercial.

d Soporte de intercambio aniónico

e Soporte de intercambio catiónico.

La inmovilización covalente normalmente modifica drásticamente las características intrínsecas de los reactivos, así pueden observarse pequeñas variaciones espectrales de los reactivos, cambios considerables de los valores de pKa, de constantes de formación de enlaces y de constantes de desactivación de fluorescencia. Los cambios vienen a ser un reflejo de diversos tipos de interacciones, interacciones entre moléculas vecinas del colorante inmovilizado en la superficie del polímero, interacciones entre las moléculas del

reactivo y la superficie del polímero y también efectos electrónicos del enlace covalente formado. En cada caso particular, es preciso por tanto determinar las características del reactivo inmovilizado respecto a las que presenta en disolución.

Existen en bibliografía numerosos estudios sobre la inmovilización de cromóforos tanto por procedimientos de adsorción, enlace covalente y atrapamiento físico (111,112,113). Boisdé ha comparado diversas técnicas de inmovilización (114). En todos los casos es usual la modificación de características tales como el pK_a de los reactivos después de la inmovilización.

La decisión final de la elección del procedimiento de inmovilización de un reactivo determinado depende de varios criterios como la facilidad de la operación, reproducibilidad, coste económico, número de pasos de la reacción y por supuesto la reactividad adecuada de la superficie activa obtenida.

4.- MEDIDA DE LA PROPIEDAD ÓPTICA SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS.

El campo de aplicación de la química analítica se ha ampliado notablemente gracias a la utilización de fases sólidas como herramienta básica en el diseño, desarrollo y aplicación de sensores químicos de naturaleza óptica con o sin fibra óptica. Actualmente además de las reacciones que tradicionalmente tenían lugar en medios acuosos, orgánicos o micelares son objeto de estudio sistemas que necesitan medidas de la radiación sobre superficies sólidas, hecho que está jugando y jugará un papel trascendental en la evolución de este novedoso campo que son los sensores ópticos. Las propiedades susceptibles de ser medidas en fase sólida son principalmente absorbancia, reflectancia y luminiscencia.

4.1.- ABSORBANCIA.

La medida de la absorbancia, que es una de las técnicas más utilizada en el análisis químico tradicional, ha encontrado aplicación también en el campo de los sensores ópticos, si bien, su aplicación se ve restringida por la existencia de otras propiedades susceptibles de ser medidas que ofrecen más ventajas desde el punto de vista analítico (sensibilidad, selectividad etc). La fase reactiva debe ser suficientemente transparente a la radiación para realizar la medida de absorbancia.

El fenómeno está basado, al igual que en disolución, en la absorción de radiación por el analito, el indicador o el producto de reacción entre ambos. De acuerdo con la ley Lambert-Beer existe una relación lineal entre dicha absorbancia y la concentración de la especie de interés analítico:

$$A = \log I_0/I = \epsilon c d$$

ecuación en la que I_0 simboliza la intensidad de la luz incidente, I la intensidad de la luz después de atravesar la muestra, ϵ el coeficiente de absorptividad molar y d la longitud del paso óptico.

En la bibliografía (115) se describen varios tipos de células de flujo para medidas de absorbancia que se reflejan en la Figura 15.

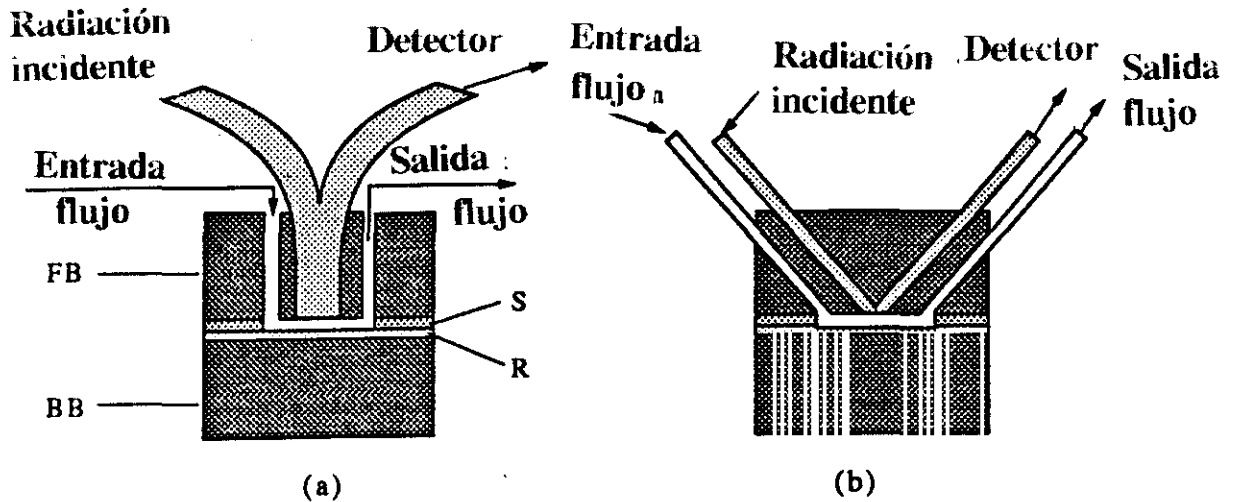


Figura 15: Células de flujo tipo sandwich para medidas de absorbancia (a) la luz "guiada" por una fibra bifurcada incide perpendicularmente en la célula, (b) la luz procedente de un único ramal de fibra óptica incide con un ángulo de 45°. FB: Bloque superior, S: Espaciador, R: Espejo metálico, BB: Bloque inferior.

La medida de absorbancia ha sido utilizado para la determinación de especies que poseen absorción intrínseca en diferentes regiones del espectro, UV (determinación de nitratos en aguas de bebida (116)), IR (determinación de Cu(II) en baños electrolíticos (117)). Otras especies de interés que no presentan dicha absorción característica pueden ser determinadas indirectamente a través de un transductor apropiado.

De la comparación entre las técnicas de medida utilizadas en combinación con sensores ópticos (principalmente sensores de primera generación), sorprende la escasa aplicación de medidas de absorbancia respecto a reflectancia y luminiscencia. Este hecho se debe en primer lugar a que técnicas como las luminiscentes son superiores en cuanto a selectividad y sensibilidad, y en segundo lugar a la absorción intrínseca de la misma fibra óptica que eleva notablemente el nivel de fondo constituyendo una seria interferencia, su eliminación es posible con la utilización de una segunda fibra de referencia. Además las

medidas de absorbancia están sometidas a interferencias de partículas presentes en el paso óptico y por otras especies que absorban a la misma longitud de onda que la especie a determinar.

4.2.- REFLECTANCIA DIFUSA.

Cuando un haz de luz incide sobre una superficie sólida opaca o que transmite la radiación muy débilmente, ocurren dos tipos de reflexiones (118): una reflexión especular (también llamada de Fresnel) y una reflexión difusa. (Figura 16), En la tabla 3 se encuentran resumidas las características de ambas reflexiones.

Tabla 3. Características de reflectancia especular y difusa.

Reflectancia especular	Reflectancia difusa
Reflexión desde una superficie pulida ("front-surface" superficie frontal).	Reflexión desde una superficie mate.
Virtualmente la radiación no penetra en la muestra.	La radiación pasa al interior del material. Existe por tanto refracción (transmisión/absorción), reflexión, difracción y dispersión antes de reemerger en la superficie.
Los ángulos de incidencia y reflexión son iguales. El haz incidente y reflejado están situados en el mismo plano.	La radiación reflejada emerge en todos los ángulos y direcciones desde la superficie.

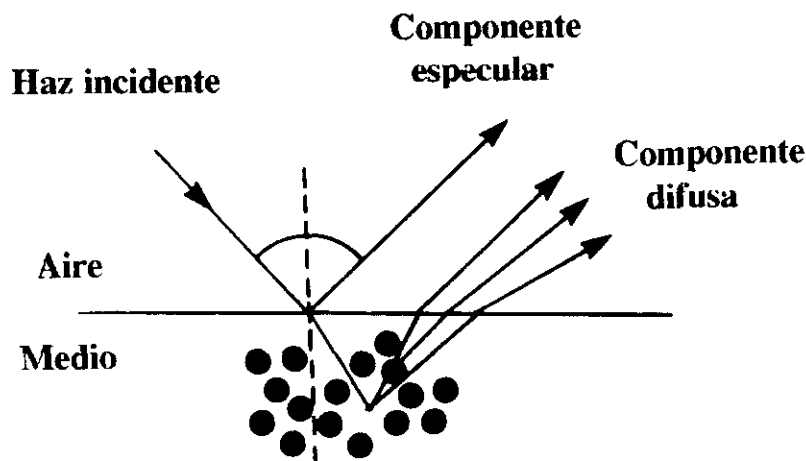


Figura 16: Componentes especular y difusa de reflectancia al incidir un haz de luz en una superficie sólida.

En la reflectancia difusa, la muestra absorbe y refleja la radiación. Así la radiación que emerge desde la superficie contiene información característica de la absorción de la muestra pero también posee una componente de reflexión especular debida a la radiación errática que distorsiona el espectro de reflectancia, por lo que las representaciones de intensidad frente a concentración de analito no son siempre lineales. Cuando la componente de reflexión especular es pequeña el espectro de reflectancia difusa tiene el mismo aspecto que el espectro de transmitancia. Por lo tanto, cuando trabajamos con reflectancia difusa interesa minimizar la componente especular.

La espectroscopía basada en reflectancia difusa es en general una técnica cualitativa o semicuantitativa. Sin embargo, se puede utilizar como técnica cuantitativa si la muestra y la matriz de dilución cumplen ciertos criterios, que proceden de las presunciones asumidas en la ecuación de Kubelka-Munk (119) que pretende asemejar la reflectancia difusa con las medidas de transmitancia a través de un ecuación similar a la ley de Beer. La función de Kubelka-Munk, $F(R)$, responde a la siguiente expresión:

$$F(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{K}{S}$$

donde R es la reflectancia de la muestra, K es el coeficiente de absorción y S el coeficiente de dispersión.

A concentraciones bajas se cumple que:

$$K = 2.303 \varepsilon c$$

donde ε es la absortividad molar de la muestra y c la concentración. Así, $F(R)$ es proporcional a la concentración de muestra.

La ecuación de Kubelka-Munk es válida para muestras débilmente absorbentes y altamente dispersantes. Para que una muestra presente esta relación lineal entre $F(R)$ y su concentración debe cumplir que: a) la muestra esté diluida en una matriz no absorbente, b) el coeficiente de dispersión S , se mantenga constante al variar la longitud de onda y con la

variación de la concentración, c) la contribución de la reflectancia especular sea insignificante y d) la capa dispersora presente un espesor infinito (1-3 mm para partículas finas).

Para evitar las fluctuaciones derivadas de la variación del coeficiente de dispersión, S , con la longitud de onda se utiliza una relación de intensidades de bandas espectrales cercanas, de este modo se mejoran los resultados cuantitativos (120), incluso si la relación se efectúa entre áreas de bandas cercanas en lugar de utilizar intensidades, se consiguen aún mejores resultados (121).

El valor de la reflectancia absoluta se determina utilizando muestras estándar para reflectancia tales como BaSO_4 , pero normalmente debido a las dificultades que plantea su medida no se determina este valor sino el de reflectancia difusa relativa, que es el cociente entre la reflectancia de un estándar que posee una absorptividad nula en las regiones de interés del espectro y la reflectancia, R , de la muestra.

Si bien la teoría más ampliamente aceptada es la de Kubelka-Munk, que asume una única capa donde se produce el fenómeno de reflectancia difusa, otros autores consideran una zona multicapa (122), Willians and Clapper han desarrollado otra ecuación que describe esta situación que es mucho más compleja (123). Al lado de estas dos teorías, existen modelos para relacionar la reflectancia con la concentración. Entre ellos, el modelo Rozemberg (124) se aplica a mezclas de polvos absorbentes y no absorbentes mientras que la teoría de Piltz-Giovanely (125) se utiliza cuando existen partículas dispersoras suspendidas en un medio acuoso absorbente. Estos métodos han sido comparados para varios sistemas modelo (126) y la conclusión fue que para un sistema adsorbente-absorbente tal como una partícula de resina coloreada (por adsorción de un reactivo colorante) la teoría de Kubelka-Munk es la que proporciona los mejores resultados. El caso particular constituido por partículas de colorantes sensibles al pH ha sido objeto de un estudio exhaustivo (127).

El método de reflectancia difusa conlleva las siguientes ventajas: 1) el procedimiento de preparación de muestra es rápido, incluye la trituración de la muestra a polvo, 2) pueden analizarse una amplia variedad de muestras sólidas, polvos o dispersiones sobre superficies sólidas, 3) el método es altamente sensible, siendo útil para

micromuestras 4) no existen cambios polimórficos en la estructura cristalina si la muestra no es triturada.

El espectro resultante variará dramáticamente en apariencia dependiendo de muchos factores, dos de ellos sobre los que el operador tiene control son el tamaño de partícula y la concentración. La obtención de medidas reproducibles de reflectancia difusa requiere gran uniformidad y homogeneidad tanto en el tamaño de partícula como en la disposición de éstas, puesto que ambos afectan a la reflectancia especular y a la dispersión. Se pueden obtener espectros reproducibles triturando la muestra a un tamaño de partícula entre 10-20 micras, en cuanto a la disposición de las partículas en la célula de medida, se recomienda no empaquetar ni nivelar la parte superior de la superficie en contacto con la radiación.

La naturaleza de la muestra afecta drásticamente a la señal analítica y en general pueden distinguirse los siguientes casos:

1) Si la muestra es uniforme y muy absorbente la mayor parte de la radiación será absorbida y el resto será reflejada especularmente.

2) Si la muestra es pulverulenta o posee una superficie irregular, la radiación incidente puede penetrar dentro de la superficie. Una fracción de esta radiación será transmitida a través de las partículas y otra reflejada por las mismas. El espectro obtenido será una combinación de reflectancia especular y transmitancia. La proporción de estas componentes en el espectro final varía en función de la naturaleza de la muestra.

3) Cuando la muestra pulverulenta posee un tamaño de partícula adecuadamente pequeña y está mezclada con una matriz altamente dispersiva ocurre poca reflexión desde la superficie frontal, puesto que la mayor parte de la radiación es transmitida dentro de la capa superficial. En este caso se puede considerar que la radiación es transmitida a través de las partículas de la matriz que no absorben a lo largo de un amplio intervalo de diferentes caminos ópticos. Sin embargo, también estará presente una pequeña componente especular. Generalmente a mayor dilución de la muestra en la matriz, menor componente especular, y así quedará un espectro lo más parecido posible a uno de transmitancia.

La espectroscopía de reflectancia difusa no está restringida a la región Visible del espectro, puede ser utilizada en NIR, y IR también preferentemente en combinación con

los métodos de transformada de Fourier (FTIR) (128-130). La técnica se puede aplicar a la mayor parte de sólidos (muestras pulverulentas, cristalinas, superficies rugosas, etc), sin preparación previa de la muestra evitando la manipulación y disminuyendo el tiempo de análisis.

El número de publicaciones sobre sensores ópticos basados en la medida de reflectancia es muy elevado respecto a los de absorbancia, existiendo varias razones para dicha popularidad: a) la medida de reflectancia puede ser aplicada a materiales ópticamente no transparentes, incluso no homogéneos, y a materiales opacos en los que la absorbancia daría un alto nivel de fondo y b) la reflectancia permite utilizar varios parámetros para su medida tales como intensidad, distribución angular y polarización de la radiación.

Por otra parte, la relación entre la señal óptica y el analito es más compleja, la instrumentación puede ser más cara a veces y la reproducibilidad de los datos depende asimismo de la reproducibilidad en la fabricación de la fase sólida.

4.3. LUMINISCENCIA.

Los estudios de luminiscencia sobre fase sólida se llevan a cabo con distintos fines, los cuales se encuentran resumidos en la tabla 4, en dicha tabla nos encontramos, desde el empleo de sensores luminiscentes cuando se dispone de pequeños volúmenes de muestra o de reactivo (del orden de microlitros), al análisis rápido cualitativo o a la protección de un analito de posibles desactivadores para la medida de su fosforescencia.

Tabla 4. Aplicaciones de la luminiscencia sobre sólidos.

Estudios de luminiscencia sobre superficies sólidas.
1.- Sensores luminiscentes (alta sensibilidad y selectividad, volúmenes de μl).
2.- Combinación de métodos de separación-luminiscencia (ej. cromatografía en capa fina-fluorescencia, cromatografía en capa fina-fosforescencia, electroforesis-fluorescencia).
3.- Estudio rápido de múltiples muestras (ej. cromatografía en capa fina/electroforesis-luminiscencia)
4.- Luminiscencia sensibilizada (ej. transferencia de energía entre moléculas adsorbidas).
5.- Utilización analítica de reactivos bioquímicos inmovilizados (ej. inmunoensayos en fase sólida).
6.- Protección de moléculas luminiscentes de interacciones no deseadas (desactivación) (ej. fosforescencia a temperatura ambiente).

Miller (131) ha revisado las aplicaciones de las técnicas sobre superficies sólidas en áreas tales como fosforescencia a temperatura ambiente, fluoroinmunoensayos, cromatografía de capa fina, sensores luminiscentes etc.

Las ecuaciones que relacionan la señal luminiscente y la concentración de analito (para utilización en análisis cuantitativo) son más complejas en el análisis de luminiscencia sobre superficies sólidas que en el trabajo con disoluciones diluidas puesto que las moléculas de luminóforo se encuentran inmovilizadas sobre pequeñas partículas y éstas junto a la matriz sólida causan la dispersión de la radiación procedente de la fuente así como de la propia radiación de emisión luminiscente (132). Los numerosos tratamientos teóricos existentes (118,133,134) hacen suposiciones drásticas incluso no realistas sobre la naturaleza del medio sólido y condiciones ópticas.

La mayoría de los modelos, afortunadamente, coinciden en la predicción de que la intensidad de luminiscencia aumentará linealmente con la concentración del analito. Esta afirmación se cumple siempre y cuando el analito esté presente a bajos niveles de concentración.

Si bien es factible la realización de medidas de fosforescencia, quimioluminiscencia o bioluminiscencia con optrodos, la fluorescencia ha sido, sin duda, la técnica luminiscente más empleada. Estas técnicas generalmente son más sensibles y más selectivas que la fotometría.

Es preciso diferenciar tres casos: 1) el analito es el luminóforo, 2) las propiedades luminóforas del reactivo indicador varían como resultado de la interacción del mismo en estado fundamental con el analito y 3) las propiedades luminiscentes del reactivo disminuyen debido a la interacción del mismo en estado excitado con el analito (desactivación dinámica).

Las técnicas luminiscentes se basan en la medida de intensidad de luminiscencia, tiempo de vida del luminóforo o polarización de la radiación. Las dos primeras son las más utilizadas en combinación con sensores de naturaleza óptica.

Intensidad de luminiscencia. La relación entre la intensidad y la concentración del analito viene expresada por la siguiente ecuación según ha demostrado (135):

$$I = 2.3 I_0 \Phi \epsilon c l K \left(1 - \frac{2.3 \epsilon c l}{2!} + \frac{(2.3 \epsilon c l)^2}{3!} - \dots \right)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz de excitación, ϵ el coeficiente de absorptividad molar a la longitud de onda de excitación, Φ el rendimiento cuántico de luminiscencia, l el paso óptico, K es un factor que considera cuestiones geométricas del instrumento y tiene en cuenta que sólo una fracción de la emisión total de la radiación es observada.

Para disoluciones débilmente absorbentes en las que $\epsilon c l < 0.05$, la ecuación anterior puede simplificarse

$$I = 2.3 I_0 \Phi \epsilon c l K$$

Por otro lado y respecto a los analitos que desactivan la fluorescencia y/o fosforescencia de muchos ligandos como es el caso del oxígeno, su comportamiento de desactivador obedece a la ecuación de Stern-Volmer (136):

$$I_0/I = 1 + K_{SV} pO_2$$

en donde, I_0 e I son las intensidades de emisión en ausencia y en presencia del desactivador respectivamente, y K_{SV} la denominada constante de Stern-Volmer que es igual al producto de la constante de velocidad de desactivación bimolecular difusional (K_d) por el tiempo de vida del indicador en ausencia del desactivador (τ_0). El valor de K_d y por tanto K_{SV} depende de la naturaleza y viscosidad del disolvente, de la temperatura y de la naturaleza del luminóforo. Aunque la ecuación predice una relación lineal entre I_0/I y pO_2 , cuando el indicador se encuentra soportado en una fase heterogénea, se comprueba que se obtienen desviaciones de la linealidad a pO_2 superiores generalmente a 200 torr debida sin lugar a dudas a la diferente accesibilidad para el oxígeno de las moléculas de luminóforo inmovilizado habiendo sido desactivadas la mayoría de los fluoróforos accesibles al aumentar la concentración del desactivador.

Tiempo de vida. Es el tiempo medio que las moléculas residen en el estado excitado. El tiempo de vida se obtiene como valor medio de un número de moléculas estadísticamente significativo. En el caso de decaimiento exponencial el tiempo de vida τ se define como el tiempo en el que sólo un 37% aproximadamente de la población inicial aún existe en el estado excitado. Los tiempos de vida típicos de fluoróforos varían entre 2-20 ns, los tiempos de vida en fosforescencia son mayores, del orden de 1 μ s - 10 s.

Los sensores de naturaleza óptica basados en medidas de tiempo de vida son útiles si el analito afecta al tiempo de vida del indicador o afecta el valor del tiempo de vida de otra molécula en un sistema de transferencia de energía. De acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer la relación entre el tiempo de vida en ausencia (τ_0) y presencia de desactivadores (τ) viene dada por:

$$\tau_0/\tau = 1 + K_{sv} \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q]$$

en la que existe relación lineal entre la concentración de desactivador [Q] y τ_0/τ .

Las técnicas que se basan en medidas de tiempos de vida presentan muchas ventajas sobre las basadas en medidas de intensidad porque: 1) τ es independiente de la concentración de luminóforo por lo que la variación de su concentración (por fotodescomposición o "salida" de la fase reactiva) no afecta a la señal analítica, 2) las fluctuaciones de la intensidad de radiación y sensibilidad del detector no influyen ya que el tiempo de vida es independiente de la intensidad de la fuente y del fotodetector, 3) se ha convertido en un campo muy prometedor en combinación con sensores de fibra óptica debido a que la utilización de fibras de longitud mayor a 1Km no produce pérdida de precisión para analitos con tiempos de vida > 1 ns. (137).

Transferencia de energía. Se basa en que una molécula excitada (donante) puede transferir su energía electrónica a otra especie (aceptor) (138). Este proceso llamado transferencia de energía ocurre por la interacción dipolo-dipolo entre donante y aceptor. La velocidad del proceso depende del rendimiento cuántico de fluorescencia del donante, solapamiento del espectro de emisión del donante y espectro de absorción del aceptor y la distancia y orientación relativa entre dichas moléculas.

La transferencia de energía no es un proceso difusional. Lakowicz (139) describe con detalle el fenómeno, extrayendo parámetros físicos de datos experimentales. Una consecuencia para sensores ópticos es que la distancia donante-aceptor en sensores basados en indicadores inmovilizados debe ser constante (ej enlace covalente donante o aceptor con grupos espaciadores).

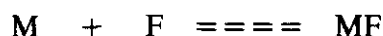
En la bibliografía se encuentran descritos algunos sensores basados en estos fundamentos, así se ha desarrollado un sensor de pH que utiliza eosina inmovilizado como donante y rojo fenol de aceptor (140-142). Un ejemplo del segundo caso es un sensor para O₂ (143) y SO₂ (144) basado en la desactivación del estado excitado por transferencia de energía de un aceptor fluorescente cuya fluorescencia se ve modificada por la desactivación directa por el analito del donante.

Basándose en la dependencia de la eficiencia del proceso de transferencia de energía con la distancia donante-aceptor, se ha desarrollado un sensor para glucosa (145) que utiliza fluoresceína como donante y rodamina como aceptor. La distancia entre ambos fluoróforos varía en un sistema cerrado según varía la concentración de glucosa. De igual manera la distancia entre fluoróforos varía con la fuerza iónica (146). Basándose en este hecho Hirschfeld tiene patentada una aplicación (142).

El potencial analítico de sensores basados en procesos de transferencia de energía es un aumento de la sensibilidad (luminiscencia sensibilizada) mediante la combinación de indicadores absorbentes y fluorimétricos, o bien indicadores fluorimétricos con rendimientos cuánticos muy diferentes. Otra opción es la combinación de medidas de tiempo de vida con procesos de transferencia de energía lo que redundaría en una mejora del sensor respecto a la estabilidad a largo plazo.

FLUORESCENCIA

Si un ligando fluorescente F inmovilizado en un soporte sólido se pone en contacto con una disolución que contiene un ión metálico M, éste se unirá con el ligando estableciéndose el equilibrio:



Si las características fluorescentes de MF difieren de las de F, las cantidades relativas de MF y F pueden ser determinadas por las medidas de fluorescencia.

Son muchos los ligandos fluorogénicos inmovilizados presentes en la bibliografía utilizados para determinar iones metálicos. En principio cualquiera de estos reactivos puede ser inmovilizado para formar un sensor. El reactivo inmovilizado preconcentra el ión metálico en el paso óptico, por consiguiente aumenta la sensibilidad, también debido a esta configuración las interferencias ópticas tales como efectos pre y postfiltro asociados a fenómenos de absorbancia de la muestra se reducen notablemente e incluso también se mejora la señal de fondo causada por la fluorescencia de la matriz. La selectividad sin embargo, está limitada por la selectividad del ligando elegido para el ión metálico de interés.

La extensión de la asociación del ión metálico con el ligando inmovilizado depende de la constante de formación del complejo en fase sólida. Si se forma un complejo 1:1 la constante de formación del complejo se puede representar según la siguiente ecuación:

$$K_e = \frac{X_{MF}}{X_F [M]} \quad [1]$$

donde X_F y X_{MF} representan el número de moles de ligando inmovilizado no asociado al metal y asociado al metal respectivamente, $[M]$ es la concentración del ión metálico en disolución y K_e es la constante de equilibrio. El número de moles totales de ligando inmovilizado (C_F) viene dado por:

$$C_F = X_F + X_{MF} \quad [2]$$

La señal de fluorescencia dependerá de la cantidad relativa de F y MF:

$$I_F = K_F X_F + K_{MF} X_{MF} \quad [3]$$

I_F es la intensidad de fluorescencia y K_F y K_{MF} son constantes de proporcionalidad que relacionan la intensidad de fluorescencia con las cantidades de ligando libre y asociado respectivamente, asumiendo que la capa de reactivo no absorbe radiación de la fuente en

una extensión significativa. Sustituyendo la ecuación [2] en la [1] y reorganizando obtenemos:

$$X_F = \frac{1}{1 + [M]K_e} C_F \quad [4]$$

$$X_{MF} = \frac{[M]K_e}{1 + [M]K_e} C_F \quad [5]$$

Sustituyendo estas expresiones en [3] se obtiene la siguiente expresión:

$$I_F = K_F \frac{1}{1 + [M]K_e} C_F + K_{MF} \frac{[M]K_e}{1 + [M]K_e} C_F \quad [6]$$

Si consideramos que la concentración inicial de ión metálico es $[M]_i$ y que ésta disminuye porque el ión metálico es extraído desde la fase acuosa hacia la fase sólida reactiva para formar el complejo inmovilizado, tenemos que:

$$[M] = [M]_i - (X_{MF}/V) \quad [7]$$

donde V es el volumen de muestra.

Si la fase reactiva absorbe radiación es preciso añadir otro término obteniéndose las ecuaciones [8] y [9].

$$I_F = (K_F X_F + K_{MF} X_{MF}) (1 - 10^{-A}) / 2.303A \quad [8]$$

donde A es la absorbancia de la fase reactiva. Tanto el ligando libre como el asociado pueden contribuir a la absorbancia total, entonces:

$$A = a_F X_F + a_{MF} X_{MF} \quad [9]$$

donde a_F y a_{MF} son las absorptividades para el ligando libre y complejado respectivamente. Si a_F y a_{MF} son diferentes, el término que contiene la absorbancia variará según la cantidad

relativa de ligando libre y asociado y tendrá influencia en la variación de intensidad de fluorescencia con la concentración de ión metálico.

La ordenación de las ecuaciones [8] y [9] conduce a una expresión semejante a [6] pero más compleja que relaciona I_F con la concentración inicial de metal, con el volumen de muestra y con el número de moles de reactivo inmovilizado.

En la expresión simplificada [6], si el ligando por sí solo no es fluorescente pero sí lo es el complejo con el ión metálico, el primer término se anula y en este caso la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de ión metálico a concentraciones bajas puesto que a concentraciones relativamente altas la respuesta deja de ser lineal alcanzándose un valor límite cuando todas las moléculas de ligando están asociadas a iones metálicos. La figura 17, muestra este comportamiento y representa la fluorescencia relativa frente a la concentración de metal en términos de K_e , cuando la intensidad de fluorescencia alcanza la mitad del valor límite, $K_e = 1/[M]$, lo que es extremadamente útil para estimar el valor de K_e .

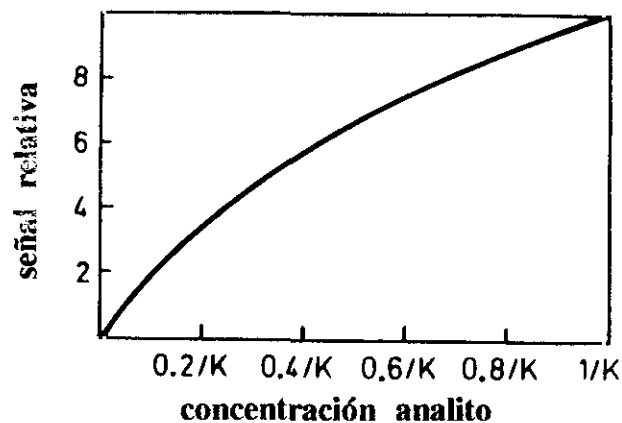


Figura 17: Relación entre la intensidad relativa de fluorescencia, constante de equilibrio y concentración de analito cuando el reactivo forma un complejo fluorescente con el analito.

La expresión [6] siempre que el primer término se anule puede organizarse como sigue:

$$\frac{[M]}{I_F} = \frac{[M]}{K_{MF}C_F} + \frac{1}{K_{MF}C_F K_e} \quad [10]$$

La representación de $[M]/I_F$ frente a $[M]$ será una recta cuya pendiente vendrá dada por $1/K_{MF}C_F$ y su ordenada en el origen será $1/K_{MF}C_FK_e$.

En el intervalo de respuesta lineal donde $[M]K_e \ll 1$ y $X_{MF} \ll X_F$ la fracción total de ión metálico extraído por la fase reactiva puede ser calculada como sigue:

$$\frac{\text{Cantidad de metal en fase reactiva}}{\text{Cantidad de metal en muestra}} = \frac{X_{MF}}{[M]V} = \frac{K_e C_F}{V} \quad [11]$$

Esta expresión se obtiene al despejar $X_{MF}/[M]$ de la ecuación [1] y asumir que $C_F = X_F$. Con esta ecuación se puede determinar si un sistema particular está actuando como un sensor sin extraer una cantidad apreciable de metal de la muestra o no. También hace notar como la fracción de metal extraído depende tanto del número de moles de ligando inmovilizado como del volumen de disolución.

En el caso de que el ligando inmovilizado sea fluorescente pero el complejo que forma con el ión metálico no lo sea, el segundo término de la ecuación [6] se anula por lo que la intensidad de fluorescencia decrece según se aumenta la concentración de ión metálico. En la Figura 18 aparece la respuesta teórica en este caso, la concentración de metal viene expresada en términos de K_e . Esta clase de sistemas presentan un intervalo dinámico limitado; sin embargo es el único camino para el diseño de sistemas que respondan a iones metálicos desactivadores de fluorescencia.

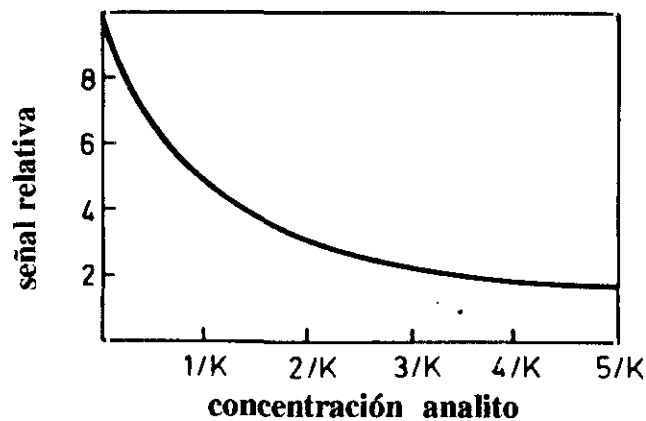


Figura 18: Relación entre la intensidad de fluorescencia, constante de equilibrio y concentración de analito cuando existe desactivación estática de la fluorescencia

Algunos reactivos fluorogénicos para iones metálicos forman complejos 2:1 en disolución, lo que puede suceder igualmente en la fase sólida reactiva. Este caso es más difícil de tratar teóricamente. En la ecuación [1] para la formación de complejos 1:1 se ha asumido la igualdad de los factores de actividad del ligando libre y del complejo en la fase sólida por lo que estos se anularían, sin embargo en el caso de la formación de un complejo de estequiometría 2:1 estos factores no se anularían ya que la expresión para el ligando estaría elevado al cuadrado.

La mayor dificultad al tratar los complejos 2:1 en fase sólida es que los factores estéricos juegan un papel prioritario en cuanto a la estabilidad de dicho complejo y estos no son homogéneos en toda la fase sólida sino que varían en gran manera de un sitio a otro en la fase reactiva. Aún siendo más complejas las expresiones obtenidas para estos complejos, los resultados son similares al caso de formación de complejo de estequiometría 1:1.

FOSFORESCENCIA

Dado que la fosforescencia se ve favorecida con la rigidez del sistema en el que se encuentra el luminóforo, podemos afirmar que si éste se sitúa en una fase sólida estará en condiciones de máxima rigidez y por ello el análisis de luminiscencia sobre superficies sólidas es especialmente útil en el caso de medidas de fosforescencia pudiéndose detectar fosforescencia a temperatura ambiente en estas condiciones. Vo-Dhin (147) y Hurtubise (148) han revisado la influencia de diversas variables experimentales sobre la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) sobre sólidos tales como naturaleza de los disolventes, volumen de muestra, luminiscencia de fondo, variación de las propiedades de sustratos sólidos similares, descomposición de la muestra, contaminación debida a los portamuestras etc. y profundizan en el estudio de las interacciones existentes en RTP en sólidos y la aplicación de esta técnica a importantes áreas de analíticas

Los disolventes influyen drásticamente en RTP en sólidos, algunas consideraciones generales de interés en su elección son la solubilidad del luminóforo, la compatibilidad química entre el disolvente y el sustrato sólido, y la pureza del disolvente. El disolvente más utilizado en trabajos de RTP en sólidos ha sido el etanol.

Las ecuaciones que relacionan la intensidad de fosforescencia y la concentración de analito son las mismas que en el caso de fluorescencia.

Schulman y Parker (149) fueron los primeros en estudiar los efectos de oxígeno y la naturaleza de las interacciones entre luminóforo y soporte. De sus estudios resultó que los enlaces de hidrógeno del fosforóforo al soporte fue un factor importante para prevenir la desactivación por colisión del estado excitado y que la matriz de la muestra resistía la penetración y esfuerzo de desactivación del oxígeno.

La luminiscencia de fondo procedente de la matriz sólida puede contribuir a lecturas erróneas tanto en la fluorescencia como en la fosforescencia a temperatura ambiente, es por ello que han sido muchos y muy variados los tratamientos utilizados para intentar su eliminación. Se han sugerido algunos tratamientos para la eliminación de impurezas del soporte sólido previamente a la absorción del luminóforo sobre él, otros aconsejan tratamientos a diferentes temperatura, elución con disolventes de diferentes polaridades o irradiación a diferentes longitudes de onda, tratamientos todos ellos aplicados al soporte sólido previa inmovilización del luminóforo. El soporte más apropiado para este tipo de medidas es el papel de celulosa (150)

La presencia de tensioactivos afecta a la fosforescencia de diversos hidrocarburos aromáticos situados en papel de filtro (151). La presencia de tensioactivos catiónicos produce un incremento de la intensidad de fosforescencia mientras que la fosforescencia era desactivada en presencia de tensioactivos aniónicos.

La fosforescencia sobre superficies sólidas es una técnica que está en constante crecimiento en su campo de aplicaciones, así existen descritos métodos para detección de trazas de varios compuestos orgánicos como productos farmaceuticos (152,153), pesticidas (154,155), hidrocarburos aromáticos (156-158), y drogas (159,160) entre otros. Vo-Dhin ha desarrollado un dosímetro personal para la detección de hidrocarburos polinucleares aromáticos (pireno, fenantreno...)(161). El dosímetro es del tamaño de un bolígrafo y la detección de los contaminantes se basa en la difusión molecular de éstos hacia el sustrato que es papel y su posterior detección directa por RTP. Con este dispositivo se han detectado niveles de ng/ml de estos contaminantes tras 1 hora de exposición.

5. PARÁMETROS DE CALIDAD Y CAMPOS DE APLICACIÓN DE LOS SENSORES ÓPTICOS.

Los principales factores que definen la **calidad de un sensor** son sensibilidad, selectividad, estabilidad, reversibilidad y tiempo de respuesta. En sensores de primera generación en los que la fibra óptica es solo el medio material por el que se guía la transmisión de la radiación las propiedades y características de funcionamiento vienen condicionadas por la especie o proceso que se estudie.

En los sensores que implican la existencia de fases heterogéneas la valoración de estos parámetros de calidad es más compleja puesto que al resultado final contribuye cada una de las partes que componen la fase reactiva (indicador, soporte etc.).

La **sensibilidad** de un sensor óptico viene determinada por la propiedad óptica medida (absorbancia, reflectancia, luminiscencia..) característica del reactivo empleado, método de inmovilización y diseño específico del sensor.

En general los sensores basados en medidas de luminiscencia son más sensibles que los colorimétricos. Las características intrínsecas del reactivo pueden verse modificadas una vez en fase sólida respecto a las que presenta en disolución, ej actividad enzimática, pH óptimo de funcionamiento, efecto de la fuerza iónica, pK de los indicadores. En muchas ocasiones se tiene, al inmovilizar el reactivo, la posibilidad de preconcentración de la muestra sobre la fase sólida. Por otro lado la luminiscencia a veces se refuerza por la mayor rigidez del sistema sólido.

La **selectividad** del sensor depende en primer lugar de las propiedades del reactivo elegido aumentando la misma con reactivos de origen biológico, de la propiedad medida, (la luminiscencia es más selectiva que la colorimetría porque existen menos elementos que la posean). Por último, también juega un papel importante el soporte seleccionado, así existen membranas que permiten el paso selectivo del analito a la fase reactiva.

El tipo de interacción entre el analito y la fase reactiva es el principal factor para la reversibilidad del optrodo. Reversibles son los de pH y desactivación dinámica. El resto de sensores pueden ser regenerables.

El **tiempo de respuesta** es un parámetro crítico para optimizar en la construcción del sensor. Un factor a tener en cuenta en el diseño del sensor es la cinética de la reacción que es una característica intrínseca de la reacción seleccionada. El factor limitante viene determinado por la transferencia de materia (etapa necesaria por encontrarse el reactivo y el analito en diferentes fases) desde la disolución a la fase sólida. Existen varios criterios para la determinación del tiempo de respuesta, los más generalizados son el tiempo en que el sensor alcanza el 66 o el 90 % del valor total de la respuesta.

La **estabilidad** del sensor es un requisito para el buen funcionamiento de cualquier sensor. Depende de las características del reactivo y del soporte seleccionado.

El **tiempo de vida del sensor** está relacionado con la estabilidad del mismo pues si el reactivo es estable en fase sólida y se mantienen sus características, el tiempo de vida será largo. Esta característica es imprescindible para la comercialización de los sensores. Para determinar el tiempo de vida del mismo es preciso prever las condiciones más drásticas aunque la conservación adecuada se lleve a cabo en determinadas condiciones.

La **reproducibilidad** en la **construcción** del sensor viene determinado principalmente por las características del soporte sólido, pues es bien sabido que la variación de lote a lote de un mismo soporte proporciona diferentes características de las fase sólidas obtenidas.

Las **áreas** en que han encontrado mayor **aplicación** los sensores de fibra óptica incluyen control de procesos industriales (162-166), biotecnología (35, 167-169), medicina (170-172) y contaminación ambiental (173-175), generalmente todos aquellos en los que se requiere un seguimiento continuo de determinados parámetros (que pueden fluctuar en un intervalo conocido) para garantizar la calidad del proceso y del producto.

Las especificaciones que deben cumplir los sensores químicos de fibra óptica, para su utilización industrial, depende en gran parte del área de aplicación concreta, aunque generalmente se requiere en todas ellas tiempos de respuesta mínimos, sensibilidad y

selectividad adecuada, miniaturización, bajo coste y fiabilidad. En el caso particular de la aplicación en (bio)química clínica se requiere además (bio)compatibilidad entre los materiales utilizados y los tejidos o fluidos biológicos cuando se trata de determinaciones "in vivo". En muchos procesos industriales es interesante aplicar estos dispositivos puesto que su tenacidad y posibilidad de transmisión de la señal a larga distancia posibilita las medidas en zonas peligrosas o innacesibles de manera que la muestra a analizar no se traslada al laboratorio sino que se intenta llevar el laboratorio a la muestra (medidas "in situ").

Es preciso diferenciar dos **tipos de medidas** en tales áreas: *diagnóstico* y *monitorización*, el objetivo de la primera es evaluar, definir y describir, en definitiva caracterizar el comportamiento de un sistema, el de la segunda es observar el comportamiento (dentro de unos márgenes) de un sistema que ya ha sido previamente caracterizado. Las medidas para efectuar un diagnóstico conllevan la determinación de especies, sus fuentes de procedencia y su toxicidad y se enfrentan a composiciones desconocidas por lo que estas determinaciones requieren una selección representativa de la muestra, largo tiempo de análisis y alto coste de analistas para operar en estos sistemas. Por otra parte hacer un seguimiento de una especie determinada requiere efectuar medidas repetitivas y frecuentes de un sistema cuya composición está perfectamente delimitada, posibilitando por ello procesos simples y a precios razonables pues no se necesitan analistas altamente cualificados.

El momento actual está marcado por una lenta pero continua invasión de los métodos de seguimiento frente a los de diagnóstico (determinaciones discretas con valores exactos de los parámetros de calidad) en cuestiones de control de calidad favorecida sin duda por la posibilidad de evaluación en base a la continua información registrada en la monitorización frente a la inferencia estadística con los métodos de diagnosis pues sus datos no son obtenidos a tiempo real. Este supone un campo de aplicación ideal para los sensores dada su posibilidad de medidas en tiempo real y posibilidad de funcionamiento on-line en la línea de producción.

Los sensores químicos de fibra óptica posibilitan la realización de determinaciones "in situ", y ofrecen la tecnología necesaria para realizar medidas repetitivas automáticamente en número elevado a un precio razonable. Un sistema de seguimiento

ideal debe posibilitar la determinación "in situ" de las especies de interés en la mínima concentración posible.

Los sensores químicos ópticos de primera generación pueden aplicarse en todas aquellas situaciones donde el análisis óptico se realiza a una cierta distancia sin más que la utilización de una fibra óptica como guía de la radiación. Existen con tal motivo instrumentos comerciales para la adquisición de datos en la región UV-Vis a larga distancia (Oriel, Photonetics, Guided Wave) que facilitan su utilización en áreas radiactivas, o sometidas a alto voltaje, sistemas de fermentación, y en general zonas peligrosas, así como en el control de procesos industriales. En la tabla 5 aparecen algunas aplicaciones interesantes de este tipo de sensores.

Tabla 5. Algunas aplicaciones industriales de sensores ópticos.

Analito/aplicación	Método	Ref
Metano e hidrocarburos relacionados	Medida de absorción en NIR en la región 1.34 - 1.66 micrometros	(176-179)
NO ₂	Absorción de NO ₂ a 496 nm medida con 20 y 500 m de fibra, utilizando una célula de absorción al final de la fibra doble.	(180)
CO ₂	Medida de absorción IR a 4.9 micrometros con fibra óptica	(181)
Uranio/plutonio	Absorbancia a múltiples longitudes de onda con fibra óptica	(182)
Etanol, glucosa, fructosa	Espectroscopía Raman con laser y multivariate, least-square analisis	(183)
NADH en cultivos biológicos	Sensor de fluorescencia para NADH, su concentración está relacionada con otros parámetros en la fermentación	(184)
Mezcla de líquidos	Análisis de mezclas CHCl ₃ /CH ₂ Cl ₂ por espectroscopía Raman con láser	(185)
Seguimiento de un proceso de polimerización	Medida de la fluorescencia de un polímero cuya fluorescencia se incrementa con la polimerización	(186,187)
Análisis de la calidad de fuel	Absorbancia en NIR	(188)
Fenoles en groundwater	Detección de la fluorescencia intrínseca de fenoles	(189)

6. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE SENSORES ÓPTICOS PARA pH, HIERRO Y ALUMINIO

Durante los últimos diez años los sensores ópticos con o sin empleo de fibra óptica han experimentado un gran desarrollo. La revisión bibliográfica efectuada en esta memoria se ha llevado a cabo sobre los tres analitos que son objeto de interés en la misma, pH, hierro y aluminio, haciendo mención a aquellos dispositivos tanto en flujo como flujo que emplean reactivos inmovilizados como fase reactiva.

6.1. DETERMINACIÓN DE pH

La mayoría de los sensores químicos para pH descritos hasta la fecha están basados en los cambios de propiedades ópticas de una fase sensible al pH. La fase reactiva puede estar unida al extremo de una fibra óptica que sirve de guía del cambio óptico detectado o situada en una célula de un detector convencional. Normalmente esta superficie reactiva contiene un indicador ácido-base que reacciona reversiblemente con los protones de la muestra. Los sensores de pH más utilizados hasta la fecha se basan en medidas de absorbancia, o fluorescencia. Los sensores de reflectancia o absorbancia utilizan indicadores ácido-base colorimétricos, mientras que los de fluorescencia utilizan indicadores ácido-base luminiscentes. En ambos casos la variación de pH produce un cambio en las propiedades del indicador inmovilizado.

Los sensores de pH aparte de su interés en sí mismos para el seguimiento de este parámetro crítico en muchos procesos industriales, en análisis bioquímico o industria alimenticia, han contribuido a la ampliación en la aplicación de los sensores químicos de naturaleza óptica puesto que pueden actuar como transductores para ciertos analitos como CO_2 , NH_3 o en biosensores en los que se producen protones por la reacción de determinadas enzimas. De esta manera los sensores para pH han desempeñado un papel de suma importancia en el desarrollo de los sensores ópticos más complicados (sensores de tercera generación).

6.1.1. SENSORES DE pH TIPO SONDA

El primer sensor químico de fibra óptica para pH fue desarrollado por Peterson (190). La fase sensible, que consiste en microesferas de poliacrilamida con el indicador rojo fenol inmovilizado covalentemente, se dispone en un tubo de diálisis permeable a los protones que se sitúa al final de un par de fibras ópticas. Los cambios de absorbancia en función del pH son recogidos por la fibra óptica. El intervalo de trabajo del sensor es más bien estrecho pH 7.0 - 7.4, pero muy útil para muestras fisiológicas. La precisión obtenida con este sensor es de 0.01 unidades de pH. Tanto la variación de fuerza iónica como de la temperatura afectan la respuesta del sensor. Markle y colaboradores (191) han mejorado este mismo sensor aumentando la precisión del mismo hasta 0.001 unidades de pH y rebajando el tiempo de respuesta lo que amplía su utilización práctica. Este mismo sensor miniaturizado se ha aplicado (192) a la determinación de pH "in vivo" en sangre confirmando la buena correlación entre los datos obtenidos con el sensor de fibra óptica y un minielectrodo de vidrio.

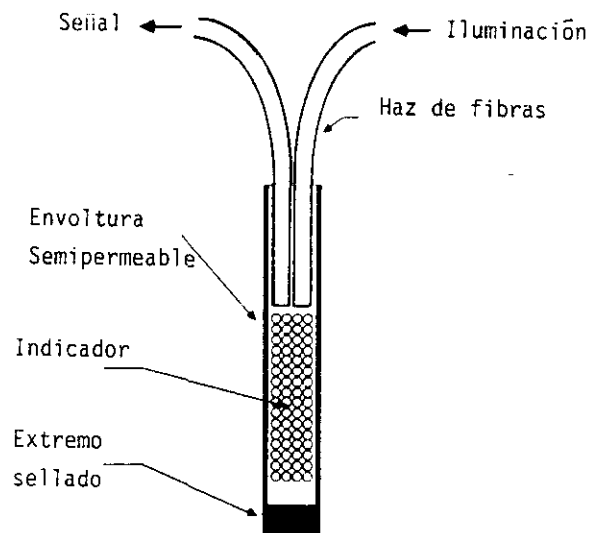


Figura 19: Sensor para la medida de pH desarrollado por Peterson (190)

Kirkbright y colaboradores (193) describen un sensor de reflectancia que utiliza como fase sensible el indicador azul de bromotimol adsorbido sobre un polímero estireno-divinilbenceno (194). La fase sólida se dispone al final de una fibra óptica bifurcada y queda retenida gracias a una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE). La respuesta del sensor abarca de pH 7 - 9. y se ve afectada tanto por la presencia de partículas sólidas en suspensión como por variaciones de fuerza iónica o temperatura. El tiempo de respuesta para alcanzar el 63% de la señal es de 65 seg.

Otro sensor basado en medidas de reflectancia ha sido descrito por Moreno y colaboradores (195,196). En este caso el indicador utilizado es el rojo cresol inmovilizado sobre el intercambiador aniónico Dowex 1X10. El sensor demostró poseer dos intervalos de trabajo, uno de ellos a gran acidez 0.025M - 0.6 M en ácido clorhídrico y otro en el intervalo de pH comprendido entre 6.1 - 7.2. La respuesta del sensor no se ve afectada por la presencia de partículas sólidas o aniones coloreados en las disoluciones lo que permitió su aplicación a matrices turbias como leche.

El primer sensor reversible basado en medidas de luminiscencia para pH fue desarrollado por Saari y col. (197). El sensor se basa en la desactivación de la fluorescencia del indicador fluoresceinamina inmovilizado bien en celulosa o en vidrio de poro controlado. El tiempo de respuesta del sensor es corto ya que no necesita membrana. Posee el más amplio intervalo de trabajo (pH 2 a 9) debido a los dos pKs sucesivos del indicador, sin embargo carece de sensibilidad y reproducibilidad.

Munkholm y col. (198) también utilizan la fluoresceinamina como indicador para la construcción de un sensor de pH. El reactivo es incorporado en un copolímero de acrilamida-metilen(bis)acrilamida y unido covalentemente a la superficie de la fibra óptica.

Zhujum y colaboradores (199,200) describen otro sensor para pH (intervalo de trabajo 6.5- 8.5) basado en medidas de fluorescencia. En este caso, el indicador utilizado, la sal trisódica del ácido 8-hidroxi-1,3,5-pirenotrisulfónico (HPTS), se inmoviliza electrostáticamente sobre una resina de intercambio aniónico. La dependencia de la señal fluorescente con el pH puede explicarse en la siguiente figura:

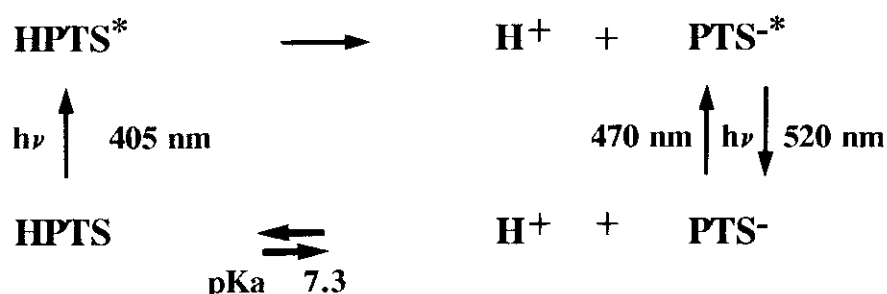


Figura 20. Procesos ácido-base correspondientes al HPTS en el estado fundamental y excitado

En el estado excitado la ionización del HPTS se produce a mayor velocidad que su regreso al estado fundamental, así a pH menor que 7.3 la fluorescencia observada es la correspondiente al estado excitado de la forma básica (PTS^{-*}), aunque el HPTS es la especie mayoritaria en el estado fundamental. Como las longitudes de onda de excitación de la forma ácida y básica son muy distintas, puede obtenerse una respuesta en función del pH del medio, excitando de forma selectiva una u otra especie, o bien, se puede excitar ambas a la vez y estudiar el cociente de dicha emisión. En este último caso el pH se determina gracias a la relación de intensidad de fluorescencia entre las dos especies excitadas, esto supone la eliminación de errores debidos a pérdidas de indicador, fotodescomposición y fluctuaciones de la fuente de luz y deriva del detector. Además la medida de pH es independiente de la temperatura, fuerza iónica y otros iones. Se obtiene una precisión de 0.02 unidades de pH pero la vida de la membrana es muy corta debido a la fotodegradación y se requiere un equipo sofisticado.

Jordan y colaboradores (201) desarrollaron un nuevo sensor de pH, útil en el intervalo 6.0 - 8.0, basado en la transferencia de energía de la eosina, fluoróforo independiente del pH, al rojo fenol (indicador ácido-base). Los dos reactivos son co-inmovilizados sobre poliacrilamida. La precisión del sensor es de 0.008 unidades de pH con un tiempo de respuesta de 10 seg. La especie protonada del rojo fenol presenta una absorptividad menor en la región de solapamiento del espectro de emisión de la eosina, y el de absorción del rojo fenol no protonado, por ello al decrecer el pH menor es la energía transferida y la intensidad de fluorescencia alcanza valores más altos. El cambio de pH

entre 6 y 8 es detectado por variación en la intensidad de fluorescencia. Este sensor es muy sensible, de extremada duración y resistente a la fotodescomposición.

Serra y col. (202) desarrollan un sensor de reflectancia tipo sonda para la monitorización de pH en agua de mar. Este sensor se basa en la utilización del indicador rojo fenol adsorbido en una resina tipo amberlita XAD-2, soporte hidrofóbico altamente resistente en las condiciones marinas, fijada en el extremo de la fibra óptica.

La respuesta obtenida con este sensor es de 1.5 -2 unidades de pH (igual al obtenido en disolución). Este intervalo de trabajo puede ser ampliado (3.5 - 5 unidades de pH) utilizando diferentes configuraciones (fibra única o bifurcada) y tamaño de partícula. La respuesta del sensor tiene una dependencia lineal con la salinidad y temperatura en los intervalos $12\% < S < 42\%$ y $10^{\circ}\text{C} < T < 35^{\circ}\text{C}$ respectivamente.

Lakowic *et al.* (203) han desarrollado un sensor de pH y pCO_2 basado en medidas de tiempo de vida de fluorescencia. El sensor se basa en un proceso de transferencia de energía entre un donante y un aceptor. El aceptor presenta cambios en su espectro de absorción como respuesta a la variación de pH o pCO_2 . No se han descrito aplicaciones del sensor pero considerando sus características analíticas, parecer poseer una precisión adecuada para utilización en clínica y determinación de gases en sangre.

Thompson y col. (204) Estos autores han desarrollado un sensor de fibra óptica para pH basado en tiempo de vida de fluorescencia de varios indicadores comerciales. La precisión es 0.02 unidades de pH. Este estudio es aplicable a otros analitos e indicadores y puede aplicarse a sensores de onda evanescente.

Recientemente Kostov *et al.* (205) proponen un método de producir membranas para sensores ópticos de pH. Las membranas de acetilcelulosa contienen indicador inmovilizado covalentemente (rojo neutro o congo rojo). Estas membranas presentan un tiempo de respuesta corto y buena durabilidad. Este método proporciona la posibilidad de inmovilizar simultáneamente enzimas e indicadores de pH.

Ge *et al.* (206) han descrito un sensor de fibra óptica para pH basado en onda evanescente. Un polímero conductivo sensible al pH (polianilina) ha sido inmovilizado en el núcleo de una fibra óptica de sílice. Los valores de pH obtenidos con este sensor y los

obtenidos con electrodos comerciales poseen buena correlación si el pH se expresa como un polinomio de quinto orden de la absorbancia para una longitud de onda dada. Su aplicación para la monitorización de pH a larga distancia está bajo investigación.

6.1.2. SENSORES ÓPTICOS EN FLUJO PARA LA DETERMINACIÓN DE pH.

Sensores de pH que emplean fibra óptica

El primer trabajo descrito en la bibliografía sobre un método FIA con detección mediante un sensor óptico fue una simple medida de pH (207). Se trata de un sistema de circuitos integrados, cuya fase reactiva está compuesta por un indicador ácido-base inmovilizado sobre celulosa. A través de esta fase reactiva situada en un canal del flujo, fluye libremente la corriente portadora (Figura 21) produciendo un cambio de color. Este cambio de reflectancia de la fase sólida es recogido por un haz de fibras ópticas bifurcadas y conducido a un espectrofotómetro convencional.

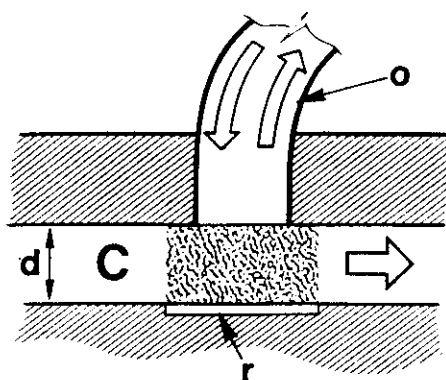


Figura 21. Esquema del sensor óptico para medidas de pH. (c) caudal del portador, (d) espesor de la "fase reactiva" (r) reflector, (o) fibras ópticas.

Los microcircuitos son bloques de PVC de 70x45x10 mm donde se han impreso canales de forma que éstos tienen un sección transversal semicircular de 0.8 mm² de área.

El microcircuito, así como el dispositivo para las medidas de pH se muestra en las Figuras 22 y 23 respectivamente.

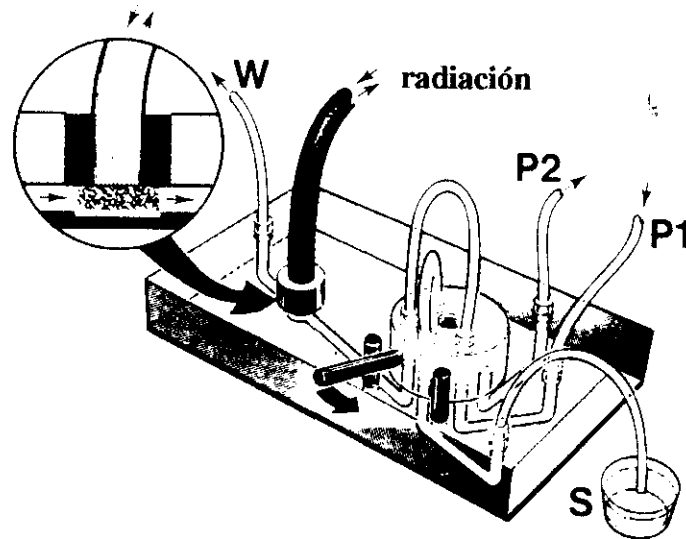


Figura 22. Microcircuitos integrados para medidas de pH. Comprende válvula de inyección y el sensor óptico. (s) muestra, (P1) y (P2) tubos que conducen a la bombas peristálticas, (W) desecho.

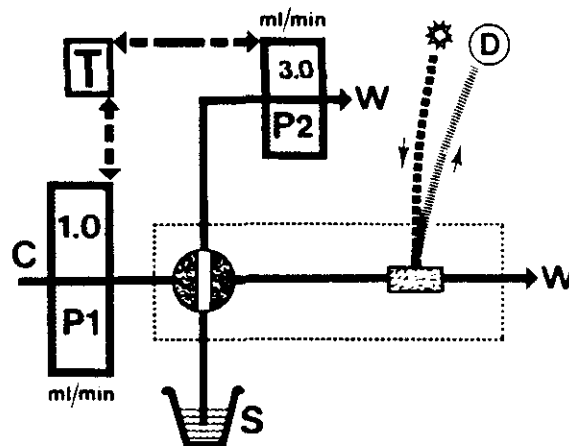


Figura 23. Dispositivo para medidas de pH. (P1) y (P2) bombas peristálticas, (T) timer, (S) muestra, (C) portador, (W) desecho- La célula de flujo comunica con una fuente de luz y con un espectrofotómetro (D) a través de la fibra óptica.

Este sistema se caracteriza por una rápida respuesta al pH permitiendo hasta 120 determinaciones por hora, así como una buena reproducibilidad (desviación estándar ± 0.01 unidades de pH)

La medida de pH en agua de lluvia en un sistema de inyección en flujo ha sido desarrollado por Woods, (208). Se basa en el seguimiento del cambio de color de una fase reactiva comercial que incluye varios indicadores covalentemente unidos a una matriz de celulosa evitando el procedimiento de inmovilización. El dispositivo empleado permite la inyección de diferente volumen de muestra 75 - 200 microlitros. Los intervalos de trabajo dependen del pK del indicador inmovilizado. La precisión en todos los indicadores ensayados y en todos los intervalos es menor a 0.17 unidades de pH. Con una inyección de 275 microlitros de muestra se pueden realizar 35 determinaciones por hora.

Recientemente Werner et al (209) han descrito una membrana sensible al pH que consiste en un soporte de poliéster cubierto con una capa delgada de celulosa que contienen un indicador ácido-base inmovilizado covalentemente. La membrana es totalmente transparente y muestra un color inducido por el cambio de pH en el intervalo 10-13. El tiempo de respuesta para alcanzar el 90% de la señal es 1 minuto. Este nuevo material posee una gran estabilidad, pues tras varias horas de operación a pH muy alcalino la señal sigue siendo estable, lo que lo convierte en una alternativa a los electrodos de vidrio convencionales que sufren el llamado error alcalino. La fuerza iónica afecta la respuesta del sensor. La precisión obtenida en el intervalo está comprendida entre 0.03 y 0.1 unidades de pH.

Sensores de pH que no emplean fibra óptica.

Wolfbeis et al. (210) desarrollan un sensor reversible para pH basado en medidas de fluorescencia. El indicador fluorescente utilizado es carboxinaftofluoresceína cuya intensidad de fluorescencia varía con el pH. El intervalo de trabajo se sitúa en el intervalo de pH comprendido entre 6 y 9. Se han llevado a cabo dos clases de inmovilización, por enlace covalente en una matriz de celulosa y atrapamiento físico en una matriz de sílice por procedimiento sol-gel. Este último no resultó operativo debido a su respuesta tan lenta (tiempos de respuesta de 15 min) y a la pérdida progresiva de indicador del soporte.

La membrana sensible de celulosa se coloca en una célula de flujo a través de la cual se bombean disoluciones a diferentes pH. En la Figura 24 se observa el comportamiento de esta membrana. El tiempo de respuesta es menor en el sentido

creciente de pH (2-5 min) que en sentido inverso (3-8 min). El sensor es totalmente reversible.

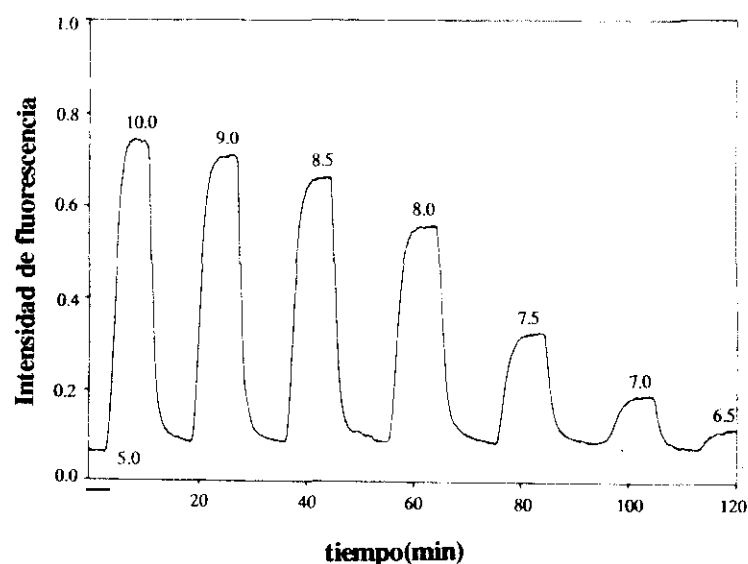


Figura 24. Variación en la señal relativa, tiempo de respuesta y reversibilidad del sensor de pH cuando se expone a disoluciones reguladoras de diferentes pH.

Cardwell (211) han inmovilizado 4-dimetilamino-4'-octilazobenceno en una membrana de acetato de celulosa. En la membrana se incluye dietilftalato como plastificante para mejorar la transparencia de la membrana y trietilenglicol como agente humectante. El colorante utilizado cambia de una forma neutra de color amarillo (en medio básico) a una forma catiónica de color rojo (en medio ácido) por lo que es necesario la introducción de un agente para mantener el balance iónico. Como tales se han utilizado tetrafenilborato y tetrakis(4-clorofenil)borato potásico. Esta membrana colocada en una célula de flujo se ha utilizado para la valoración de una disolución de base fuerte 0.1M de hidróxido sódico o potásico con ácido clorhídrico 0.1M. a 580 nm.

6.1.3. SENSORES DE pH COMO TRANSDUCTORES EN SENSORES DE TERCERA GENERACIÓN.

En los últimos años se ha incrementado el uso de optrodos basados en medidas de pH para la determinación indirecta de especies de interés como amoníaco, CO₂, urea, penicilina, etc que intervienen en reacciones en que se generen o consuman protones.

Así por ejemplo, se han determinado iones como Ag⁺, Hg²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺ y Pb²⁺ a través de la inhibición reversible no competitiva que provoca la presencia de estos metales sobre la reacción enzimática entre la urea y la ureasa. Los iones metálicos inactivan la ureasa por reacción con el grupo sulfhidrilo aumentando el pH. La inhibición de la ureasa es relativamente selectiva para el Hg²⁺ con una selectividad 100 veces superior a la del resto de los iones y además la inhibición relativa de la enzima es una función lineal de la concentración de Hg²⁺. Por otra parte, se trata de una inhibición reversible, ya que la enzima inmovilizada recupera su actividad tras una etapa de regeneración con una disolución de tioacetamida, EDTA. Yerian et al (212) proponen un sistema para la determinación de Hg²⁺ (0.2 - 2.0 μM) basado en la inhibición enzimática de la ureasa. Este método resulta apropiado para el análisis en continuo de Hg²⁺ en muestras medioambientales.

Un optrodo sensible al CO₂ ha sido desarrollado por distintos investigadores (213), se basa en un indicador fluorescente (HPTS) sensible al pH disuelto en un tampón bicarbonato y atrapado en un polímero de silicona. El CO₂ difunde hacia la disolución reguladora interna y cambia su pH y por ello las propiedades fluorescentes del indicador varían. En la tabla 6 se resumen algunos ejemplos de estas aplicaciones.

Tabla 6. Ejemplos de utilización de sensores de pH como transductores en sensores de tercera generación.

Analito	Límite de detección	Indicador ácido-base	Referencia
Amoniaco	0.09 μM	2',7'-diclorofluoresceina y 5-carboxi-2'7'-diclorofluoresceina	(214)
Amoniaco	7 nM	5-carboxi-4',5'-	(215)
Glutamato	0.1 μM	dimetilfluoresceina y 2,7-bis(2-carboxietil)-5-carboxifluoresceina	
Penicilina V	0.01 - 10 mM	nile blue	(216)
Penicilina G	0.03 - 10 mM		
Penicilina	0.1 - 10 mM	fluoresceina isotiocianato	(217)
Amoniaco	1 μM	derivados de trifenilmetano	(218)

6.2. DETERMINACION DE HIERRO

La determinación de hierro basado en medidas sobre fase sólida combina las etapas de preconcentración, separación y determinación logrando con ello sensibilidades muy superiores a las obtenidas en disolución. Se han descrito pocos sensores ópticos basados en métodos con y sin flujo y con y sin fibra óptica y muchos de ellos carecen de la sensibilidad y sobre todo de la selectividad adecuada.

6.2.1. SENSORES TIPO SONDA.

Faraldos y col (219) describen un sensor de fibra óptica basado en medidas de reflectancia para la determinación de Fe(III) utilizando Cromazurol-S como reactivo indicador soportado en una resina de intercambio iónico. La fase reactiva se regenera con pirofosfato. Este sensor presenta un límite de detección de 0.2 ppm con una precisión de 0.2% y se ha aplicado a la determinación de Fe(III) en aguas de diferente procedencia.

6.2.2. SENSORES ÓPTICOS EN FLUJO

Lázaro y col.(94) proponen un método para determinar Fe(III) que integra las etapas de retención y detección espectrofotométrica. El método se basa en la formación de un complejo coloreado Fe(III)-tiocianato cuya **absorbancia** se mide una vez es absorbido en la fase sólida. El método tiene un límite de detección de 10 ng/ml y una razonable selectividad. La principal interferencia encontrada se debe a Cu(II).

6.2.3. DETERMINACIÓN DE HIERRO EMPLEANDO FASES SOLIDAS.

Los métodos que se exponen a continuación no constituyen en sí sensores puesto que se realizan en discontinuo y sin fibra óptica, pero dado que todos ellos emplean la fase sólida para la realización de la medida o como sistema de preconcentración tendrían un posible potencial analítico como sensores ópticos.

Otros autores han utilizado diferentes fases sólidas para **preconcentrar** hierro para posteriormente analizar este elemento por diferentes técnicas. Entre estos trabajos puede mencionarse los siguientes.

Se ha utilizado un intercambiador aniónico para preconcentrar hierro, su detección espectrofotométrica se lleva a cabo con el reactivo 4,7-difenil-1-10 fenantrolina disulfonato. La reacción se lleva a cabo después de eluir el hierro de la minicolumna con acetato. (220). El complejo coloreado se adsorbe en un intercambiador aniónico y se mide continuamente la absorción de la fase coloreada, el límite de detección es de 0.1 mg/ml para un volumen de muestra de 80 ml.

Elrod et al. (221) proponen un método para la determinación de Fe(II) y hierro disuelto en agua de mar. La técnica emplea un sistema FIA con detección quimioluminiscente. La radiación medida procede de la reacción de sulfoflavina brillante con H₂O₂ y Fe(II) en medio neutro. Se utiliza una columna intercambiadora catiónica para preconcentrar hierro y se obtiene un límite de detección de 0.45 nmol/l con 4.4 ml de muestra. El límite de detección puede mejorarse si se incrementa el volumen de muestra

utilizada. La desviación relativa estándar es 2-5% para concentraciones superiores a 2.5 nmol/l.

Se ha realizado la determinación espectrofotométrica de Fe(III) en agua de mar por preconcentración de Fe(III) en una columna C18 que contiene un reactivo quelatante reactivo. El complejo se eluye con metanol y su absorción se mide a 562nm, estimándose un límite de detección de 33 ng/ml. (222)

El número de publicaciones sobre espectroscopía sobre fase sólida no son numerosas pero en los últimos años ha experimentado un gran auge, se puede considerar estos trabajos como una fase previa para posibles futuros sensores ópticos.

Nigo et al. (223) han desarrollado un método para la determinación de hierro (II) y (III), basado en medidas de **absorbancia** en fase sólida. El método utiliza el reactivo 1-10 fenantrolina para Fe(II) y citrato como agente enmascarante de Fe(III). De esta manera el complejo formado en disolución en presencia de la resina Dowex 50W-X2 (agitación mecánica durante 30 minutos) queda absorbido en dicha fase sólida. Es posible la determinación de hierro total si se produce la reducción de Fe(III) a Fe(II) con hidroxilamina. Las lecturas de absorbancia se efectúan a dos longitudes de onda, 514 nm (máximo de absorción del complejo) y 630 nm donde absorbe solamente la resina. Se obtiene un límite de detección de 5.1 ppb para Fe(II) y 6.0 ppb de hierro total cuando se tiene 200 ml de muestra. La precisión es de 4.6% para la determinación de 0.2 ppm de hierro total. Las mayores interferencias las producen cobre, cobalto y zinc. El método se ha aplicado a la determinación de hierro en aguas de origen natural.

Shriadah et al. (224) han descrito un método rápido simple y sensible para la determinación de hierro en agua de mar. El método se basa en el enriquecimiento de hierro como un complejo que forma Fe(II) con batofenentrolina disulfonato de color rojo a pH 4.5 en una capa de resina aniónica Amberlyst A-27. Se efectúan medidas de **absorbancia** sobre la fase sólida coloreada. En primer lugar se forma el complejo en disolución (10 minutos) y se añade la fase sólida para que se produzca su adsorción. La absorbancia se mide a 550 nm. La desviación estándar relativa es de 2.8% para 6 determinaciones de 0.3 microgramos de Fe(II). En cuanto a las posibles interferencias se ha comprobado que la presencia de iones Cl^- afecta a la fijación del complejo pero no a su coloración.

Saito (225) proponen una modificación del método descrito anteriormente empleando una membrana de PVC como soporte del reactivo batofenantrolina y o-nitrofenilocileter. Existe la posibilidad de determinación de hierro total, Fe(II) y Fe(III), el método posee alta selectividad y sensibilidad hacia Fe(II). El límite de detección es $6.8 \cdot 10^{-7} \text{M}$. Se obtiene una precisión de 4.3% con una disolución de $2.15 \cdot 10^{-5} \text{M}$. El principal efecto interferente se debe a la presencia de cobre incluso en una concentración igual a la de Fe(II), este efecto puede ser eliminado con la adición de un agente enmascarante del ión Cu(II).

Kanebo y col. han presentado un método para determinación de hierro con un límite de detección de 0.6 ng/ml por formación de un quelato aniónico entre Fe(III) y el reactivo 2,2' dihidroxiazobenceno que reacciona con violeta cristal y después el par iónico es adsorbido en la superficie de una película de PVC, midiendo a 592 nm. (226)

Lev y colaboradores (227) han desarrollado un método espectrofotométrico con un límite de detección para el ión ferroso menor de 0.1 ng/ml que se basa en la preconcentración de este ión en una fase sólida constituida por el reactivo 1-1o fenantrolina atrapado en una matriz de sílice por el procedimiento sol-gel. La absorbancia del complejo formado se mide directamente sobre la fase sólida en un espectrofotómetro convencional. El tiempo de equilibración del vidrio dopado está determinado por la difusión del analito al interior de la fase sólida para la formación del complejo y puede variar de 1-24 h dependiendo de la cantidad de soporte utilizada para preconcentrar.

6.3. DETERMINACIÓN DE ALUMINIO

6.3.1. SENSORES TIPO SONDA

El primer sensor regenerable de fibra óptica para la determinación de Al(III) fue desarrollado por Saari y Seitz (228). Desarrollaron un sensor de fluorescencia utilizando como reactivo indicador la morina que fue inmovilizada sobre celulosa en polvo y unida al extremo de una fibra óptica bifurcada. La respuesta de este sensor es lineal en el intervalo 1-100 μM en Al^{3+} a pH 4.8. El tiempo de respuesta de este sensor es de 1-2 minutos y el límite de detección $1 \mu\text{M}$ en Al^{3+} .

En un trabajo posterior (229) se preparó otro tipo de sensor que responde a Al(III), Mg(II), Zn(II) y Cd(II) por inmovilización de 8-hidroxiquinoleína-5-sulfónico sobre una resina de intercambio iónico y uniendo la resina al extremo de un haz de fibra óptica bifurcada. El límite de detección para los diversos iones metálicos estudiados fueron menores de $1 \mu\text{M}$. La respuesta del sensor con la concentración del ión metálico no fue lineal.

En 1986 Wolfbeis propone un método de valoración complexométrica directa de Al^{3+} con CDTA (230), válido incluso para disoluciones fuertemente coloreadas o turbias. La valoración se sigue a través de la intensidad de fluorescencia del complejo Al(III)-morina mediante la utilización de una fibra óptica bifurcada. Este método permite la determinación de aluminio en el rango de 1-800 ppm con alta precisión. Dado el diminuto tamaño de las fibras son posibles valoraciones ácido-base de muy pequeñas cantidades de muestra (200-500 μl).

Posteriormente ha sido descrita la construcción de un optrodo para aluminio cuya fase sensora está constituida por morina inmovilizada en una biomembrana (231), obteniéndose un límite de detección de 16 ppb y un tiempo de respuesta de 30-60 segundos.

6.2.2. SENSORES OPTICOS EN FLUJO.

Pereiro y colaboradores (232) han desarrollado un sensor espectrofluorimétrico para determinación de Al(III) en niveles de ppb en un sistema en flujo, la fase reactiva está constituida por Kelex 100 modificada con 8-hidroxiquinoleína inmovilizado sobre Amberlita XAD-7 y se obtiene un límite de detección de 7 ppb con una precisión de 0.8%.

Estos mismos autores han descrito un sensor fosforimétrico en flujo para la determinación de aluminio. La medida de fosforescencia a temperatura ambiente se debe a la reacción entre el analito y el reactivo ferrón inmovilizado en una resina aniónica. El límite de detección obtenido es de 1.8 ng/ml y una desviación estándar de 2.3 %.(233)

6.2.3. DETERMINACION DE ALUMINIO CON UTILIZACIÓN DE FASES SOLIDAS.

Existen en la bibliografía pocos sensores para la determinación de este analito si bien aparecen algunos trabajos para la determinación de Al(III) que emplean reactivos inmovilizados sobre un soporte sólido para *preconcentrar* el catión.

Ditzler y col. (234) inmovilizaron 2,2',4,- trihidroxiazobenceno sobre gel de sílice. La principal ventaja del sistema no es la preconcentración del analito sino la disminución de las especies potencialmente interferentes.

Ljunggren et al. (235) utilizan como agente quelatante desferrioxamina inmovilizada en vidrio de poro controlado para la preconcentración de aluminio. La minicolumna se dispone en un sistema de inyección en flujo y tras la elución del catión se procede a la detección por espectrofotometría de absorción atómica con llama.

El acoplamiento de una microlumna con el reactivo 8 -hidroxiquinoleína inmovilizada para preconcentrar aluminio (durante 3 minutos) seguida de la elución del complejo con HCl-HNO₃ y posterior detección con absorción atómica con llama (236) proporciona un límite de detección de 3 ng/ml de Al(III).

Algunos autores utilizan las fases sólidas para la determinación de aluminio *formando previamente el complejo en disolución*.

Wolfbeis (237) propone la inmovilización de morina en silica gel empaquetada en una microcolumna para la determinación de aluminio fluorimetricamente. La relación entre la longitud de la zona fluorescente de la columna y la concentración de Al(III) que pasa a través de la columna ofrece un método simple y rápido para la estimación semicuantitativa de Al(III).

Molina -Diaz et al. (238), determinan niveles de aluminio por debajo de ng/ml. Para ello forman un complejo entre Al(III) y el reactivo cromazurol S de color azul que se adsorbe fácilmente en una resina de intercambio aniónico. El método desarrollado se basa en la medida de la absorbancia de esta fase sólida coloreada. El intervalo lineal obtenido

está comprendido 0.6-4.0 ng/ml con una precisión de 2.1%. El método, en discontinuo, se ha aplicado a la determinación de aluminio en aguas naturales y de grifo y en aleaciones.

II. PARTE EXPERIMENTAL

1.- APARATOS, MATERIAL Y REACTIVOS

1.1.- DESCRIPCIÓN DE LOS REACTIVOS UTILIZADOS COMO FASE REACTIVA EN ESTA MEMORIA.

1.1.1.- CROMAZUROL S.

El reactivo cromazurol S (CS) es un indicador metalocrómico derivado del trifenilmetano cuya fórmula corresponde a la del ácido 3"-sulfónico-2",6"-dicloro-3.3"-dimetil-4,4"-dihidroxi-5,5"-dicarboxílico-trifenilmetano. En disolución fuertemente ácida el ligando está presente como un zwitterion representado en la figura.

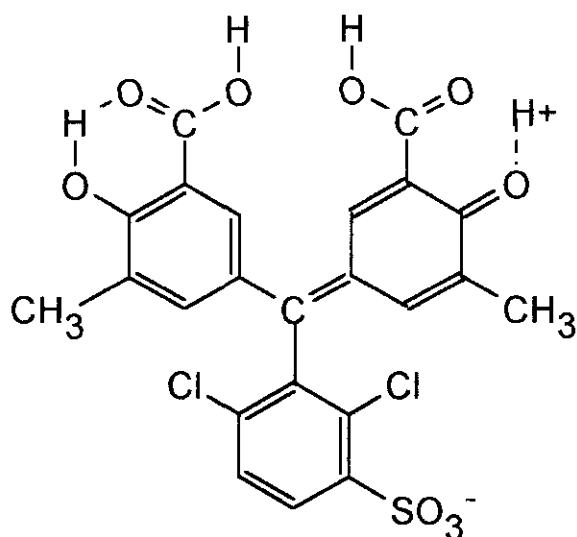


Figura 25. Fórmula estructural propuesta del CS en disoluciones fuertemente ácidas (H_4I).

El Cromazurol S presenta tres constantes de disociación que corresponden a los equilibrios de la tabla 7.

Tabla 7. Equilibrios y constantes de disociación del cromazurol S

Equilibrio	pK _a (239)	pK _a (240)	Color
H_4I			rosa
$H_3I \rightleftharpoons H^+ + H_2I_2^-$	2.5	2.3	naranja
$H_2I_2^- \rightleftharpoons H^+ + HI^{3-}$	4.9	4.7	rojo
$HI^{3-} \rightleftharpoons H^+ + I^{4-}$	11.5	11.8	amarillo
I^{4-}			azul

Este reactivo forma complejos quelatos, generalmente de estequiometría 1:1 con numerosos metales. Las constantes de formación de estos complejos se encuentran en la tabla 8 donde se observa que los iones Fe(III) y Al(III) forman complejos muy estables con este reactivo.

Tabla 8. Constantes de formación de los complejos del cromazurol S con metales (241)

Metal	Al	Be	Cd	Cu	Fe	Hf	In	Mg	Pd	Sc	Th	Ti	Y	Zr
log (β_{11})	12.9	10.2		9.4	15.6	17.8	13.2		13.5	12.6	12.3	12.3	10.2	16.3
log (β_{12})			10.8					11.1						
log (β_{21})				13.7	20.2									
log (β_{22})					36.2									

Langmyhr (240) propone las siguiente estructuras para cada uno de los complejos que forma el cromazurol S con el Fe(III), formación de un dímero, un monómero y complejo 2:1 representadas en las Figuras 26, 27 y 28.

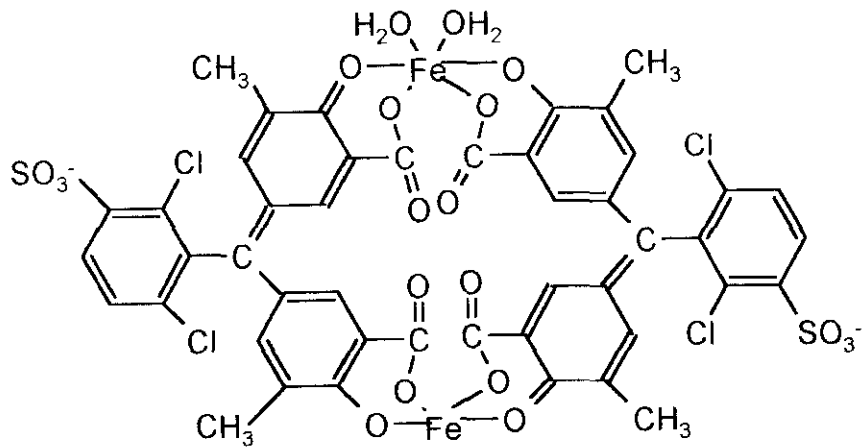


Figura 26 Estructura propuesta para el dímmero $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2]_2\text{L}_2^{2-}$.

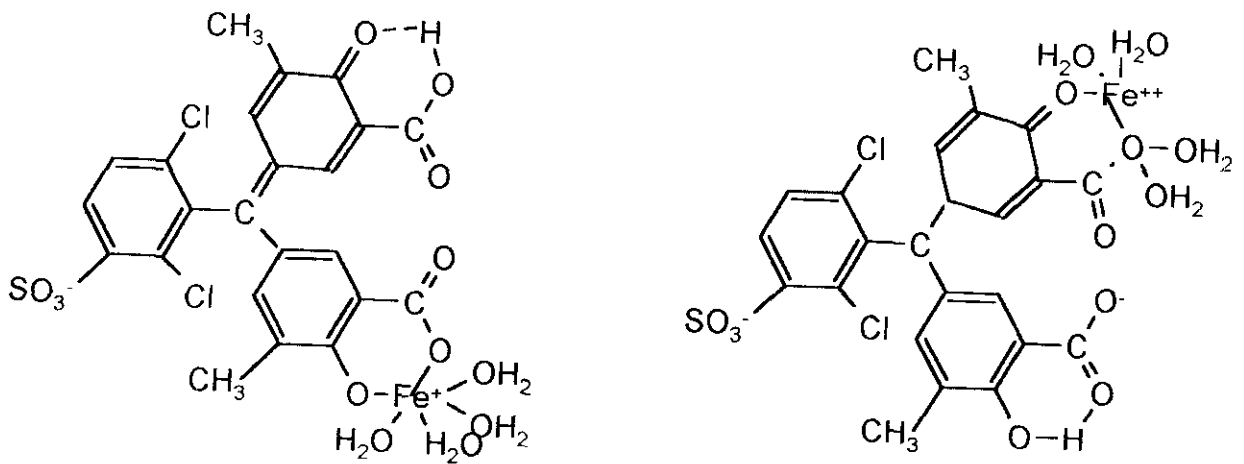


Figura 27. Posibles estructuras del monómero $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_4]\text{L}$

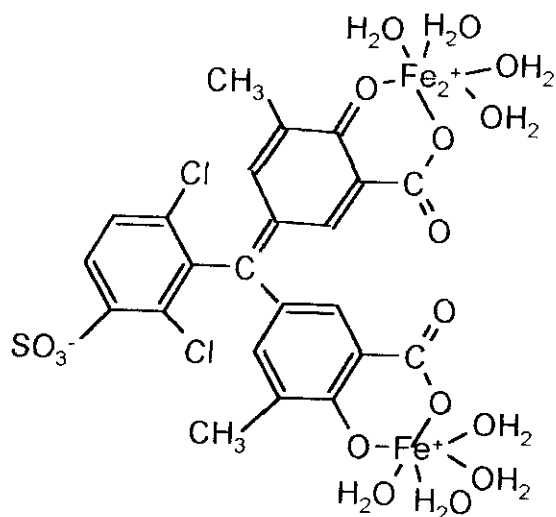


Figura 28 Estructura sugerida de $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_2]\text{I}_2^{2+}$

Kashkovskaia y Mustafin (242) en 1958 emplearon este reactivo por primera vez con fines cuantitativos para la determinación de aluminio en aceros y bronce.

En 1965 Pakalns (243), demuestra que el CS es un reactivo muy sensible para la determinación de aluminio y que es en este sentido superior al aluminon y al "rojo de eriocromo" para la determinación espectrofotométrica directa del analito en presencia de diversos iones. También es preferible la utilización del CS sobre la 8-hidroxiquinoleína según Pakalns ya que el método que utiliza este último reactivo es a menudo tedioso para análisis de rutina.

Este reactivo ha sido en los últimos años utilizado de nuevo para la determinación de Al(III) así como para estudiar la reactividad de las especies hidrolizadas del aluminio (244) resultando un método muy rápido para su determinación colorimétrica.

Este reactivo ha sido en los últimos años utilizado de nuevo para la determinación de Al(III) así como para estudiar la reactividad de las especies hidrolizadas del aluminio (244) resultando un método muy rápido para su determinación colorimétrica.

Ohzeki (245), ha desarrollado un método espectrofotométrico selectivo para la determinación de trazas de Al(III), previa retención del complejo ternario de Al con CS y zefiramina sobre unas membranas que actúan de filtro.

1.1.2.- PIOVERDINA

Descripción: El fitoplancton produce en las aguas marinas una pequeña cantidad de complejantes orgánicos que presentan gran afinidad por los metales. La información existente respecto a estos ligandos está originada en estudios de cultivos en los que la concentración de estos quelatantes es alta. La extrapolación de estos resultados a aguas naturales es por supuesto problemática y es bastante improbable que estos compuestos afecten la especiación en aguas naturales. Los microorganismos acuáticos sintetizan dos tipos de agentes complejantes de metales: ligandos transportadores para adquirir los metales traza y ligandos depuradores o amortiguadores para defenderse de la toxicidad de otros metales.

Ligandos transportadores: Para la mayoría de los metales no conocemos la naturaleza del ligando transportador originado en el fitoplancton por bacterias, normalmente son membranas específicas que poseen gran afinidad y especificidad para los metales en cuestión. (esto es claramente una necesidad para adquirir metales traza desde un medio oligotrófico). En el caso del hierro, se pueden distinguir varios tipos de ligando transportadores, sideróforos de tipo catecol o hidroxamato.

Los sideróforos son por lo tanto pequeñas moléculas que producen los microorganismos cuando están presentes en medios deficientes en hierro (246). Su función es transportar hierro al interior de las células de los organismos que los sintetizan proceso que involucra la participación de proteínas de membrana específica. Estos sideróforos

poseen una alta afinidad específica para Fe(III) al cual transportan hacia el interior de las células. Los sideróforos en general se caracterizan (247) por las siguientes propiedades: 1) Su síntesis se lleva a cabo solo cuando las células microbiales crecen en medios deficientes en hierro; 2) complejan específicamente Fe^{3+} y tienen una débil afinidad o insignificante por Fe^{2+} , 3) los complejos con Fe(III) poseen constantes de estabilidad muy altas (del orden de 10^{32}), 4) como resultado de su capacidad para complejar Fe^{3+} , los sideróforos incrementan las velocidades de entrada de este catión en el interior de las células. Se puede decir que los sideróforos juegan en el transporte de hierro en microorganismos un papel muy parecido al de las membranas ionóforas para los metales alcalinos (248).

Como resultado de estas características algunos sideróforos han encontrado aplicación médica como la deferrieroxamina B que en forma de mesilato es distribuida por la marca Ciba Geigy bajo el nombre de Desferal para el tratamiento de la siderosis. (249). En la síntesis de nuevos antibióticos se ha tenido en cuenta el proceso de transporte de hierro de sideróforos y se ha imitado su naturaleza para traspasar las membranas de las células. Por otra parte los grupos quelatantes que aparecen en los sideróforos (ácido hidroxámico y catecol) han sido utilizados en la agricultura para aumentar la disponibilidad de hierro en el suelo y tales sustancias pueden, por inhibición de la ureasa, prevenir pérdidas de amoníaco en el suelo (250)

Se han aislado sideróforos de suelos y ensayos químicos y biológicos han indicado su presencia en algas y en aguas de lago durante el florecimiento de algas azules-verde. Se ha sugerido que la producción de sideróforos por algas puede suprimir el crecimiento de otras especies incapaces de utilizar el complejo hierro-sideróforo para su crecimiento.

El sideróforo utilizado en este trabajo para la construcción de sensores químicos se denomina pioverdina y es un reactivo fluorescente y soluble en agua, de origen natural biosintetizado por bacterias de la especie *Pseudomonas fluorescens*.

La estructura detallada de algunos sideróforos ha sido caracterizada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) (251). Así, las diferentes pioverdinas están constituidas por una porción peptídica de 6 a 10 aminoácidos unidos a un cromóforo derivado del 2-3-diamino-6,7-dihidroxiquinoleína presente en todas ellas. El péptido en la mayoría de los casos es lineal pero puede ser cíclico o parcialmente cíclico. Cada molécula de pioverdina contiene 3 grupos bidentados quelatantes, un grupo catecol

localizado en el cromóforo y 2 grupos hidroxamatos o, un hidroxamato y un hidroxiaspártico que pertenecen a la parte peptídica (252,253).

Cada cepa de *Pseudomonas* produce varias clases de pioverdinas que poseen el mismo péptido y difieren sólo en la cadena unida al cromóforo. De una especie a otra la cadena del péptido puede variar considerablemente, estando siempre constituido por aminoácidos hidrofílicos: glicina, serina, homoserina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, ácido α -treohidroxiaspártico, N-hidroxiornitina, lisina, arginina.

Las Figuras 29 y 30 representan la estructura la pioverdinas y la del complejo octaédrico que forma con el Fe(III) respectivamente. La formación del complejo con el Fe(III) produce una desactivación estática de la fluorescencia (254) que puede emplearse para la determinación cuantitativa de este analito.

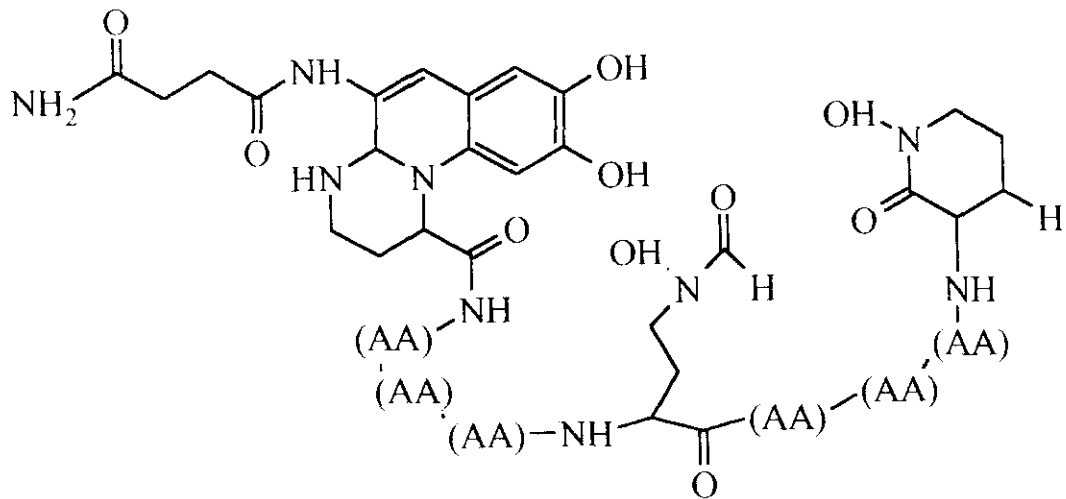


Figura 29. Estructura de pioverdina

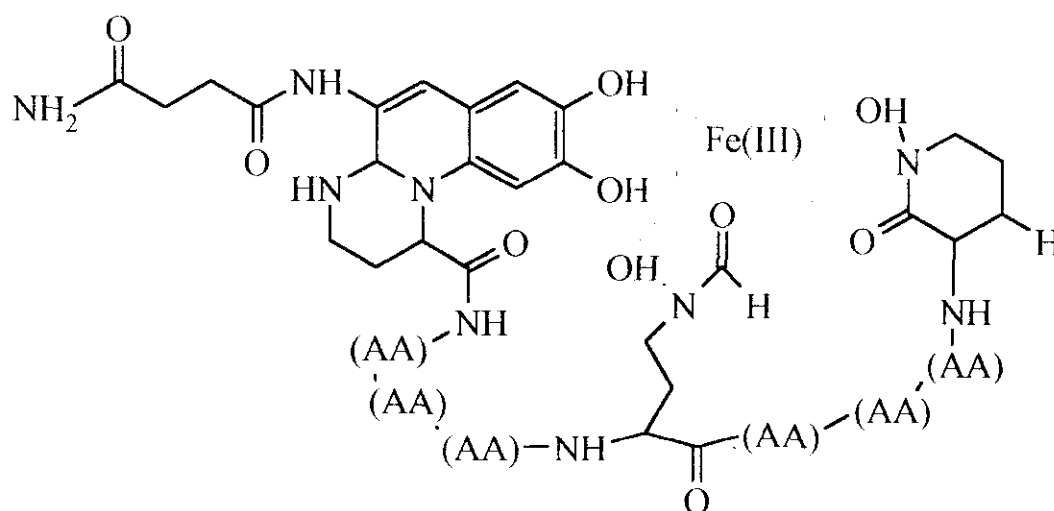


Figura 30. Estructura del complejo pioverdina-Fe(III)

Obtención y purificación de pioverdina. Este reactivo de origen natural se obtuvo y purificó a partir de una cepa de bacterias *Pseudomonas fluorescens* AR-11 modificando ligeramente la versión publicada por Meyer y Abdallah (10).

Las bacterias *Pseudomonas fluorescens* AR-11 fueron cultivadas en un medio PMS₇Ca deficiente en hierro (condición indispensable para que estas bacterias produzcan el sideróforo). El medio de cultivo PMS₇Ca está constituido por N,N-bis[2 hidroxietil]2aminometano sulfónico, piruvato sódico, sulfato magnésico, cloruro amónico, fosfato dipotásico y cloruro cálcico. Las bacterias estuvieron en este medio de cultivo a 25°C y sometidas a agitación mecánica hasta observar un máximo en su crecimiento (en esta etapa ya se observa la fluorescencia de algún producto existente en el medio de cultivo que anteriormente no existía).

El pigmento fluorescente se aísla del medio de cultivo por centrifugación (se separan las células muertas y bacterias) y se pasa a través de una columna G25 rellena de Sephadex (2.5 x 90 cm). La elución se lleva a cabo con agua y las diferentes fracciones (2 ml) se recogen en un colector automático. Estas fracciones se analizan espectrofotométricamente y sólo las que presentan una absorbancia >0.2 en 460 nm son tratadas con un exceso de 8-hidroxiquinoleína para eliminar cualquier traza de hierro y obtener de esta manera el pigmento libre de impurezas. Una vez efectuado esta purificación el pigmento es liofilizado.

1.2. APARATOS Y MATERIALES

1.2.1. APARATOS.

- Espectrofotómetro Unicam SP600, provisto de lámpara halógena alimentada a 12 V
- Tubo fotomultiplicador Thorn Emi, modelo 9558 - S20.
- Fuente de alimentación DC del tubo fotomultiplicador Thorn-Emi Gencom MPS 1600.
- Fuente de alimentación AC AVISOR, FAF 3/4 A, que se acopla a la de continuo con una salida fija de 13.8 V.
- Voltímetro digital Promax, modelo MD-100.
- Espectrofotómetro de fibra óptica Guided Wave 260 (El Dorado Hills, CA) equipado con una lámpara de tungsteno-halógeno de 20 W y 6V, conectado a un ordenador Toshiba T3200SX.
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50 conectado a un ordenador IBM SX55.
- Microscopio de fluorescencia Modelo Zeiss
- Espectrofotómetro de diodos integrados Hewlett Packard 8452-A.
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 2380.

- Centrífuga Beckman.
- Baño termostático
- pH-metro Crison 2001H dotado de un electrodo combinado de vidrio-calomelanos saturado Crison.
- Bombas peristáltica LKB Perpex 10200 y Gilson 2001.
- Válvula de inyección Omnifit de 6 vías
- Unidades de filtración Ultrafree-CL (Millipore).

1.2.2. MATERIALES.

- Haz de fibra óptica de sílice de 2 mm de diámetro interno y 1 m de longitud. El haz está integrado por 14 fibras de 500 micras de diámetro cada una.
- Fibra óptica plástica Crofon (Du Pont), haz de 16 fibras de 250 μm de diámetro cada una.
- Material especial para fibra óptica: conectores (RS), fundas de plástico termocontráctil (RS 399-861 y RS 399-906), tubo de teflón (RS 399-827), copolímero de éster acrílico y N-vinil-2-pirrolidona para pegar las fibras entre sí (Lankro H64, RCP 2280 B) y pelacables (RS-544-906).
- Célula de flujo "Hellma" 176.52 (100 μl de volumen interno y 3 mm de paso óptico)
- Células de flujo de metacrilato (diseñadas en el departamento. apartados ??)
- Agitadores magnéticos Select.
- Placas filtrantes, Pobel y Alamo de porosidad 4.
- Material volumétrico de calidad contrastada (Afora, Alamo, Pobel...)
- Conectores, tubos de teflón de 0.5mm de diámetro interno y tubos de Tygon para bomba peristáltica.
- Tamizadores, luz de malla 1mm y 0.160 mm.
- Pegamento: epoxi-resina.

- Lupa x12 aumentos.
- Papel de lija de 3 rugosidades diferentes.

Soportes poliméricos:

- Intercambiador aniónico Dowex 1-X2 (Dow Chemical Co.); 200-400 mesh, porosidad alta, capacidad (4.3 +_0.3) meq/g, humedad 71-77%, en forma de Cl⁻.
- Intercambiador aniónico Dowex 1-X4 (Dow Chemical Co.); 200-400 mesh, porosidad alta, capacidad (4.3+ -0.3) meq/g, humedad 56-64%, en forma de Cl⁻.
- Intercambiador aniónico Dowex 1-X8 (Dow Chemical Co.); 200-400 mesh, en forma de Cl⁻.
- Intercambiador aniónico Dowex 1-X10 (Dow Chemical Co.); 200-400 mesh, porosidad baja, capacidad (3.2+ -0.3) meq/g, humedad 34-40%, en forma de Cl⁻.
- Intercambiador aniónico Amberlita IRA-400 , en forma de Cl⁻.
- Intercambiador catiónico Dowex 50-WX12 (Dow Chemical Co.); 200-400 mesh, porosidad baja, capacidad (5.1 + -0.3) meq/g, humedad 43-49%, en forma de H⁺.
- Intercambiador catiónico Amberlita IR-122. Forma Cu²⁺.
- Intercambiador catiónico Amberlita IR-120.
- Copolímero estireno-divinilbenceno Dowex (Dow Chemical Co.) al 2%.

Otros soporte sólidos:

- Vidrio de poro controlado (CPG) (Pierce Corning) 460 Å, tamaño de partícula 37-74 micras
- Gel de sílice 100 de la marca Fluka de diámetro comprendido entre 0.063-02 mm.

1.3.- REACTIVOS

- Cromazurol S (CS) de la marca Merck. Disoluciones acuosa de diferentes concentraciones.
- Pioverdina aislada y purificada según se explicó en el apartado II.1.1.2.

-
- Patrón de Aluminio de 1000 $\mu\text{g/ml}$; preparada por disolución de 1000 mg de aluminio metálico puro (Merck) en 1000 ml de agua Milli-Q con ácido clorhídrico al 2% (V/V).
 - Patrón de Hierro de 1000 $\mu\text{g/ml}$ preparada disolviendo $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ en HNO_3 al 1% valorado con permanganato potásico patrón.
 - Hexametilentetramina (HMTA), de la marca Merck. Solución reguladora de HMTA 0.2 M y ajustando el pH a 5 en medio HClO_4 .
 - Biftalato potásico (Merck)
 - Disoluciones reguladoras fisiológicas de la marca Sigma, ácido 2[N-morfolino]etanosulfónico (MES), tris[hidroximetil]aminometano hydrochloride (TRIS), imidazol, HEPES.
 - Reactivos orgánicos para la preparación del vidrio sol-gel: Tetrametoxisilano (Aldrich), metanol (Carlo Erba)
 - Reactivos para la inmovilización del CS en CPG: 3 Aminopropiltriethoxisilano (Fluka), cloroformo (Carlo ErBa), N-propilamina, nitrito Sódico (Carlo Erba) tolueno (Carlo Erba) Acetona (Carlo Erba) Cloruro de p-nitrobenzoilo (Carlo Erba) Ditionito sódico (Carlo Erba)
 - Reactivos para la inmovilización del CS en gel de sílice: Cloruro de metiltriethylamonio, Aliquat 336 (Aldrich)
- Glutaraldehido SCharlau. como agente entrecruzante en la inmovilización de piovordina en CPG.
- Reactivos inorgánicos de grado analítico de diferentes marcas, empleados en la preparación de disoluciones para el estudio de los elementos interferentes.
 - Reactivos inorgánicos de grado analítico de diferentes marcas, empleados en la preparación de disoluciones para los estudios de regeneración de las fases reactivas.
 - Agua purificada mediante un sistema Millie-Q (Millipore) para la preparación de todas las disoluciones utilizadas.

2.- PROCEDIMIENTOS OPERATORIOS

2.1.- DISPOSITIVOS DE MEDIDA

2.1.1.- MEDIDAS DE REFLECTANCIA

Dispositivo 1. Este dispositivo se ha empleado para la determinación de aluminio utilizando CS inmovilizado sobre la resina Dowex 1X2. La disposición del mismo se encuentra en la Figura 31. La radiación emitida por una lámpara halógena de 12 V es monocromada por un monocromador de prisma perteneciente a un espectrofotómetro UV-VIS UNICAM. La fibra óptica bifurcada se acopla por un ramal a la salida del haz de luz que proviene del monocromador mientras que la luz difusa reflejada en el terminal se dirige a través del otro ramal a la entrada del fotomultiplicador.

El tubo fotomultiplicador se halla conectado por una parte a una fuente de alimentación de corriente continua (a su vez conectada a una fuente de alimentación de corriente alterna), y que por otro lado a un conversor de lectura digital. La rendija utilizada a la salida del monocromador fue la mínima posible. Para la realización de las medidas se coloca la célula de flujo (figura 32) en la que está situada la fase reactiva en un recipiente cerrado y negro mate (para evitar la interferencia de la luz ambiental) que posee tres orificios al igual que la célula de flujo, uno de ellos situado en la parte superior para la fibra óptica y dos laterales para la entrada y salida de las disoluciones. Las medidas se efectuaron a temperatura ambiente.

La fibra óptica empleada en este dispositivo está formada por un haz de 16 fibras Crofon Dupont de un diámetro de 0.25 mm cada una y una superficie activa de 0.78 mm². Estas están formadas por un núcleo de polimetacrilato de metilo con un índice de refracción de 1.490 y recubiertas de un polímero transparente de índice de refracción menor n_2 1.392 (AN=0.53) Este haz se halla a su vez protegido por una resina de polietileno. Las fibras óptica Crofon empleadas aceptan luz con un cono de 32° (ángulo de aceptación).

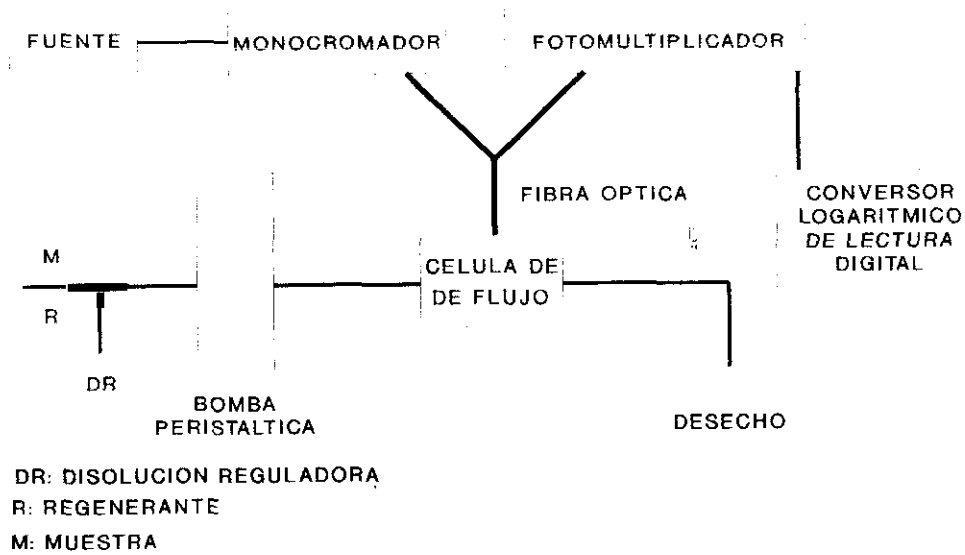


Figura 31. Dispositivo de medida 1 para medidas de reflectancia

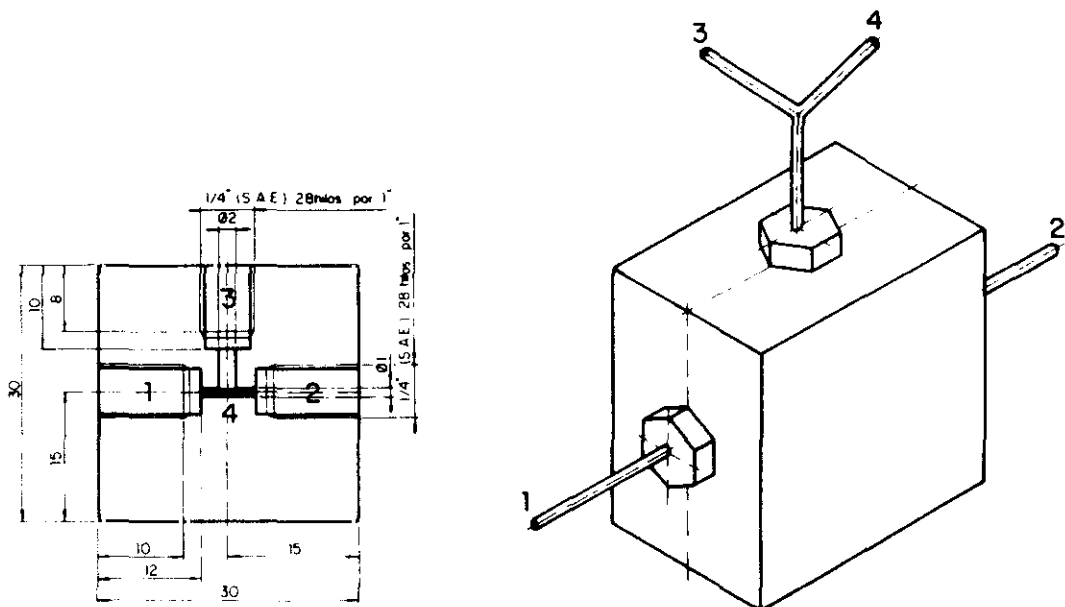


Figura 32. Célula de flujo utilizada en el dispositivo 1. 1. entrada flujo, 2. desecho, 3 fuente de radiación, 4 detector.

La construcción del ramal de fibra óptica bifurcado se efectuó según el procedimiento descrito anteriormente (255). Se parte de un haz de 16 fibras que se divide en 2 grupos de 8 fibras distribuidas al azar. Estos extremos, con superficie perfectamente

pulida y totalmente uniforme para evitar al máximo pérdidas de luz, se colocan tanto a la salida del monocromador como a la entrada del detector mediante unos conectores metálicos.

En la parte común del haz (16 fibras) que debe presentar una superficie completamente pulida se coloca una pieza de unión entre la fibra y la célula de flujo diseñada para este experimento.

En la Figura 33 se representa el espectro de transmisión de la fibra empleada.

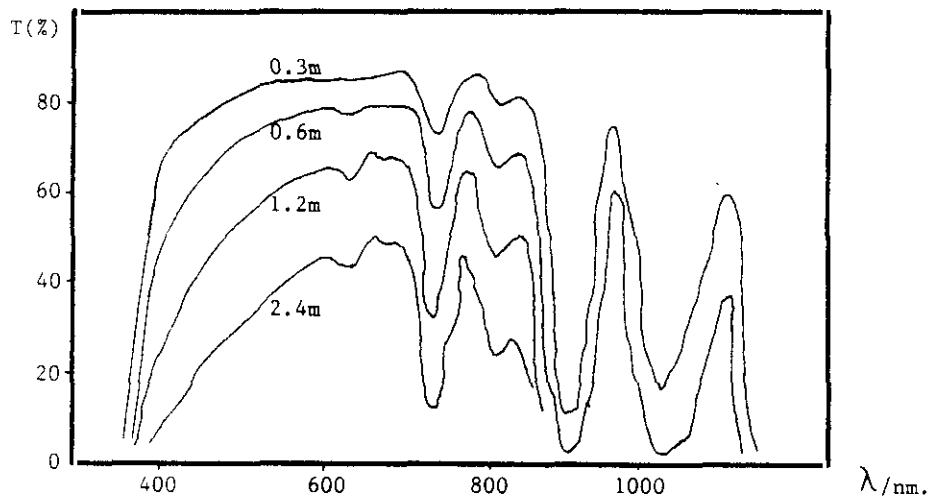


Figura 33. Transmisión espectral de la fibra Crofon.

Dispositivo 2. Se ha utilizado para la optimización de las condiciones operativas para la determinación de Fe(III) y en su determinación utilizando CS inmovilizado en gel de sílice. Este dispositivo se representa en la (Figura 34) El dispositivo está integrado por un fotómetro de fibra óptica Guided Wave 260. con un accesorio de fibra óptica y una célula de flujo donde se dispone la fase reactiva (Figura 35).

La radiación procedente de una lámpara de wolframio monocromada por una red de difracción de 625 líneas. se dirige por un ramal de la fibra óptica (7+7) bifurcada que esta acoplada al espectrofotómetro a la fase sólida con el reactivo inmovilizado que esta situado en la célula de flujo. La luz reflectada se dirige hacia el detector por el otro ramal de la

fibra y se registra en un ordenador Toshiba T3200SX que controla además el programa de medida. La rendija empleada fue de 0.25 mm.

La fibra óptica empleada esta formada por un haz de 14 fibras (7+7) de sílice fundida; 7 fibras llevan la radiación desde la fuente luminosa hasta la fase reactiva y 7 guían la radiación reflectada hacia el detector. El diámetro de cada fibra es de 500 micras poseyendo el haz un diámetro común de 2 mm y una longitud de 1m. En la Figura 36 se representa la absorción de radiación producida por 50 metros de esta misma fibra en todo el espectro electromagnético.

La célula de flujo empleada, donde se coloca la fase reactiva, se ajusta al extremo común de la fibra evitando el contacto entre ambas con una placa de cuarzo de 0.25 mm de espesor. Esta célula está construida en metacrilato y es una modificación de la diseñada en el dispositivo 1. Las medidas se efectuaron a temperatura ambiente.

No fue necesario tomar medidas para evitar las posibles interferencias debidas a luz ambiental puesto que no ejercia efecto alguno sobre los espectros realizados, por estar dotado el equipo de un sistema de modulación de la señal.

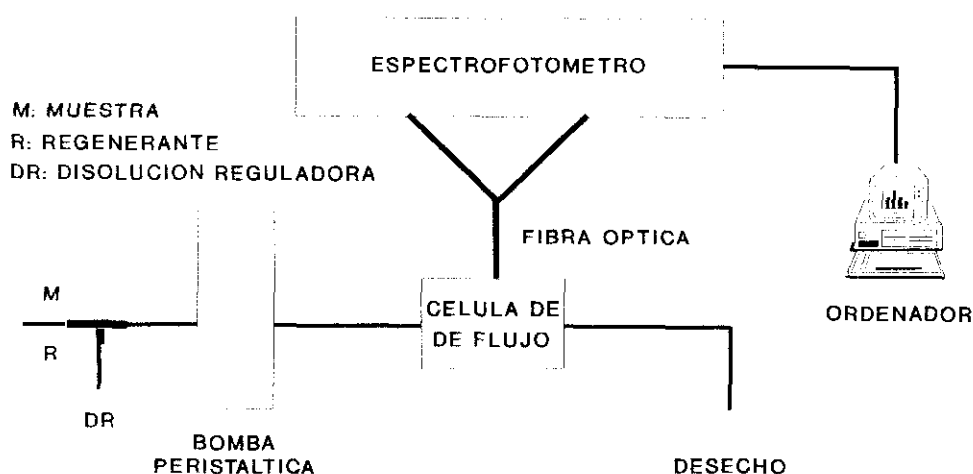


Figura 34: Esquema del dispositivo 2 para medidas de reflectancia con fibra óptica.

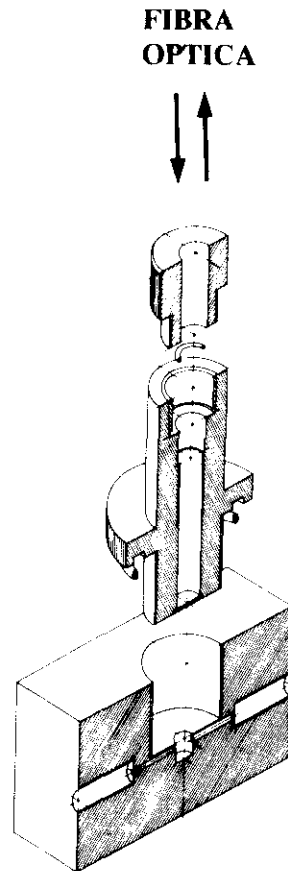


Figura 35. Célula de flujo de metacrilato empleada en el dispositivo 2 para medidas de reflectancia.

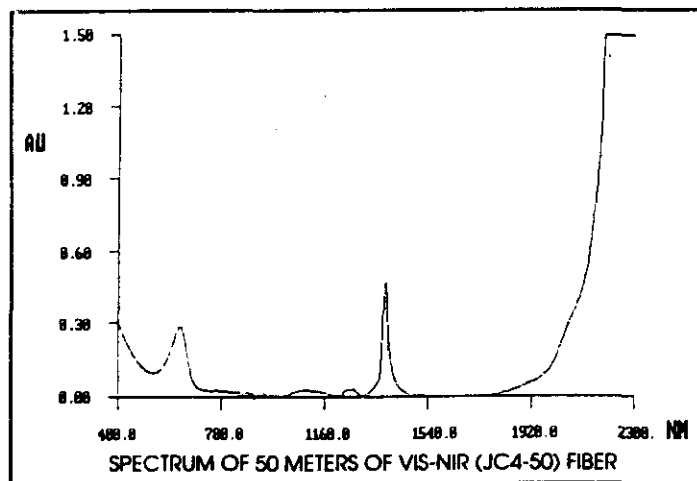


Figura 36. Espectro de absorción de la fibra óptica JC4-50 (50 m)

2.1.2.- MEDIDAS DE FLUORESCENCIA

Este sistema se ha utilizado tanto para la optimización de variables durante el desarrollo del sensor como para la determinación de hierro en diversas matrices utilizando como reactivo pioverdina como reactivo inmovilizado en diferentes soportes (CPG y vidrio sol-gel). El dispositivo (Figura 37) está formado por una célula de flujo comercial rellena de la fase sensible (Figura 38) situada en el portacubetas de un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50. A través de la célula se bombean disoluciones de diferente naturaleza, registrándose las intensidad de fluorescencia en un ordenador IBM-SX55.

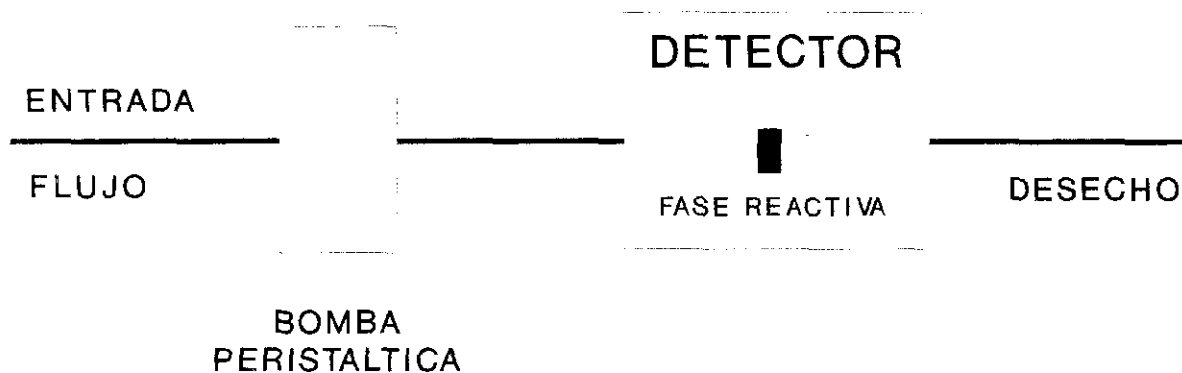


Figura 37. Esquema dispositivo de medida para medidas de fluorescencia.

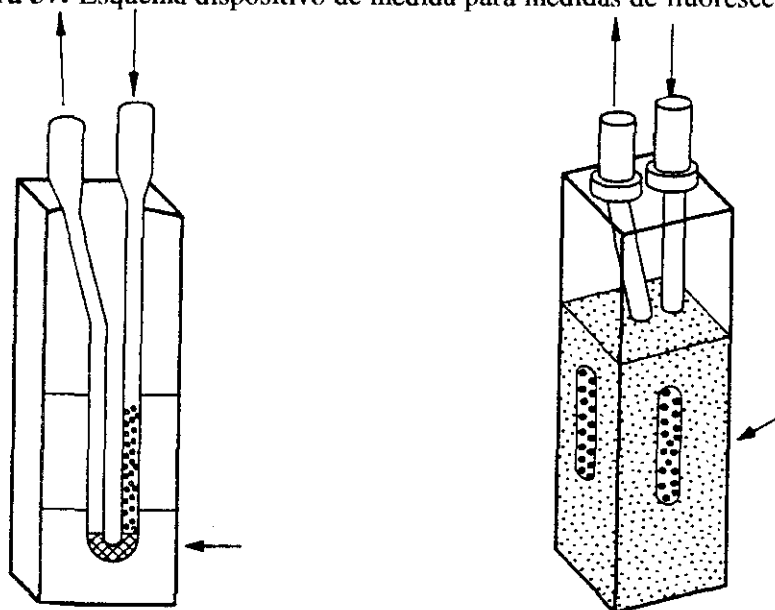


Figura 38 Célula de flujo Hellma 176.52 con la fase reactiva empaquetada

Cuando se ha trabajado inyectando la muestra (FIA) se ha modificado el dispositivo introduciendo una válvula de inyección en el sistema (Figura 39)

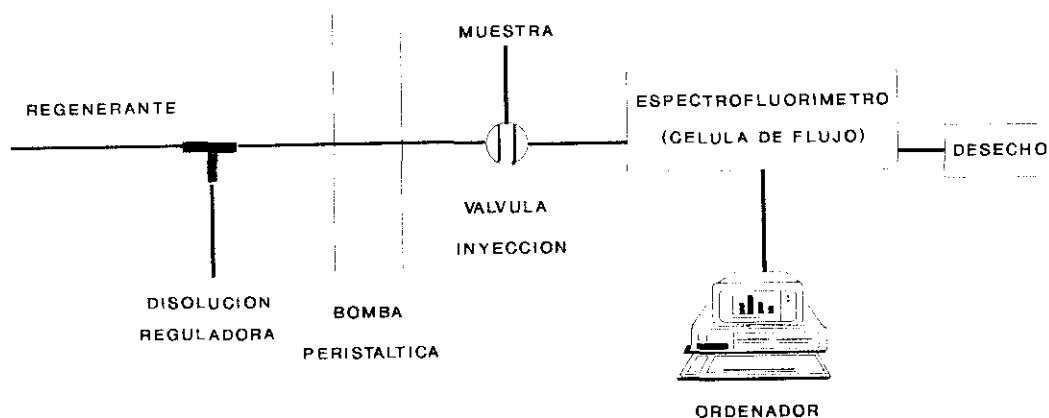


Figura 39. Dispositivo modificado para utilización en FIA

2.2. PREPARACIÓN DE LAS FASES REACTIVAS: INMOVILIZACIONES

2.2.1. INMOVILIZACIÓN DEL INDICADOR CROMAZUROL S.

En este apartado se expondrá el procedimiento operatorio para la preparación de las diferentes fases reactivas elaboradas; todas ellas están constituidas por el mismo colorante (Cromazurol S) y diferentes soportes sólidos de manera que las fuerzas involucradas en cada una de ellas son de diferente naturaleza.

2.2.1.1. Inmovilización en intercambiadores iónicos. La fijación del reactivo indicador (CS) al soporte se lleva a cabo mediante procesos de adsorción y electrostáticos. Se siguió para ello el procedimiento descrito por Faraldos et al. (219) En un tubo de ensayo se coloca 1gr de resina (previamente tratada con NaOH, HCl y agua destilada, secada y tamizada (luz de malla 0.160 mm)) y 10 ml de una disolución acuosa de Cromazurol S al 0.1%, agitándose durante 1 hora, tiempo suficiente para la deposición de

todo el colorante en la resina (sobrenadante incoloro); a continuación se filtra la resina en una placa de vidrio sinterizado (poro 4) y se lava sucesivamente con HCl, NaOH y agua para asegurar la eliminación del indicador no inmovilizado (aguas de lavado incoloras). Por último, se secan a una temperatura inferior a 60°C porque si la temperatura es mayor la matriz polimérica se destruye. Tanto las aguas madre del proceso de inmovilización como las aguas de lavado se analizan espectrofotométricamente para cuantificar la cantidad de reactivo inmovilizado.

2.2.1.2. Inmovilización de CS en vidrio de poro controlado (CPG) La retención del colorante CS en CPG conlleva uniones covalentes y se ha desarrollado según el procedimiento descrito por Bacci y col. (256). En primer lugar se procede a la *activación del vidrio de poro controlado*. Se pesaron 0.2 g de CPG (240, 460 A) y se tratan con 10 ml de HNO₃ al 5% a ebullición durante 30 minutos, a continuación el vidrio de poro controlado fué filtrado en una placa filtrante de vidrio, lavado con agua desionizada y secado en un horno a 95°C. A continuación se llevan a cabo procesos consecutivos de aminación y amidación que consisten en la introducción de grupos NH₂ reactivos en la superficie del vidrio. Esta primera reacción se lleva a cabo tratando a reflujo durante 22 horas el vidrio de poro controlado con una disolución de 10% de 3-aminopropiltrietoxisilano en tolueno, se lava a continuación el vidrio con tolueno, metanol y acetona, siguiendo una etapa de secado a 80°C durante 1 hora. La superficie del vidrio queda entonces con grupos aminos susceptibles de amidación mediante la reacción a reflujo (20 horas) del CPG con una disolución de p-nitrobenzoilo en cloroformo que contiene trietilamina. Una vez efectuados estos pasos el vidrio de poro controlado se lava con cloroformo y se trata con ditionito sódico en caliente durante 1 hora (para la reducción del grupo nitro). El polvo de cuarzo se lava con agua y se trata con NaNO₂ al 2% en un baño de hielo durante 30 minutos agitando e inmediatamente se añade una disolución acuosa de CS al 0.05% que se tiene reaccionando durante 24 h a 4°C.

2.2.1.3. Preparación de un vidrio dopado con CS por el método sol-gel. El procedimiento seguido para el atrapamiento físico del colorante CS en el interior de una matriz de sílice fue el denominado procedimiento sol-gel que transcurre a temperatura ambiente descrito por Levy (106). El vidrio se forma a partir de precursores alcóxidos (tetrametoxisilano) que en presencia del colorante y una mezcla hidro-alcohólica se hidroliza y condensa posteriormente, quedando las moléculas del colorante atrapadas en las cavidades formadas en el interior de esta matriz de sílice.

El procedimiento operativo es extremadamente sencillo: en un vaso de precipitados con el fondo completamente pulido se colocan 5 ml de TMOS, 6 ml de metanol y 2.4 ml de agua y se somete a agitación mecánica, a esta mezcla se le adicionan 0.4 ml de una mezcla que contiene 50 mg de CS, 0.25ml de NH_4OH $1.3 \cdot 10^{-6}\text{M}$ y 9 ml de metanol, todo ello se lleva a un volumen total de 18 ml de metanol. El recipiente se recubre entonces con una película de plástico y se mantiene a T^a ambiente y en reposo. Cuando gelifica (aprox 3 días) se perfora la cubierta plástica para facilitar la evaporación de los disolventes y la obtención de un vidrio de peso constante (aproximadamente 2 semanas). Una vez obtenido, el vidrio sol-gel se moltura, tamiza y se lava con disolventes de diferente naturaleza para observar si existe pérdida o no de colorante, quedando así preparado para su utilización.

2.2.1.4. Inmovilización de CS en gel de sílice. El procedimiento seguido para la obtención de esta fase reactiva es una variación del descrito por Prseslakowski(257) que se basa en la formación de un par iónico entre el colorante R nitroso sal y el reactivo Aliquat 336, este par iónico se extrae en fase orgánica y se une a la gel de sílice. Dado que tanto el reactivo utilizado por estos autores como el CS poseen al menos un grupo sulfónico se pensó en la posibilidad de inmovilización de CS modificando adecuadamente las cantidades mencionadas para la formación del par iónico CS-Aliquat 336.

La gel de sílice normalmente presenta el catión Fe(III) como impureza mayoritaria, para eliminarla se procede a su lavado con HCl 3M hasta que la reacción de las aguas de lavado con sulfocianuro amónico indique la ausencia del catión férrico. Este lavado con HCl origina una elevada concentración de iones cloruros que se eliminan lavando con agua repetidas veces hasta la reacción negativa con nitrato de plata de las aguas de lavado. Por último se seca la gel de sílice en estufa a 105°C , quedando entonces preparada para unirse al par iónico formado entre el reactivo CS y Aliquat 336. Para la obtención de dicho par iónico se prepararon disoluciones acuosas de CS en distintas concentraciones y mezclarlas con las cantidades correspondientes de Aliquat 336 0.1M en cloroformo. Se agitan bien y se separan ambas fases, la fase orgánica (que contiene el par iónico) se filtra a través de un filtro de celulosa para eliminar cualquier presencia de agua.

La gel de sílice servirá de soporte para el reactivo así formado, para ello se mezclan 25 ml de esta fase orgánica con 2.5 gr de gel de sílice y se agita mecánicamente durante 30 minutos. Se forma de esta manera una fase reactiva quelatante aniónica. La gel

de sílice y el reactivo se dejan en reposo uno o dos días y el exceso de cloroformo se elimina mediante un desecador a vacío. La fase reactiva es de color rojizo y de aspecto pulverulento, se lava con disoluciones de diferente naturaleza para eliminar el exceso de colorante no fijado y se tamiza con una luz de malla de 0.16mm..

2.2.2. INMOVILIZACION DE PIOVERDINA

Las medidas de fluorescencia efectuadas en este trabajo están basadas en la utilización de un reactivo de origen natural biosintetizado por las bacterias *Pseudomonas fluorescens* llamado pioverdina que se incluye en el grupo de sideróforos. Se seleccionaron dos tipos de interacciones diferentes de la pioverdina en dos tipos de soportes con el fin de comparar su comportamiento como fase reactiva y por ello se inmovilizó pioverdina en vidrio de poro controlado y en vidrio sol-gel implicando el primer soporte un enlace covalente y el segundo un atrapamiento físico del pigmento en las cavidades existentes en una matriz de sílice formada a temperatura ambiente a partir de precursores alcóxidos.

2.2.2.1. Inmovilización de pioverdina en vidrio de poro controlado. El procedimiento seguido para inmovilizar covalentemente el sideróforo en el vidrio de poro controlado requiere en primer lugar la *activación del vidrio de poro controlado*. De los numerosos procedimientos descritos en la bibliografía para llevar a cabo la activación del vidrio, en el presente trabajo, se ha elegido la reacción con glutaraldehído como agente entrecruzante del vidrio previamente alquilaminado, para llevar a cabo la fijación del pigmento por un extremo aminado (258).

Se pesaron 0.2 g de CPG (240 A y 460 A) y se tratan con 10 ml de HNO₃ al 5% a ebullición durante 30 min, a continuación el vidrio de poro controlado fue filtrado en una placa filtrante de vidrio, lavado con agua desionizada y secado en un horno a 95°C. La preparación del agente aminoalquilante en medio acuoso se llevó a cabo asdicionando 1 ml de 3-aminopropiltriethoxisilano a 9 ml de agua desionizada y ajustando el pH a 3.45, la mezcla se mantuvo a 75°C en un baño de agua durante 150 min. lo que proporciona la existencia de grupos amino en la superficie del vidrio. El vidrio fue filtrado con una placa filtrante de tamaño de poro G4 y lavado y secado como se indicó anteriormente. Este procedimiento se repite una vez más para asegurar la mayor proporción de grupos aminos

en la superficie del vidrio. En estas condiciones el vidrio así tratado puede ser almacenado o utilizado para la unión del reactivo elegido.

El agente entrecruzante, glutaraldehído al 2.5% se preparó adicionando 2.5 ml de glutaraldehído 50% a un tampón MES (0.05 M, pH 6.8) y diluyendo a 50 ml con la disolución tampón. 1 ml de esta disolución fue añadido a 0.2 g de vidrio alquilaminado, en un vaso con cierre hermético, a través de cuyo tapón se burbujeó argón para eliminar el oxígeno de la disolución. La reacción prosigue durante 1 hora a temperatura ambiente, con breves desoxigenaciones con flujo de argón cada 10 minutos durante los 30 primeros minutos. El vidrio así activado se lavó con agua desionizada.

Inmovilización de la pioverdina: se prepara una disolución de pioverdina de una concentración conocida ($6.65 \cdot 10^{-4}M$, $9.75 \cdot 10^{-5}M$ y $6.5 \cdot 10^{-5}M$.) en tampón MES 0.05M, pH 6) a 4°C y se adicionó al vidrio activado, burbujeando con una corriente de argón como se indicó anteriormente. La mezcla se mantuvo a 4°C durante dos horas y media. Una vez finalizado este proceso las bolitas de vidrio se lavan con agua para eliminar el exceso de sideróforo no fijado. La cantidad de pigmento inmovilizado se calcula dado que tanto la disolución inicial de pioverdina como la disolución final y aguas de lavado se analizan espectrofotométricamente.

El vidrio con el pigmento inmovilizado fue empaquetado en una célula de flujo de cuarzo para medidas de fluorescencia (Hellma 176.52).

2.2.2.2. Formación de vidrio dopado con pioverdina por procedimiento sol-gel. El atrapamiento físico del pigmento en el interior de una matriz de sílice se ha llevado a cabo mediante la formación de un vidrio a temperatura ambiente por el procedimiento denominado sol.gel (106); para ello 1ml de tetrametoxisilano (TMOS), 1.2 ml de metano y 1,5 ml de agua se mezcla y agita (5 min) en un vaso de precipitados, a continuación se añaden 0.08 ml de una disolución acuosa de pioverdina $10^{-3}M$ y se cubre el recipiente con papel de plata hasta que se llegue al punto de gelificación (se observa una ligera opalescencia) perforando entonces la cubierta de papel para facilitar la evaporación de los disolventes y el curado o envejecimiento del vidrio (aprox 2 semanas). Una vez transcurrido este tiempo (en el que se ha ido controlando el peso del cristal) y con un cristal de peso constante se somete a vacío durante 24 h para facilitar la evacuación de los

disolventes de los poros y cavidades formadas en la matriz de sílice donde se alojan las moléculas del sideróforo.

Una vez obtenido el cristal se pulveriza y se hace pasar por diferentes tamaños de malla, a continuación se sumerge en diferentes disolventes observándose que el reactivo atrapado no se lava (determinación fluorimétrica de las aguas de lavado). En estas condiciones la fase sólida está dispuesta para introducirse en la célula de flujo conveniente y llevar a cabo las medidas de luminiscencia.

El vidrio obtenido puede utilizarse tal cual o molturarlo para obtener una mayor superficie de contacto y por supuesto un menor tiempo de respuesta. Análogamente en cada serie probada se efectuaba un blanco (ausencia de pioverdina) para control. Este vidrio así obtenido era incoloro y transparente mientras que en presencia del reactivo el cristal era algo más opaco y de color verde.

2.3. REALIZACIÓN DE MEDIDAS PARA LA DETERMINACIÓN DE DIVERSOS ANALITOS.

2.3.1. DETERMINACIÓN DE ALUMINIO MEDIANTE UN SENSOR DE REFLECTANCIA.

Las medidas se han realizado de dos formas diferentes: formando el complejo previamente en tubo de ensayo o bien formándolo "in situ" en la célula de reacción. El establecimiento de las condiciones óptimas de medida se ha llevado a cabo siguiendo el primer procedimiento, mientras que el estudio de las características analíticas se ha efectuado según el segundo procedimiento. Los dispositivos de medida empleados se describen en el apartado II.2.1.1. (dispositivo 1). La señal analítica está constituida por la diferencia de reflectancia a la λ seleccionada entre blanco y muestra.

2.3.1.1. Primer procedimiento: La resina con el reactivo Cromazurol S inmovilizado se bombea desde un medio acuoso, por medio de la bomba peristáltica, hasta el hueco que existe en la célula de flujo para tal fin. Una vez que se rellena este hueco se introduce todo el conjunto en un recipiente negro que tiene 3 orificios, uno para la entrada

de la fibra, y otros dos laterales para la entrada y salida de los tubos de silicona empleados para el bombeo (Figura 32).

En este momento, se toma la medida de reflectancia en el multivoltímetro digital, a la λ de onda y rendija seleccionadas (660 nm). Posteriormente se realiza la medida de la muestra, para ello se tiene que disponer del complejo ya formado. La formación del complejo se realiza de la siguiente forma: en un tubo de ensayo se pone 0.2 g de resina, 5 ml de HMTA 0.2 M pH=5.0 y la cantidad requerida del analito Al(III), se espera aproximadamente 24 horas y una vez formado el complejo, se rellena la célula de flujo como ya se ha expuesto, realizándose entonces la medida de la reflectancia a 660 nm.

3.1.2.- Segundo procedimiento, en flujo: la célula de flujo se rellena con la resina que lleva inmovilizado el reactivo CS como en el primer caso, depositándola en el hueco existente en la célula para tal fin, en un extremo de este hueco se coloca una membrana de nylon para impedir que la fase sólida se desplace al paso del flujo de disoluciones. El orificio de entrada de flujo se rosca un tornillo que conecta la célula de flujo con el tubo de silicona que aporta las disoluciones a través de la bomba peristáltica. En el orificio superior de la célula se encuentra el haz de fibra óptica.

Una vez empaquetada, se pasa a su través la disolución reguladora, HMTA 0.2 M a pH=5.0 durante un minuto, tomándose la medida en el multivoltímetro digital, ésta constituye el "blanco". A continuación se pasa a través de la célula la disolución de Al(III) de la concentración deseada, que se encuentra al pH óptimo en HMTA 0.2 M; transcurridos cinco minutos se toma la lectura correspondiente, a la misma λ y con la misma rendija que para el blanco.

Una vez efectuada esta medida, se procede a lavar la célula de flujo, limpiando cuidadosamente su interior para que no queden restos de la resina anteriormente medida (puesto que podría interferir en la siguiente medida). Se pasa durante un minuto HCl 1M y a continuación agua desionizada durante 5 minutos más para que el interior de la célula no quede con pH ácido y ésto interfiera en la medida de las sucesivas resinas.

Las disoluciones con y sin analito pasan a través de la célula durante un tiempo determinado obteniéndose entonces la medida de reflectancia. La célula se lava y se

procede a colocar otra porción de fase sólida en la forma anteriormente indicada para proceder a la realización de otra medida.

2.3.2.- DETERMINACIÓN DE Fe(III) MEDIANTE UN SENSOR DE REFLECTANCIA.

El soporte sólido con el reactivo Cromazurol S inmovilizado se introduce a través de una jeringa en el hueco que existe en la célula de flujo para tal fin (Figura 35). Una vez empaquetado para que quede completamente compacto se enrosca la célula en el terminal de la fibra óptica por uno de los tres orificios de los que consta la célula; los otros dos laterales son utilizados para la entrada y salida de los tubos de silicona empleados para el bombeo.

El modo de operar será ir pasando sucesivamente distintas disoluciones (analito, regenerante, disolución reguladora y sucesivamente) e ir registrando la reflectancia frente al tiempo a la longitud de onda seleccionada. La señal obtenida, intensidad de reflectancia, frente al tiempo variará en función de la disolución que está pasando en este instante por la célula.

El calibrado se obtiene representando las pendientes de la función que relaciona la disminución de la reflectancia con el tiempo frente a la concentración de analito. Dependiendo de la concentración del mismo se observa mayor ó menor pendiente en la disminución de la intensidad de reflectancia.

El procedimiento seguido una vez empaquetada la fase sólida es el siguiente: se pasa a su través la disolución reguladora (HAc/Ac⁻ pH= 4 - 5) durante unos cinco minutos tomándose a continuación la medida de la reflectancia en el espectrofotómetro, esta medida constituirá nuestro blanco y sirve de referencia para las posteriores medidas de reflectancia. A continuación se bombea durante 5 minutos una disolución con un contenido en hierro variable (25 a 500 ng/ml) en regulador HAc/Ac⁻ pH 4.2 a un flujo de 1 ml/min. La señal de reflectancia medida a 680 nm se registra frente al tiempo. El sistema se regenera pasando durante 30 sg HCl 1M y recuperando de nuevo la línea base con la disolución reguladora. En estas condiciones ya se puede medir otra concentración de Fe(III).

Las **muestras de agua** analizadas, convenientemente conservadas, se filtran, diluyen (si es necesario) y se tamponan a pH 4.5 para su posterior medición siguiendo el mismo procedimiento del calibrado.

2.3.3.- DETERMINACIÓN DE Fe(III) MEDIANTE MEDIDAS DE LUMINISCENCIA

En primer lugar se procede a rellenar la célula de flujo (Figura 39) con la fase reactiva, para ello se introduce una malla de nylon por el orificio de entrada de flujo que se ajusta al extremo inferior de la cubeta, a continuación y con la ayuda de una jeringa se introduce la fase sólida en suspensión que queda retenida procurando que la altura de la "minicolumna" no exceda las dimensiones del paso óptico.

2.3.3.1.-Medidas en flujo continuo. Este procedimiento de medida se ha llevado a cabo utilizando como fases reactivas tanto vidrio de poro controlado como vidrio sol-gel. En ambos casos se procede de la siguiente manera: se bombean con un flujo de 5 ml/min. (CPG) o 1.8 ml/min. (sol-gel) a través de la célula de flujo disoluciones de diferente naturaleza: disolución reguladora (bifalato 0.01M pH 4.5 si el soporte es CPG o MES 0.05M, pH 6.5 en el caso del sol-gel) responsable de la línea base, disoluciones con contenido variable en Fe(III) (10-200 ng/ml para CPG y 10-300 ng/ml en sol-gel) y disolución regeneradora HCl 1M. Se registra entonces la intensidad de fluorescencia (emisión a 550 nm con excitación a 500 nm para CPG y emisión a 405 nm con excitación a 330 nm para sol-gel) frente al tiempo observándose una disminución de ésta cuando la fase sólida está en contacto con las disoluciones que contienen hierro, por formación del complejo Fe(III)- pioverdina.

La disolución que contine Fe(III) se bombea durante 2 minutos, una vez formado el complejo se pasa la disolución regeneradora durante 1 minuto y después la disolución reguladora para restablecer la línea base quedando la fase reactiva así dispuesta para otros ciclos de medida.

La gráfica de calibrado se obtiene representando la pendiente del decrecimiento de la intensidad de fluorescencia (durante dos minutos de reacción con hierro) frente a la concentración de hierro.

Las muestras de agua convenientemente conservadas (adición de ácido 1% y refrigeradas) y filtradas se diluyeron convenientemente (si es necesario) con la disolución reguladora (biftalato/ftalato 0.01M pH 4.5 cuando la fase sólida es CPG o MES 0.05M, pH 6.5 cuando se utiliza sol-gel como soporte) y se monitorizó su señal analítica en el calibrado.

2.3.3.2. Sistema de inyección en flujo: La fase reactiva utilizada en este procedimiento fue pioverdina atrapada en una matriz de sílice por proceso sol-gel. El procedimiento de medida es similar al caso anterior, se pone en contacto la fase sólida en primer lugar con la disolución reguladora para obtener una línea base, a continuación se inyecta (250 μ l - 1000 μ l) de una disolución con contenido variable en hierro (0.2 - 0.9 μ g/ml) y la disolución regeneradora HCl 1M. En este caso se observa una disminución de la intensidad de fluorescencia cuando el "bolo" de muestra entra en contacto con la fase reactiva que alcanza un valor constante. El complejo Fe(III)-pioverdina se rompe con la disolución regeneradora, la disolución reguladora establece de nuevo la línea base para las posteriores inyecciones. El flujo de las diferentes disoluciones reguladoras es de 1.2 ml/min.

La gráfica de calibrado se obtiene en este caso representando el incremento (diferencia) existente entre la intensidad de fluorescencia de la disolución reguladora (línea base) y la del complejo Fe-pioverdina frente a la concentración de hierro.

Determinación de hierro en muestras de suero Las muestras de suero liofilizadas (Cromatest T) se guardaron a 4°C y se reconstituyeron siguiendo las instrucciones: se añade 5 ml de agua destilada a la muestra liofilizada y se agita, la disolución así obtenida puede utilizarse inmediatamente o congelarse para su uso posterior.

El Fe(III) presente en el suero como complejo con las proteínas, debe ser liberado para su análisis. Se siguió un procedimiento estándar (cita) para la ruptura del complejo sin precipitación de proteínas: se tratan 0.3 ml de suero con 1.5 ml de tampón acetato 0.8M pH 4.5 (se obtiene una disolución de color amarillo) y se centrifuga en una unidad de filtración Millipore Ultrafree-CL que contiene un filtro donde moléculas mayores de 5000 dalton quedan retenidas. El ión férrico pasa a través del filtro (disolución incolora) y se procede a su análisis por el método de adiciones estándar en un sistema FIA.

2.3.4.- DETERMINACIÓN DE pH MEDIANTE MEDIDAS DE FLUORESCENCIA

2.3.4.1. Medidas en flujo continuo. Las medidas llevadas a cabo para la determinación de pH se han desarrollado en flujo. El procedimiento seguido fue el siguiente: se bombean a través de la célula de flujo disoluciones con diferente pH registrándose en todo momento la variación de la intensidad de fluorescencia de la fase reactiva (pioverdina atrapada en vidrio sol-gel con emisión a 405 nm tras excitación a 330 nm). Las medidas se han llevado a cabo con el dispositivo 2 descrito en el apartado II.2.1.2.

3.4.1. Valoraciones. Las valoraciones se han llevado a cabo con un sistema en flujo cerrado (Figura 40) . Simultáneamente al registro de la variación de la intensidad de fluorescencia por la adición del reactivo adecuado, se efectuaba la valoración potenciométrica con la misma disolución que luego se pasaba por el sistema en flujo.

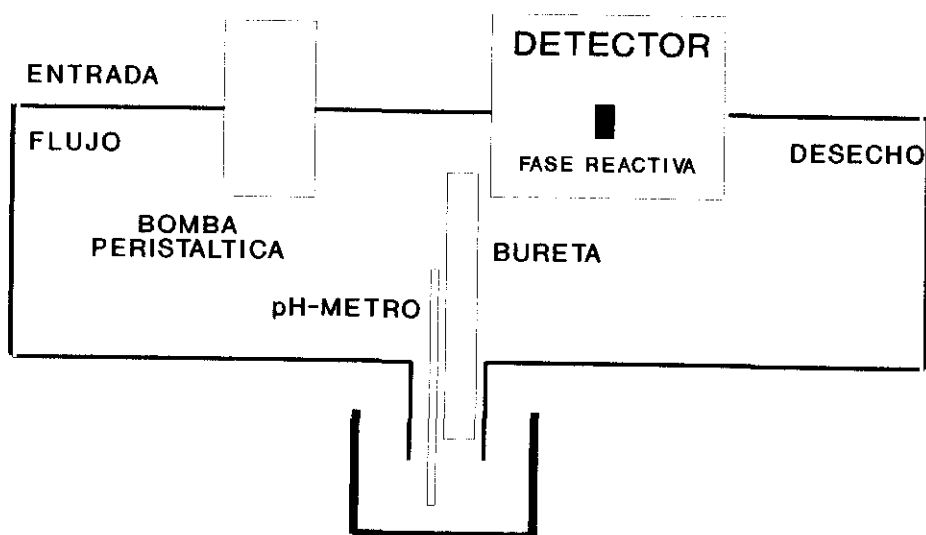


Figura 40. Sistema en flujo cerrado utilizado para valoraciones.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SENSOR DE REFLECTANCIA EN FLUJO CONTINUO PARA LA DETERMINACION DE Al (III) CON CROMAZUROL S (CS) INMOVILIZADO.

La determinación de Al(III) es de gran importancia en la actualidad dado por una parte su extensión en la naturaleza como elemento mayoritario y por su efecto tóxico sobre el ser humano.

Según hemos visto anteriormente el reactivo CS ha sido utilizado con relativa selectividad y sensibilidad para la determinación de este ión espectrofotométricamente por la formación de un complejo coloreado en disolución. Por esta razón se pensó en emplear este reactivo inmovilizado como base de un "terminal sensible" en un sensor óptico en flujo para monitorizar este analito por medidas de reflectancia.

1.1. FASE REACTIVA: CS INMOVILIZADO EN SOPORTES POLIMÉRICOS

1.1.1. ESTUDIO DE LA INMOVILIZACIÓN DEL REACTIVO.

Según se mencionó en el Apartado II.1.1.1. el reactivo indicador cromazurol S se puede encontrar con cargas tanto positivas como negativas o bien en forma neutra según el pH del medio; por ello se estudiaron distintos tipos de soportes poliméricos para su inmovilización, intercambiadores catiónicos (Dowex 50-WX2, IR 122, IR 120), intercambiadores aniónicos (Dowex 1-X2, Dowex 1-X4, Dowex 1-X8, Dowex 1-X10, IRA 400) y resinas neutras (DVB).

1.1.1.1.- Ensayos cualitativos. En la elección del soporte polimérico más adecuado se han de tener en cuenta varios factores: 1) que se fije bien el colorante a la resina y que no se pierda incluso en condiciones extremas de acidez, fuerza iónica, etc, y 2) que el reactivo inmovilizado conserve las mismas o semejantes propiedades respecto al analito que cuando se encuentra en disolución.

Dado que el CS reacciona con el Al(III) formando un complejo de distinto color que el suyo propio, se realizaron los siguientes ensayos para comprobar si la fijación del indicador a la resina ha sido eficaz: se somete la resina a diferentes pH en presencia y en ausencia de una concentración de Al(III) de 5 ppm, observándose cualitativamente por un lado si el reactivo se desadsorbe de la resina y si ésta cambia de color. Los resultados cualitativos obtenidos en este ensayo se exponen en la tabla 9

Tabla 9: Ensayos cualitativos de la formación del complejo CS-Al(III) utilizando diferentes soportes a distintos pH.

	SOPORTE	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
X12	Blanco	Morado	Granate	Granate	Granate	Marrón	Naranja
	CS-Al(III)	*	Lila	Azul	Azul	Azul	Marrón
X14	Blanco	Morado	Marrón	Granate	Granate	Marrón	Naranja
	CS-Al(III)	*	*	Azul	Azul	Azul	Pardo
X18	Blanco	Morado	Lila	Granate	Granate	Marrón	Naranja
	CS-Al(III)	*	*	*	Lila	*	*
1X10	Blanco	Morado	Morado	Granate	Marrón	Marrón	Naranja
	CS-Al(III)	*	*	*	Lila	*	Marrón
50WX2	Blanco	Naranja	Naranja	Granate	---	Marrón	Marrón
	CS-Al(III)	*	*	Rosa	---	Azul	Gris
DVB	Blanco	Rosa	Rosa	Rosa	---	---	Verde
	CS-Al(III)	Verde	Azul	Azul	---	---	Azul
IR-120	Blanco	Naranja	Naranja	Naranja	Marrón	Marrón	Naranja
	CS-Al(III)	*	*	*	*	*	*
IRA-400	Blanco	Morado	Morado	Morado	Naranja	Naranja	Naranja
	CS-Al(III)	*	*	*	Marrón	Marrón	Marrón
IR-122	Blanco	---	---	---	---	---	---
	CS-Al(III)	---	---	---	---	---	---

A partir de los datos en la tabla 9 se pueden establecer que las mayores diferencias de color entre el reactivo inmovilizado en presencia de aluminio y su blanco correspondiente, se presenta en las resinas de intercambio aniónico y a pH intermedios (4-6), observándose la máxima variación de color para la resina Dowex 1-X2 a pH 5.

En los polímeros neutros se observan coloraciones muy débiles con diferencias entre el blanco y muestra casi inapreciables. No obstante es interesante destacar que en estas resinas hay inmovilización del reactivo y que varían sus propiedades analíticas respecto a las que presenta en solución acuosa.

En las resinas de intercambio catiónico se obtienen dos comportamientos diferentes: en la IR 122 no se retiene el reactivo, en cambio en la Dowex 50W-X2 sí se fija el indicador, pero la diferencia de color entre el blanco y el complejo es mínima.

Como conclusión de esta parte del estudio (ensayos cualitativos) se obtiene:

- 1) que la resina de intercambio aniónico más idónea es la **Dowex 1-X2** y
- 2) que el **pH 5** es el más adecuado para la formación del complejo en fase sólida.

1.1.1.2. Estudio de parámetros que afectan a la inmovilización. A pesar de obtener buenos resultados en los ensayos cualitativos anteriores, se llevó a cabo un estudio en que se varían algunos parámetros con el fin de exaltar las diferencias de color entre el complejo y el reactivo inmovilizado. Estos parámetros fueron:

Tiempo de contacto de la resina con el reactivo. Se llevó a cabo un estudio en el que se fue aumentando el tiempo de agitación entre la resina y el CS, comprobándose que una agitación de 1 hora es suficiente para conseguir la inmovilización del reactivo y obtener una buena respuesta frente al aluminio.

Concentración de CS. Se prepararon disoluciones acuosas del reactivo al 0.1, 0.2, 0.4 y 0.6% de CS. A continuación se procedió a inmovilizar el reactivo en la resina Dowex 1-X2 de la forma descrita en el Apartado II.2.2.1.1. una vez inmovilizada se observó su comportamiento a diferentes pH en presencia y ausencia de aluminio, obteniéndose los datos reflejados en la tabla 10.

Con CS al 0.4 y 0.6% se obtienen colores de tonalidad muy oscura siendo menos adecuadas para medidas de reflectancia. La solución al 0.2% proporciona coloraciones apropiadas pero no representa ventajas frente a la solución de 0.1%, por ello para trabajar posteriormente se seleccionó una concentración de CS del 0.1%.

Tabla 10. Ensayos cualitativos de la formación del complejo CS-Al(III) utilizando diferentes concentraciones de CS.

CONCENTRACIÓN		pH 3	pH 4	pH 5	pH 6
0.1%	Blanco	Granate	Granate	Granate	Granate
	CS-Al(III)	Lila	Azul	Azul	Azul
0.2%	Blanco	Morado	Granate	Granate	Marrón
	CS-Al(III)	"	"	"	"
0.4%	Blanco	Morado	Morado	Morado	Morado
	CS-Al(III)	"	"	Lila	Lila
0.6%	Blanco	Morado	Morado	Morado	Morado
	CS-Al(III)	"	"	Lila	Lila

Fuerza iónica. Se procedió a observar si existía desadsorción del reactivo inmovilizado CS al 0.1% variando la fuerza iónica del medio. Para ello, se colocó la misma cantidad de resina en diferentes tubos de ensayos a los que se añadió NaClO_4 en diferentes concentraciones 0.01 M - 1M, observándose que el reactivo no se desadsorbía en ninguno de los casos.

Lavado de la resina. En el proceso de inmovilización después de la agitación mecánica, la resina con el CS inmovilizado se lava para eliminar el exceso de colorante. Se procedió a lavar de distintas maneras la resina para además de eliminar el reactivo no soportado, evitar que el reactivo se desadsorba una vez que la resina está en contacto con la solución que contiene el analito. De esta forma la formación del complejo aseguramos la formación del complejo CS-Al(III) sólo en la fase sólida (resina) y no en la acuosa. Por ello se lavaron las resinas con agua bidestilada, NaOH y HCl.

Tamizado de la resina. Para finalizar se resaltaré la importancia del tamizado de la resina que aporta las ventajas tales como la aproximación a una superficie mate ideal disminuyendo entonces la componente de luz reflectada especularmente y aumentando la radiación dispersa difusamente. También se reduce la movilidad de las partículas, disminuyendo las fluctuaciones, y por otro lado se asegura un ángulo de incidencia de luz

constante sobre la superficie de la resina lo cual es muy importante puesto que la reflectancia difusa sigue la ley de Lambert-Cosine:

$$R = \frac{\cos \phi * \cos \theta}{\pi}$$

donde ϕ y θ son los ángulos de incidencia y observación respectivamente. Para un ángulo de observación dado, la reflectancia depende pues, del ángulo de incidencia.

1.1.2. ESTUDIO PARA LA DETERMINACIÓN DE Al (III).

1.1.2.1. Estudio de las características espectrales. Este estudio se llevó a cabo realizando los espectros de reflectancia desde 400 a 750 nm del blanco de reactivos (resina + CS inmovilizado + disolución reguladora) y del complejo CS-Al(III) en fase sólida, con el dispositivo 1 del apartado II.2.2.1.1. El estudio se efectuó formando los complejos previamente en un tubo de ensayo para unas concentraciones de Al(III) que variaban de 0.5 a 5 ppm, y rellenando posteriormente la célula de flujo con el sólido obtenido. Se trabajó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.1.1.

En primer lugar se obtuvo el espectro de la lámpara empleada. Este espectro se encuentra en la Figura 41. En ella se representa la intensidad de reflectancia (I_R) en unidades arbitrarias frente a la longitud de onda.

Posteriormente, se registraron en las mismas condiciones los espectros del blanco y del complejo. El espectro del blanco presenta un primer máximo de reflectancia a 690 nm y otro segundo a 760 nm, mientras que el del complejo presenta un ligero desplazamiento del primer máximo hacia λ mayores (700 nm) acompañado de un efecto hipocrómico, mientras que la λ del segundo permanece prácticamente constante pero varía ligeramente su intensidad. Este comportamiento se acentúa al aumentar la concentración de aluminio (Figura 42).

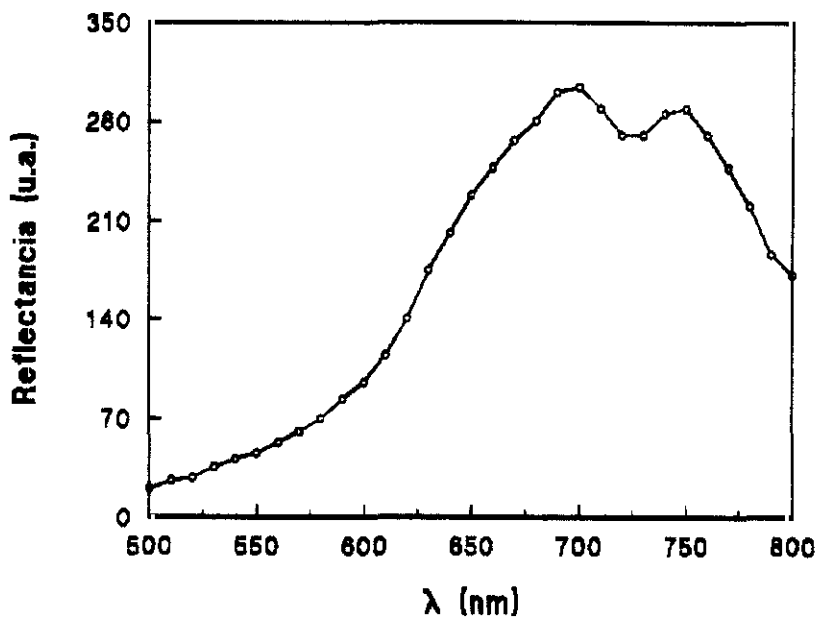
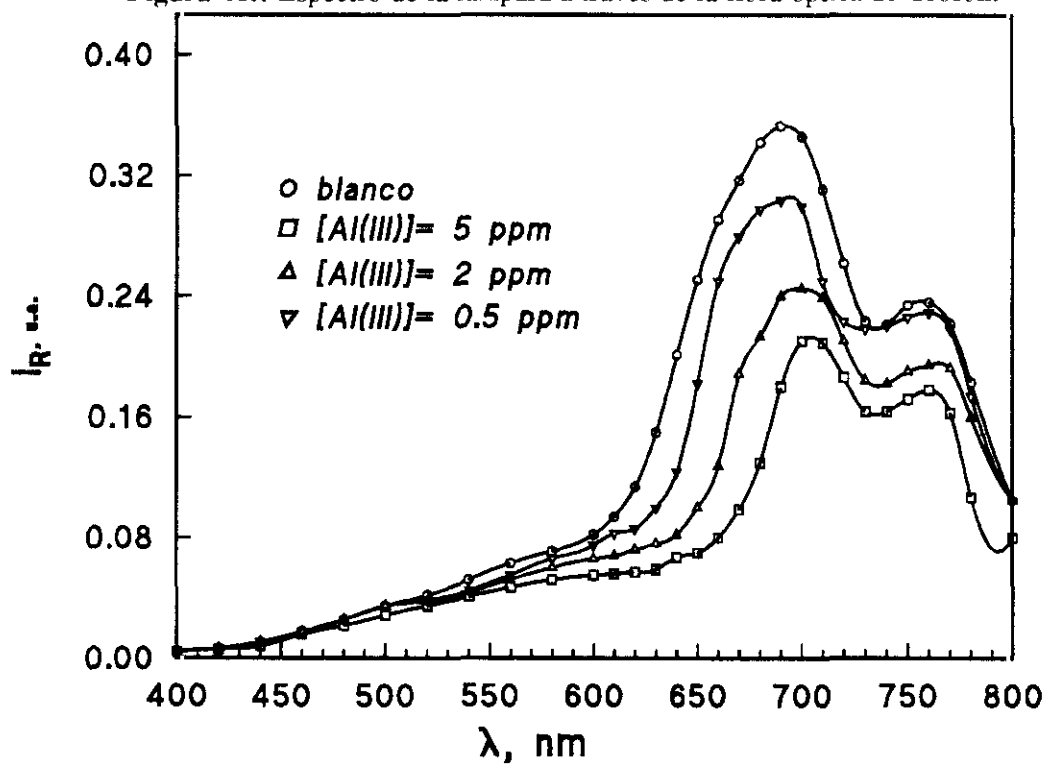


Figura 41.. Espectro de la lámpara a través de la fibra óptica de Crofon.

Figura 42.. Espectros de reflectancia de la fase reactiva en presencia de cantidades creciente de aluminio Al(III) 0.5 μ g/ml, 2 μ g/ml, 5 μ g/ml.

Según se observa en los espectros (figura 42) la mayor diferencia de intensidad de reflectancia entre el blanco y el complejo CS-Al(III) formado en fase sólida aparece en la región del espectro comprendida entre 620 y 700 nm. Se eligió una longitud de onda de 660 nm para realizar las medidas ya que presentaba la máxima diferencia en I_R y además se aleja más de la zona en que decae la transmisión de la luz por la fibra, cosa que ocurre en el Infrarrojo cercano.

1.1.2.2. Efecto del pH, naturaleza y concentración de la disolución reguladora.

Como ya se ha expuesto en el apartado anterior, el pH influye considerablemente sobre la formación del complejo CS- Al(III), habiéndose obtenido un intervalo óptimo entre pH= 4-6. Por otra parte a partir de la bibliografía consultada (243) se conocía que este complejo en disolución se forma a un pH óptimo de 4.9 en hexamina, pero debido a que, por regla general no coincide el medio más adecuado para la formación del complejo en estado sólido con el más idóneo en disolución, se efectuó este estudio variando el pH dentro del intervalo previamente seleccionado.

Las disoluciones empleadas para conseguir el pH deseado fueron HCl pH 3, HAc/Ac⁻ (0.05 M) pH4 y 5 , y por último H₂MTA⁺/HMTA (0.05 M) pH= 5 y 6.

Aquellos medios que dieron lugar a reacciones más contrastadas fueron empleados para llevar a cabo las medidas de reflectancia con objeto de elegir el pH que diera lugar a una mayor diferencia entre el blanco y muestra (λ 660 nm). El estudio se llevó a cabo con una disolución que contenía 5 μ g/ml de Al(III).

Para asegurarse que los cambios de color entre blanco y complejo no son debidos a pequeñas variaciones de pH entre ellos, se ajustó, inicialmente en el pH-metro, el pH del blanco (disolución reguladora) y de la solución que contenía Al(III) a un mismo valor (pH objeto de estudio), es entonces cuando se añade la misma cantidad de resina con el reactivo inmovilizado a cada tubo de ensayo, en estas condiciones las variaciones de color observadas se deben sólo y exclusivamente a la formación del complejo Al(III)-CS en la fase sólida. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 11 y en la figura 43.

Tabla 11. Coloraciones observadas de la fase reactiva en presencia y ausencia de analito a distintos pH y con diferentes disoluciones reguladoras.

Medio	pH	Blanco	Complejo
HCl	3	Morado	Morado
HAc/Ac ⁻	4	Granate	Granate
HAc/Ac ⁻	5	Granate	Granate
H ₂ MTA ⁺ /HMTA	5	Granate	Lila
H ₂ MTA ⁺ /HMTA	6	Naranja-Marrón	Marrón

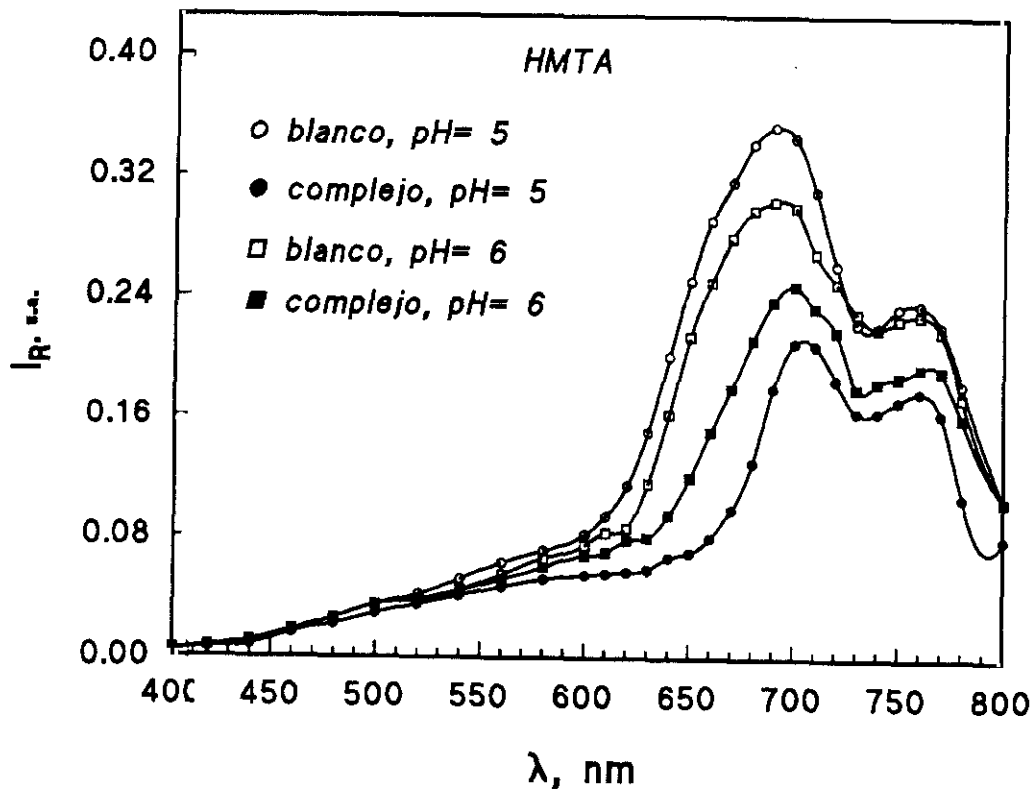


Figura 43. Espectros de reflectancia de la fase reactiva en ausencia y en presencia de Al(III) en presencia de H₂MTA⁺/HMTA a pH 5 y 6.

A la vista de los mismos, se deduce que es a un **pH 5.0** y en un medio $\text{H}_2\text{MTA}^+/\text{HMTA}$ donde se origina mejor el complejo.

Una vez resuelta la naturaleza del medio regulador idóneo, se procedió a determinar su concentración óptima, para ello se fue variando la concentración de HMTA desde 0.05M hasta 1.25M, preparando blancos y muestras en las mismas condiciones; una vez formado el complejo se observaron los cambios de color obtenidos, registrándose el espectro de reflectancia en cada caso. Las concentraciones superiores a 0.2 M no proporcionan un medio adecuado ya que si bien en ellas se formaba perfectamente el complejo daban lugar a una pequeña desadsorción del reactivo, coloreando la fase líquida ligeramente.

La Figura 44 muestra los resultados obtenidos, en ellas se observa que se produce una mayor diferencia entre blanco y muestra (λ 660 nm) para una concentración de HMTA de 0.2 M, por ello se seleccionó este medio como óptimo para los estudios posteriores.

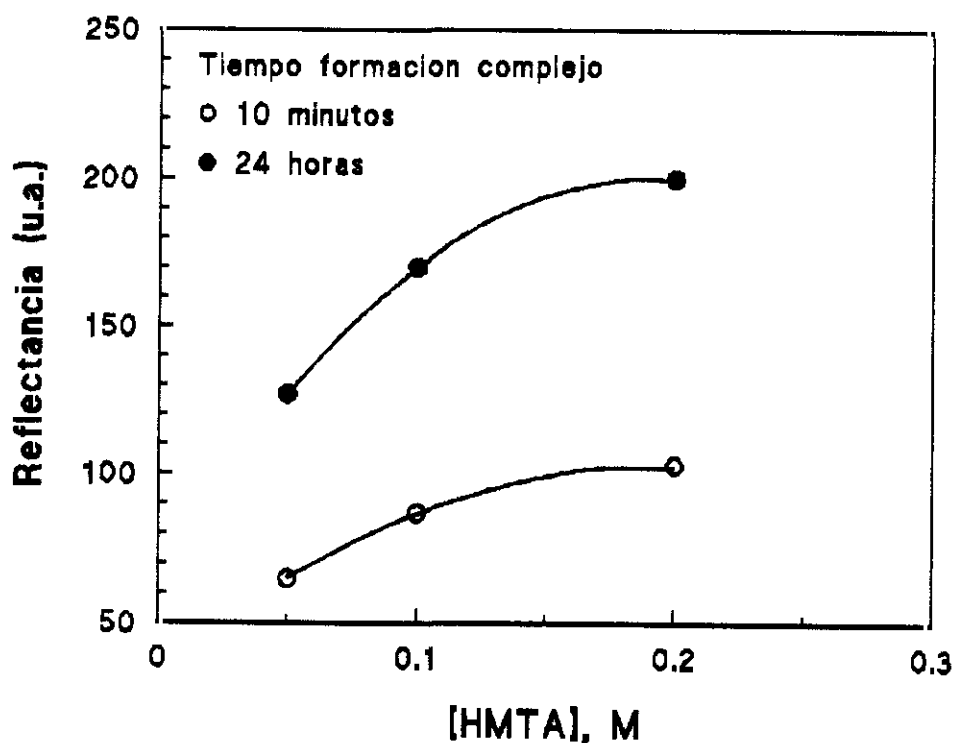


Figura 44. Intensidad de reflectancia respecto al blanco del complejo CS-Al(III), pH 5 [Al(III)] 2.5 $\mu\text{g/ml}$

1.1.2.3. Estudio del tiempo de respuesta. Las reacciones sobre una superficie sólida suelen ser de cinética más lenta que cuando la reacción transcurre en disolución puesto que tiene que darse un fenómeno de transferencia de masa hasta la superficie del sólido. Con el fin de conocer la cinética de la reacción entre el Al(III) y el CS inmovilizado, se llevó a cabo un estudio sobre el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de formación de dicho complejo.

Con esta finalidad se siguió el siguiente procedimiento: Se pesó en varios recipientes una serie de cantidades idénticas de resina Dowex 1-X2 conteniendo el reactivo inmovilizado, a continuación se añade la misma cantidad de disolución reguladora (HMTA 0.2 M pH 5) y los mismos microgramos de aluminio. Por último se registraron los espectros de reflectancia a distintos tiempos. El estudio se realizó para una concentración de aluminio de 5 $\mu\text{g/ml}$. En la Figura 45 se pueden observar los espectros obtenidos para tiempos que varían dentro del intervalo comprendido entre 10 min. y 48 h.

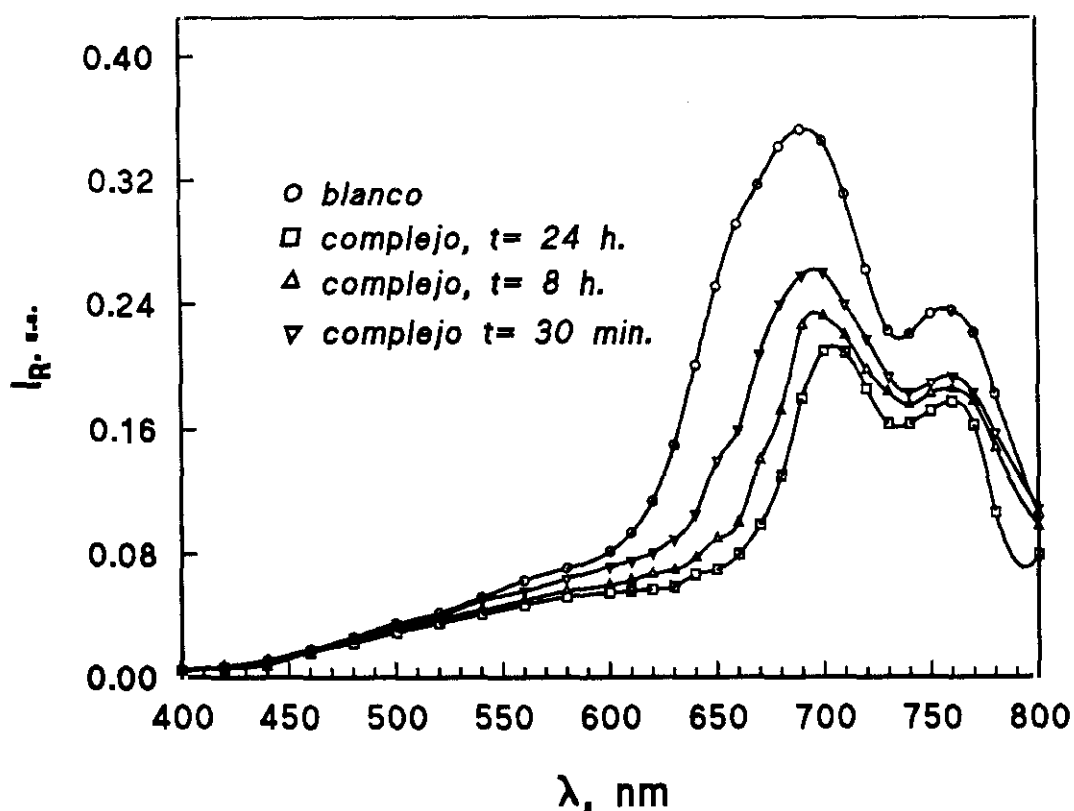


Figura 45. Espectro de reflectancia de la fase reactiva en ausencia y en presencia de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Al(III) en función del tiempo de formación del complejo.

Los resultados de estas medidas ponen de manifiesto que diferencia de intensidad de reflectancia entre blanco y complejo se puede considerar constante para tiempos iguales o mayores a 24 horas (tabla 12). Para tiempos inferiores a 24 h. la reacción de formación del complejo tiene lugar en menor extensión, existiendo diferencias poco significativas entre los espectros obtenidos.

Tabla 12. Diferencia de intensidad de reflectancia (en u.a.) entre blanco y complejo CS-Al(III) en función del tiempo de formación éste.

Tiempo	10 min.	30 min.	1h.	8h.	24 h.	48 h.
I_R (B-C)	0.112	0.110	0.112	0.180	0.210	0.215

Dado que el método no resulta operativo, debido a la lentitud de la reacción, se pasó a realizar las medidas pasando el analito de forma continua a través de la célula de flujo, ya que de esta forma se contrarresta sensiblemente este hecho debido a la preconcentración del mismo que tiene lugar sobre la superficie del sólido, lo que produce un aumento de la sensibilidad.

Este estudio se ha realizado haciendo pasar a través de la célula de flujo una disolución de 5 $\mu\text{g/ml}$ de Al(III) de forma continua y realizando las medidas de intensidad de reflectancia a distintos tiempos a una λ de 660 nm; de igual forma se operó con el blanco.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en la tabla 9. A la vista de los mismos se puede observar que de esta forma a los 5 minutos se obtuvo una señal superior a la que se conseguiría midiendo en el equilibrio. Por ello se eligió este procedimiento y un tiempo fijo de medida de 5 minutos para llevar a cabo los estudios posteriores.

Tabla 13. Diferencia de intensidad de reflectancia (en u.a.) de la fase reactiva en ausencia y presencia de 5ppm de Al(III) trabajando en equilibrio y en flujo

I_R (equilibrio)		I_R (en flujo)			
		<i>tiempo 5 minutos</i>		<i>tiempo 10 minutos</i>	
Blanco	Complejo	Blanco	Complejo	Blanco	Complejo
0.357	0.276	0.362	0.266	0.365	0.250

1.1.2.4 Efecto de la temperatura. La temperatura a la que se lleva a cabo una reacción influye en numerosas ocasiones sobre su cinética, por ello se realizó un estudio para conocer si en nuestro caso, un aumento de la temperatura aceleraba el proceso de formación del complejo CS-Al(III) en estado sólido.

Las temperaturas estudiadas fueron 27°C, 37°C y 45°C, las medidas se realizaron bombeando la disolución del blanco y del analito a través de la célula de reacción midiendo la I_R a un tiempo fijo dentro del intervalo comprendido entre 0 y 30 minutos. Tanto la célula de reacción como las disoluciones del blanco y del analito se situaron en un baño termostaticado a la temperatura deseada.

Los resultados obtenidos se encuentran representados en la tabla 14, en ella se puede observar que no existen diferencias significativas apreciables entre las distintas temperaturas en el tiempo en que se efectuó la medida, por ello se optó por trabajar a temperatura ambiente no siendo necesario termostaticar.

Tabla 14. Diferencia de intensidad de reflectancia entre blanco y complejo a distintos tiempos de formación y a diferentes temperaturas

Tiempo (min)	27°C	37°C	45°C
0	---	---	---
3	0.013	0.016	0.017
5	0.023	0.028	0.028
8	0.037	0.036	0.039
10	0.038	0.041	0.043
13	0.044	0.049	0.049
15	0.056	0.057	0.059
20	0.061	0.065	0.066
25	0.068	0.072	0.074
30	0.076	0.078	0.082

1.1.2.5. Regeneración La utilización de la fase reactiva para la determinación de aluminio en continuo requiere la posibilidad de regenerar el sistema, ello quiere decir que tras cada etapa de medida, en la que existe una disminución de reflectancia por formación del complejo del indicador inmovilizado con aluminio, debe recuperarse la señal inicial para proceder a una nueva determinación.

Como posibles regenerantes se ensayaron complejantes del aluminio (EDTA y F-) y medios ácidos, en los que cualitativamente se había observado que no se formaba el complejo. Los dos primeros medios proporcionaban la ruptura del complejo pero su formación de nuevo se produjo en muy pequeña extensión. La utilización de HCl 1M como disolución regenerante resultó satisfactoria puesto que tras el tratamiento de la fase reactiva con esta disolución durante un minuto y reestablecidas las condiciones de pH iniciales, la fase sólida formaba de nuevo complejos con aluminio.

1.1.2.6. Características analíticas.

1.1.2.6.1. Intervalo de linealidad Con el fin de determinar el intervalo de concentración de aluminio que proporciona una respuesta lineal en las medidas de reflectancia se realizaron dos tipos de calibrado:

a) *Calibrado* llevado a cabo en condiciones de *equilibrio*, para ello se formaron en tubos de ensayo los complejos CS-Al(III) para distintas concentraciones de aluminio (0.2 a 5 $\mu\text{g/ml}$) y se esperó un tiempo aproximado de 24 horas con el fin de desarrollar completamente el color, posteriormente se rellenó la célula de flujo y se realizó la medida de I_R a una λ de 660 nm. El calibrado resultó lineal hasta 2 $\mu\text{g/ml}$ de aluminio como se observa en la Figura 46.

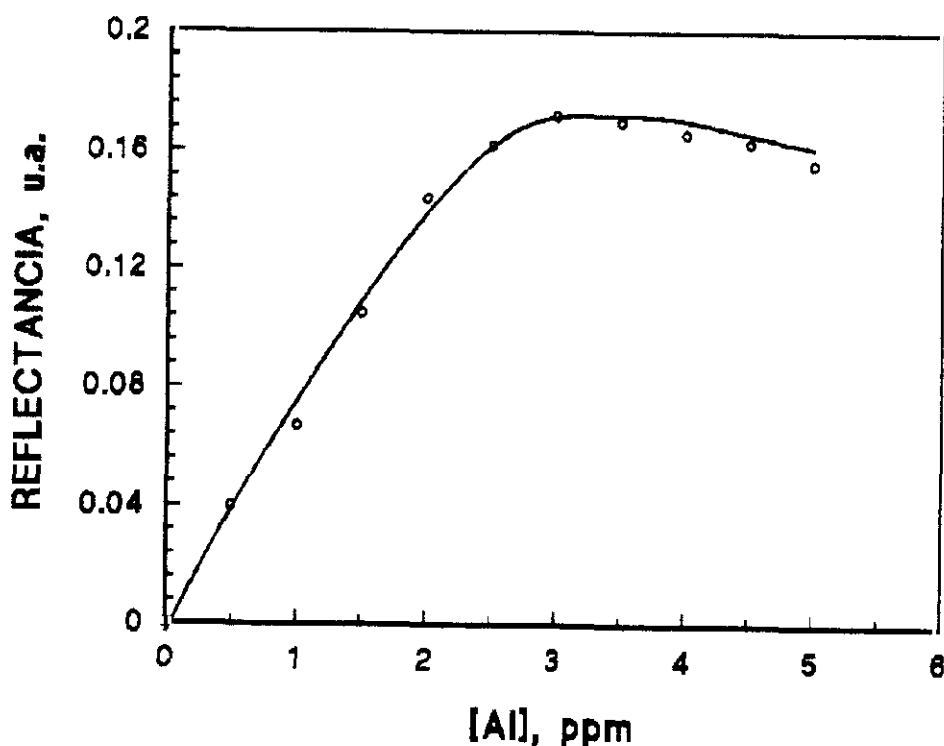


Figura 46. Intensidad de reflectancia del complejo CS-Al(III) frente al blanco en función de la concentración de aluminio. Tiempo de formación del complejo CS-Al(III) 24 h.

b) Calibrado obtenido en flujo; para ello se hizo pasar a través de la célula un flujo de las disoluciones de aluminio de diferentes concentraciones. Las medidas se llevaron a cabo a distintos tiempos (5-30 min.). En estas condiciones se produce una retención del catión aluminio en la fase sólida desarrollándose el color según el analito pasa por la célula de flujo. De esta manera se va preconcentrando el Al(III) por lo que cuanto mayor es el tiempo que la disolución que contiene el analito pasa a través de la célula más cantidad de aluminio existe en el sólido. Puesto que la capacidad de almacenamiento de aluminio de la fase sólida empleada es limitada llega un momento en que se produce su saturación, momento en que la intensidad de reflectancia permanece constante aunque se incremente la cantidad de analito.

A partir de los resultados obtenidos (Figura 47), se deduce que si el calibrado se realiza en estas condiciones, es suficiente esperar 10 minutos para obtener respuestas satisfactorias, si bien si las medidas se realizan a tiempos mayores aumenta la sensibilidad pero se reduce el intervalo de linealidad como consecuencia de la preconcentración en la fase reactiva. El calibrado realizado a tiempos inferiores a 10 minutos presenta un intervalo lineal hasta 1.0 $\mu\text{g/ml}$ mientras que a 30 minutos el intervalo es lineal hasta 0.5 $\mu\text{g/ml}$.

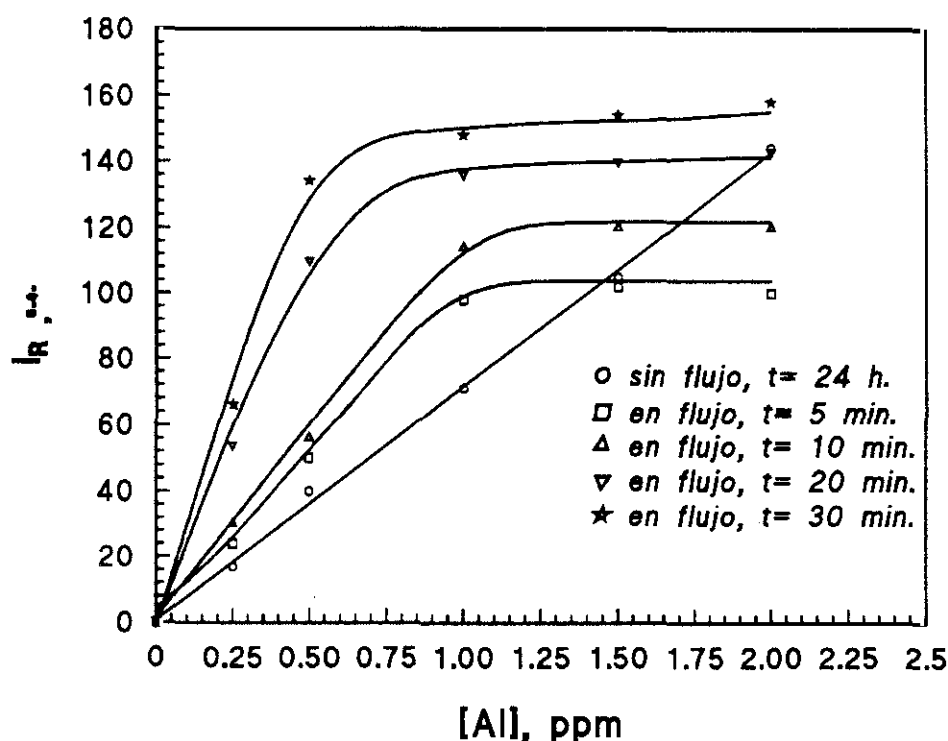


Figura 47. Calibrado en flujo. Variación intensidad de reflectancia del complejo CS-Al(III) a distintas concentraciones de aluminio a diferentes tiempos.

1.1.2.6.2. Límite de detección (LD), límite de cuantificación y precisión del método

El límite de detección se calculó teniendo en cuenta la desviación estándar de 9 determinaciones de un blanco de reactivos y aplicando la norma recomendada por la I.U.P.A.C. para calcular el LD:

$$L.D. = K s_b/S$$

donde s_b es la desviación estándar de dichos blancos, K es un número que depende del nivel de probabilidad elegido (K toma un valor de 3 para un nivel de probabilidad del 99.7%) y S es la pendiente de la recta de calibrado (en este caso se consideró el calibrado en flujo para un tiempo de 10 minutos). Aplicando la fórmula de la I.U.P.A.C. para $K=3$, el límite de detección obtenido es de **0.1 $\mu\text{g/ml}$ de Al(III)**. El límite de cuantificación calculado para un valor de $K=10$, resulta ser de 0.3 $\mu\text{g/ml}$.

El cálculo de la precisión del método se llevó a cabo preparando 9 muestras diferentes de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Al(III) en medio $\text{H}_2\text{MTA}^+/\text{HMTA}$ 0.2M a pH 5. Se siguió el procedimiento en flujo, y las medidas se realizaron a los 5 minutos. La precisión del método en términos de la desviación estándar relativa es de 3.6%.

1.1.2.7.3. Estudio de interferencias. En este apartado se ha estudiado la influencia que tienen diversos iones sobre la señal de reflectancia del Al(III). La influencia de los mismos se comprobó bombeando el analito junto al elemento potencialmente interferente. El trabajo se efectuó para una concentración de Al(III) de 1 $\mu\text{g/ml}$ en medio $\text{H}_2\text{MTA}^+/\text{HMTA}$ 0.2 M a pH 5, y se realizaron las medidas transcurridos cinco minutos desde el comienzo del bombeo a través de la célula de flujo de la disolución objeto de estudio.

Los cationes elegidos fueron aquellos más comunes que dan reacción con el reactivo Cromazurol S en disolución. Igualmente se eligieron los aniones más frecuentes en las muestras, así como los aniones complejantes del analito. Se eligió primeramente una relación en peso, elemento interferente/Al(III) 100:1, a la vista de los resultados, se elevó o disminuyó dicha relación.

Se consideran interferentes aquellas especies que a una determinada concentración originaban una variación en la intensidad de reflectancia superior a dos veces la desviación

estándar de las medidas de intensidad de reflectancia de una serie de muestras en ausencia del elemento potencialmente interferente (259). En la tabla 15 aparecen los resultados obtenidos, se consideró una sensibilidad del 100% a la señal obtenida (blanco-muestra) con una concentración de aluminio 1 $\mu\text{g/ml}$ en ausencia de interferentes, los porcentajes mayores o menores corresponden a interferencias con efecto positivo o negativo respectivamente. En nuestro caso los límites de no interferencia se encuentra en el intervalo 96.5-103.5%.

Tabla 15 Sensibilidad relativa obtenida en presencia de diferentes elementos en distintas relaciones respecto al aluminio..

ION	Relación ion/Al(III)	Sensibilidad relativa
Li	100:1	102
Na	100:1	83
	50:1	98
K	50:1*	103
Ca	100:1	54
	50:1	100
Mg	100/1	83
	50/1	99
Be	1/1	120
Cu	50:1	154
	10:1	103
Co	200:1	87
	100:1	97
Ni	100:1	102
Zn	100:1*	101
Fe(III)	1:1	120
NH₄⁺	10:1	103
F⁻	1:1	76
Br⁻	100:1*	108
I⁻	50:1*	98
Cl⁻	100:1*	99
CO₃²⁻	50:1*	100
Cit⁴⁻	1:1	101
AEDT	1:1	102

Según se observa en la tabla 15 la mayor parte de los cationes ensayados no interfieren en relaciones iguales o inferiores a 50 veces la concentración del analito. El Be(II) constituye una de las principales interferencias junto a fluoruro, citrato y AEDT.

1.1.3. CONCLUSIONES

El sensor en flujo desarrollado, si bien no es reversible, resulta ser completamente regenerable, presenta una sensibilidad de $0.1 \mu\text{g/ml}$ (para tiempos de medida de 10 minutos) y mejora notablemente las características analíticas del método descrito en disolución (243) y presenta la posibilidad de llevar a cabo análisis "in situ" y de forma continua, o bien se pueden almacenar las fase sólidas, -resina-CS-Al(III)- para ser medidas en el momento deseado puesto que las mismas resultaron estables al menos durante 48 horas. La sensibilidad del método propuesto puede incrementarse sin más que utilizar mayores volúmenes de muestra al igual que en otros métodos de preconcentración.

Sin embargo este método presenta un problema de tipo práctico debido al hinchamiento de la resina al variar el pH del medio (en la etapa de regeneración) lo que origina una falta de reproducibilidad en la medida además de ??por ello se pasaron a evaluar otros soportes sólidos inertes antes de proceder a su aplicación a muestras reales.

1.2.- DETERMINACION DE ALUMINIO CON OTRAS FASES SOLIDAS

La utilización de reacciones no reversibles en la construcción de sensores está sujeta a la etapa de regeneración, condición necesaria para que la fase reactiva pueda ser utilizada para diversas determinaciones. El apartado anterior, es un claro ejemplo pues si bien su aplicación y determinación puede efectuarse pero su utilización en continuo resulta poco operativo debido a los problemas de hinchamiento que presentaba la fase sólida (resinas) durante su regeneración. Se consideró entonces la posibilidad de estudiar el mismo sistema

en soportes inertes alternativos al anterior que no se vean modificados por el paso a su través de las distintas soluciones, con el fin de que no varíe el grado de empaquetamiento durante el proceso de medida. Así se han ensayado diferentes tipos de inmovilización en diversos soportes (sol-gel, gel de sílice y vidrio de poro controlado). De esta forma, se conseguiría una mayor reproducibilidad en la medida, así como la posibilidad de regenerar el reactivo en continuo agilizando el proceso de análisis.

1.2.1.- ESTUDIO DE LA INMOVILIZACIÓN DEL REACTIVO

Entre los posibles soportes se probaron, vidrio de poro controlado (enlace covalente), gel de sílice (electrostático, adsorción) y sol-gel (atrapamiento físico). Con los tres soportes elegidos se ha intentado dar una visión general sobre los soportes de tipo inorgánico y su comportamiento frente a un mismo reactivo con el fin de comparar su respuesta frente al Al(III).

Una vez inmovilizado el colorante en los tres soportes según los procedimientos descritos en los apartados II.2.2.1.2, II.2.2.1.3. y II.2.2.1.4. Todas las fases reactivas obtenidas se tamizaron con luz de malla 0.160 mm ya que para el estudio comparativo es necesario que los soportes presenten un tamaño de partícula parecido dada la influencia de este parámetro en las medidas de reflectancia. Los sólidos en forma pulverulenta se lavan sucesivamente con diferentes disolventes para eliminar el indicador unido superficialmente.

En la elección del soporte se han de tener en cuenta varios factores en primer lugar que el reactivo no se "lave" del soporte y que además no se vea afectado en su reaccionabilidad frente al analito después de su inmovilización:

1.2.1.1 Elección del soporte, ensayos cualitativos. Con el fin de evaluar el primer punto, se realizaron unos ensayos cualitativos poniendo en contacto cada uno de los soportes en tubos de ensayo y se adicionó a cada uno de ellos HCl 1M, NaOH 1M y agua desionizada, observándose el color que presentaban tanto la fase sólida como el líquido sobrenadante. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la tabla 16.

Tabla 16. Color de diferentes soporte con CS inmovilizado en distintos medios.

SOPORTE		NaOH	HCl	Agua
SOL-GEL	Sólido	lila	naranja	rojizo
	Sobrenadante	azul(+++)	naranja(++)	-----
CPG	Sólido	azul	rojo	rojizo
	Sobrenadante	azul(+)	rojo(+)	-----
GEL SILICE	Sólido	azul	naranja	rojizo
	Sobrenadante	-----	-----	-----

(+) Intensidad del color observado

De los datos de esta tabla se observa que a pH muy básicos existe una desadsorción que llega a ser extremadamente fuerte en el caso del sol-gel (puede llegar a desadsorberse totalmente), la desadsorción es intermedia en el CPG y la silica-gel es de los tres soportes el que no presenta pérdida de reactivo a ningún pH. Estos ensayos nos sirven para confirmar la presencia de cromazurol en los soportes sólidos a estudiar así como su capacidad de actuar como indicador ácido base en fase sólida.

La formación del complejo en fase sólida se observa por una variación de color entre la fase reactiva en presencia y en ausencia del analito a distintos tiempos. Todos los soportes ensayados mantenían las propiedades reactivas frente al Al(III), puesto que producían dicha variación de tonalidad. En la tabla 14 se recogen estas variaciones de color.

En vista a estas variaciones de tonalidad parece ser que la formación del complejo entre el aluminio y el indicador inmovilizado es óptima a valores intermedios de pH (4-6) formándose este complejo en todos los soportes ensayados si bien en el soporte sol-gel es esta reacción es mucho más lenta pues una apreciable variación de color necesita al menos 20 minutos de contacto entre soporte y analito.

Tabla 17. Color observado del sistema CS-Al(III) en distintos soportes. Al(III) 2.5 ppm

SOPORTE		pH 2-4	pH 4-6	pH 7-9
SOL-GEL	Blanco	naranja	rojizo	lila
	Complejo	naranja	violeta(+ + +)	lila
CPG	Blanco	rojo	rojizo	azul
	Complejo	rojizo	morado(+ +)	azul
GEL SILICE	Blanco	naranja	rojizo	azul
	Complejo	rojizo	azul(+ +)	azul

Tiempo de espera para formación del complejo :(+ +) 5-10 minutos (+ + +) más de 20 minutos

La formación del complejo CS-Al(III) en fase sólida observada cualitativamente por un cambio de color se cuantificó utilizando medidas de reflectancia. Se registró el espectro de reflectancia de las distintas fases reactivas (en presencia y ausencia de Al(III)) para obtener la zona del espectro en la que se produce mayor variación en I_R por formación del complejo. Los espectros se han realizado con el dispositivo 2 del apartado II.2.1.1., con los complejos previamente formados dando tiempo suficiente para la formación de cada complejo. Los espectros registrados se encuentran en las Figuras 48, 49 y 50.

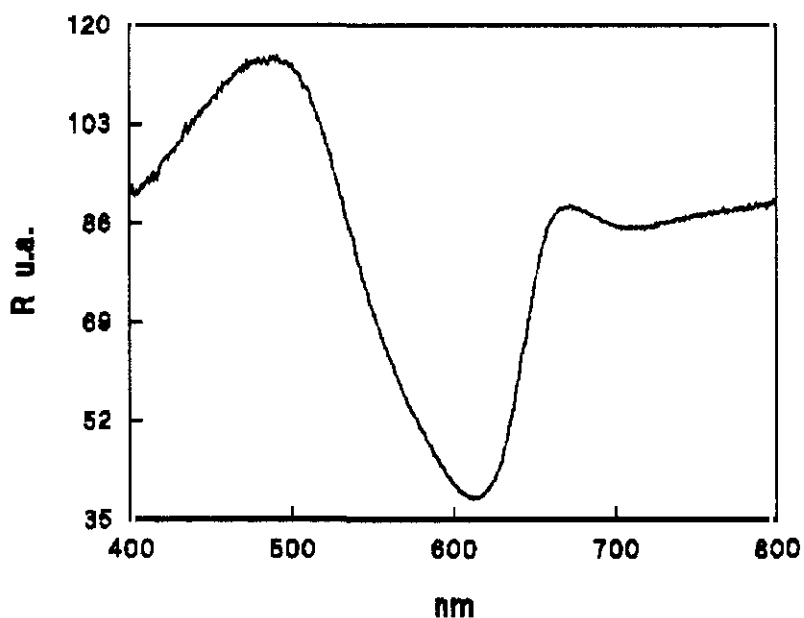


Figura 48. Espectro de reflectancia del complejo CS-Al(III) atrapado en vidrio sol-gel. [Al(III)] 5 $\mu\text{g/ml}$, pH 4.

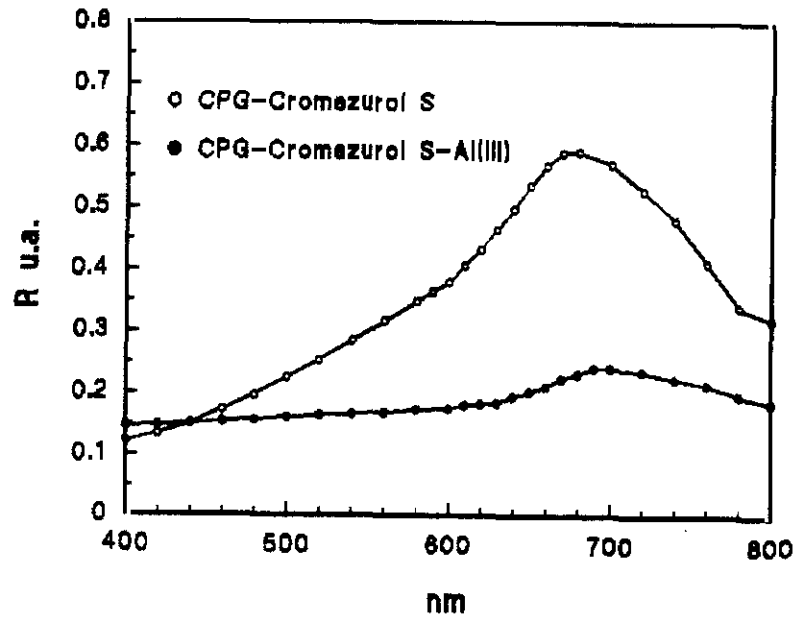


Figura 49. Espectro de reflectancia del complejo CS-Al(III) en CPG, [Al(III)] 2.5 $\mu\text{g/ml}$, pH 4

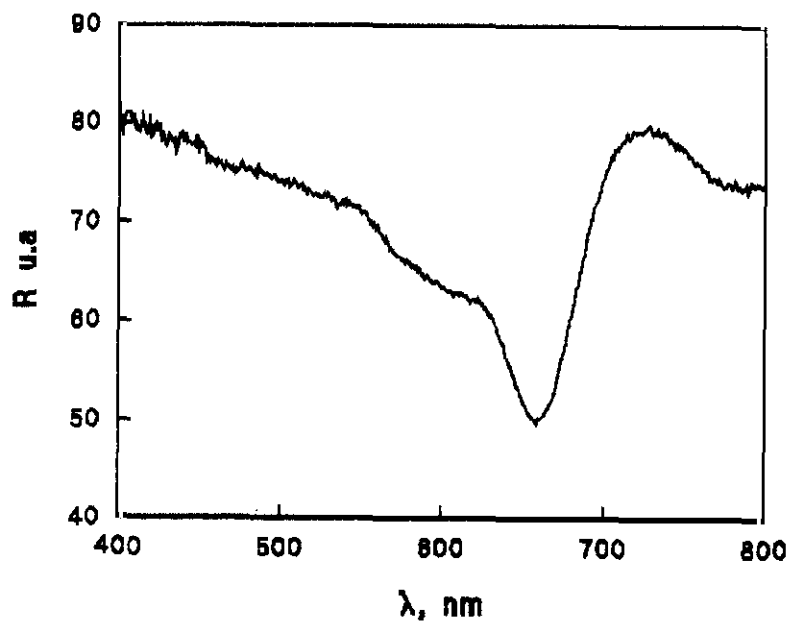


Figura 50. Espectro de reflectancia del complejo CS-Al(III) en gel de sílice [Al(III)] 2.5 $\mu\text{g/ml}$, pH 4

En la figura 48 aparecen tanto el espectro del blanco como el del complejo, en las figuras 49 y 50 se ha tomado como referencia el espectro del blanco. A partir de los espectros obtenidos observamos que la reacción entre el reactivo y el analito se lleva a cabo en todos los tipos de soportes ensayados. Produciéndose las mayores diferencias de reflectancia entre el blanco y el complejo a diferentes intervalos de longitud de onda según el soporte sólido.

Tabla 18. Intervalos del espectro de reflectancia del complejo CS-Al(III) con mayores diferencias respecto al blanco, en distintos soportes.

SOPORTE	Vidrio sol-gel	Gel de sílice	CPG
λ OPTIMA(nm)	600-630	640-670	660-710

El tiempo de respuesta del sensor vendrá determinado por la rapidez de reacción de formación del complejo, en este caso si bien en todos los soportes se produce reacción con el analito, no todos ellos se forman con la misma rapidez, se registraron entonces los espectros a distintos tiempos de espera para la formación del complejo. Se observa que la reacción del Al(III) con el cromazurol S en el vidrio sol-gel es mucho más lenta que en los otros dos soportes. El espectro que aparece en la figura 48 corresponde a un tiempo de formación de 24 h. Las reacciones tanto en sílica gel como en CPG fueron inmediatas. Esto puede deberse a que la inmovilización tanto en CPG como en gel de sílice es de tipo superficial, es decir el reactivo indicador queda en la superficie del soporte siendo mucho más fácil el acceso del analito para su reacción. El reactivo queda atrapado en el interior de una matriz de sílice en el caso de sol-gel por lo que el acceso del analito se ve "impedido"

El CPG tiene un tiempo de respuesta aproximado que la gel de sílice, pero el proceso de inmovilización en el vidrio de poro controlado es muy laborioso y mucho más complicado que en el caso de la gel de sílice por lo que se optó por caracterizar la fase reactiva formada por CS inmovilizado en gel de sílice con vistas a la mayor reproducibilidad en el proceso de inmovilización. Por tanto se optó por caracterizar la fase reactiva formada por el indicador **cromazurol S** soportado en **gel de sílice** como fase reactiva más apropiada. .

Se procedió a observar si existía desadsorción del reactivo inmovilizado CS variando la fuerza iónica del medio y cómo influía ésta en la formación del complejo. Para ello, se colocó la misma cantidad de silica-gel en diferentes tubos de ensayo en presencia y ausencia de analito y se les fué añadiendo NaCl desde 0.01M a 1M observándose que el reactivo no desadsorbía en ninguno de los casos y que los complejos se formaban en el intervalo estudiado.

1.2.2. SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA.

El espectro del complejo cromazurol CS-Al(III) nos da una mayor diferencia de reflectancia respecto al blanco en la región de longitud de onda próxima a 650-670 nm como puede apreciarse en la Figura 50, por lo que fue 660 nm la long de onda seleccionada para posteriores medidas.

1.2.3. CONCENTRACIÓN DE CROMAZUROL S

Para la elección de la concentración de cromazurol S óptima se midió la reflectancia del complejo CS-Al(III) a distintos tiempos (de 0 a 20 minutos) a la longitud de onda de 650 nm cuando se empleaban fases con diferentes concentraciones del reactivo inmovilizado. Los datos obtenidos se observan en la Figura 51 y demuestran que la concentración de cromazurol S óptima es 0.05% ya que proporciona la mayor diferencia de reflectancia entre el blanco y el complejo a todos los tiempos estudiados.

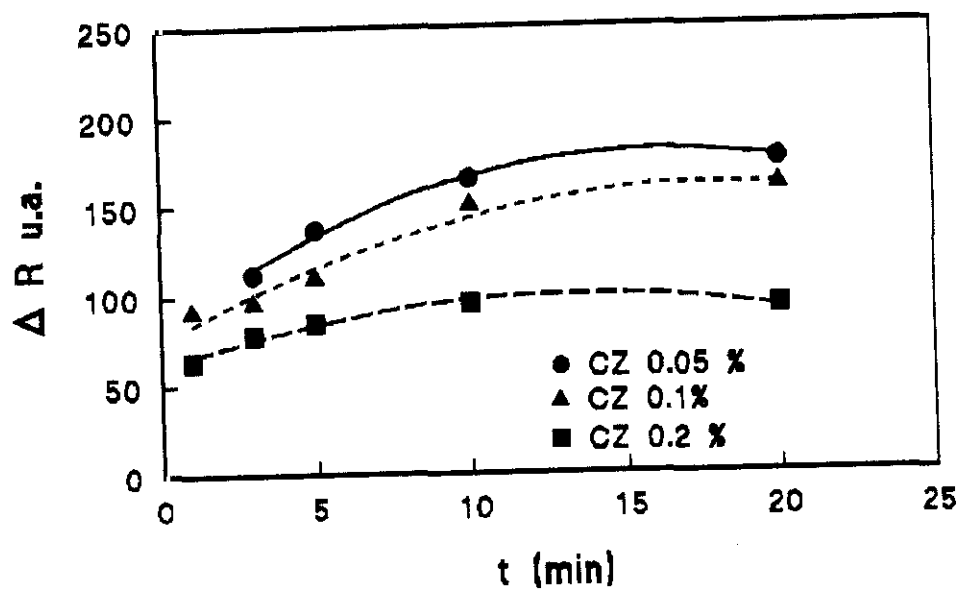


Figura 51 Intensidad de reflectancia del complejo CS-Al(III) a distintos tiempos, pH 4, [Al(III)] 2.5 ppm. utilizando fases reactivas con diferente concentración de CS inmovilizado.

1.2.4. INFLUENCIA DEL pH EN LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO CS-Al(III).

Este estudio se llevó a cabo midiendo la intensidad de reflectancia a la longitud de onda óptima del complejo CS-Al(III) (Al(III) 2 $\mu\text{g/ml}$) formado en el intervalo de pH 3.5-6.0. De la Figura 52 se deduce que el pH óptimo para la formación del complejo CS-Al(III) es 4.8 puesto que este valor proporciona la mayor diferencia en intensidad de reflectancia entre el blanco y complejo.

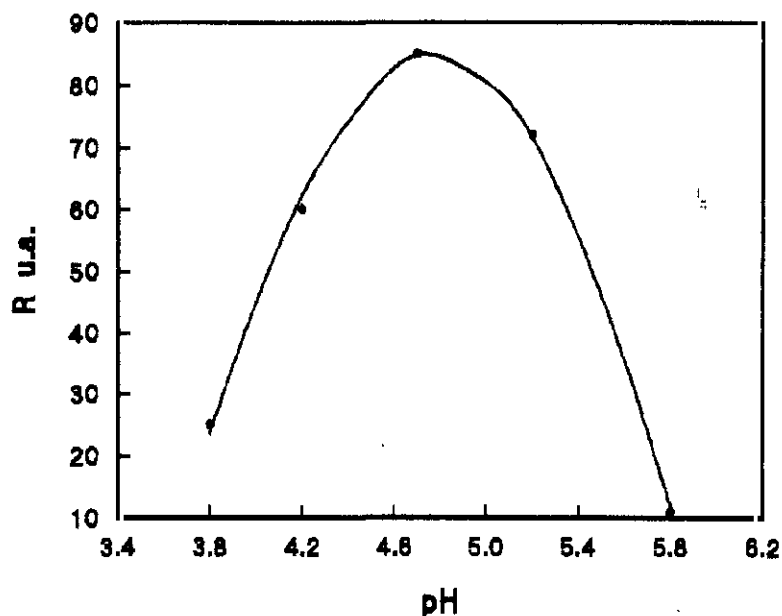


Figura 52. Influencia del pH en la intensidad de reflectancia de CS-Al(III), CS 0.05% Al(III) 2 ppm.

1.2.5. NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA.

Con el fin de estudiar la influencia de la naturaleza de la disolución reguladora en la formación del complejo ($[Al(III)] = 2.5$ ppm), se estudió la formación del mismo a pH 4.8 en presencia de diversas disoluciones reguladoras. En la tabla 19 se recogen los valores de la diferencia de reflectancia de la fase reactiva en ausencia y presencia de analito. Las variaciones de intensidad más sensibles se obtiene con acético/acetato como medio regulador, por tanto fue este el medio seleccionado para posteriores experimentos.

Tabla 19. Diferencias de intensidad de reflectancia de la fase reactiva en ausencia y presencia de $[Al(III)]$ 2.5 ppm) pH 4.8 en distintos medios reguladores

REGULADOR	Succínico/succinato	Acético/acetato	Biftalato/fitalato	H2MTA +/HMTA
ΔIR (u.a.)	2.5	22	7	9

Una vez optimizado el pH y la naturaleza del tampón se procede a determinar su concentración óptima. Para ello se varia la concentración de acetico-acetato desde 0.025-0.5M preparando muestras y blancos en las mismas condiciones; una vez formado el complejo se observa los cambios de color obtenidos, registrando el espectro de reflectancia en cada caso.

En la Figura 53 se ha representado la diferencia de intensidad de reflectancia del complejo y el blanco obteniéndose una concentración óptima 0.05M en HAc/Ac⁻ para posteriores experimentos.

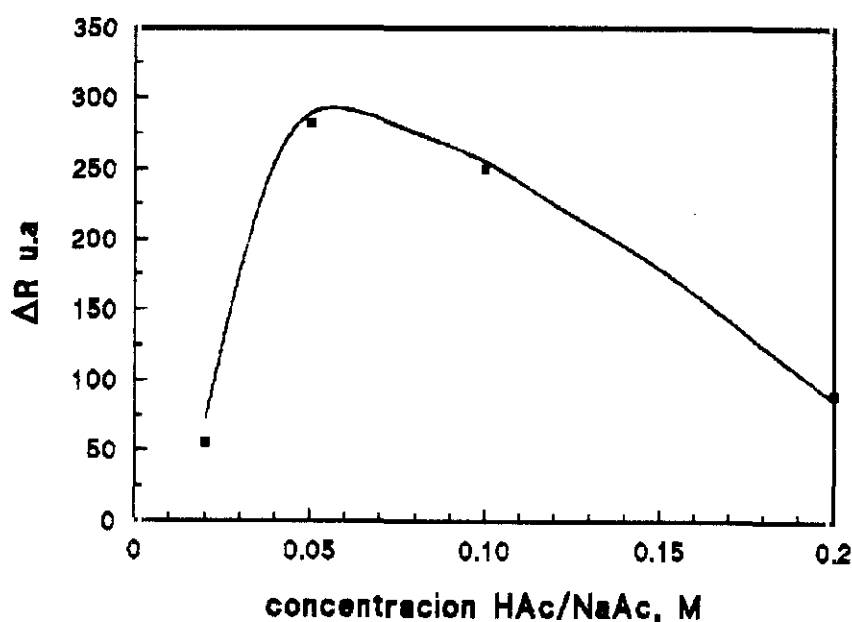


Figura 53. Efecto de la concentración del medio regulador en la señal de reflectancia del complejo CS-Al(III) [Al(III)] 2.5 ppm, pH 4.8

1.2.6. REGENERACIÓN

La capacidad del ácido clorhídrico como disolución regeneradora cuando se utiliza como soporte sólido un intercambiador aniónico no ofrece posibilidades práctica pues si bien este ácido posibilita la ruptura del complejo en fase sólida aparecen problemas prácticos debidos a la naturaleza del soporte. Este hecho sirvió de base para seleccionar este mismo ácido como regenerante ya que en el caso de utilizar como soporte sólido gel de sílice, no aparecieron los problemas anteriormente observados. La confirmación de la

utilidad de este reactivo como regenerante quedó confirmada por la obtención de la línea base inicial una vez regenerada la fase reactiva.

1.2.7.-CINÉTICA DE LA REACCIÓN.

La cinética de las reacciones sobre superficies sólidas suele ser más lenta que la de las reacciones en disolución, dada la existencia de un fenómeno de transferencia de materia hasta la superficie sólida. Se ha realizado un estudio para conocer la cinética de la reacción entre CS inmovilizado y Al (III), para ello y con el fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la formación de dicho complejo se registró la intensidad de reflectancia frente a la longitud de onda a distintos tiempos.

El procedimiento seguido para este estudio se detalla a continuación: Se rellenó la célula con una cantidad determinada de gel de sílice, con cromazurol S inmovilizado, posteriormente se bombea una disolución que contenía 2.5 ppm de Al(III) a pH 4.8 se realizaron los espectros de reflectancia frente a la longitud de onda, a diferentes tiempos (5, 10, 20, 60 y 180 minutos).

Como se observa en la Figura 54, el complejo CS-Al(III) alcanza el equilibrio de formación a tiempos superiores a treinta minutos. En esta figura también se observa la variación de la longitud de onda óptima del complejo a medida que evoluciona la formación del mismo. Se produce un desplazamiento de la longitud de onda óptima de medida (aquella que produzca mayor diferencia entre la intensidad de reflectancia de blanco y complejo) hacia el rojo según aumenta la extensión de formación del complejo así cuando el complejo se ha formado completamente (al equilibrio) la máxima diferencia se encuentra a 680 nm mientras que en los primeros momentos la máxima diferencia se encuentra a 660 nm.

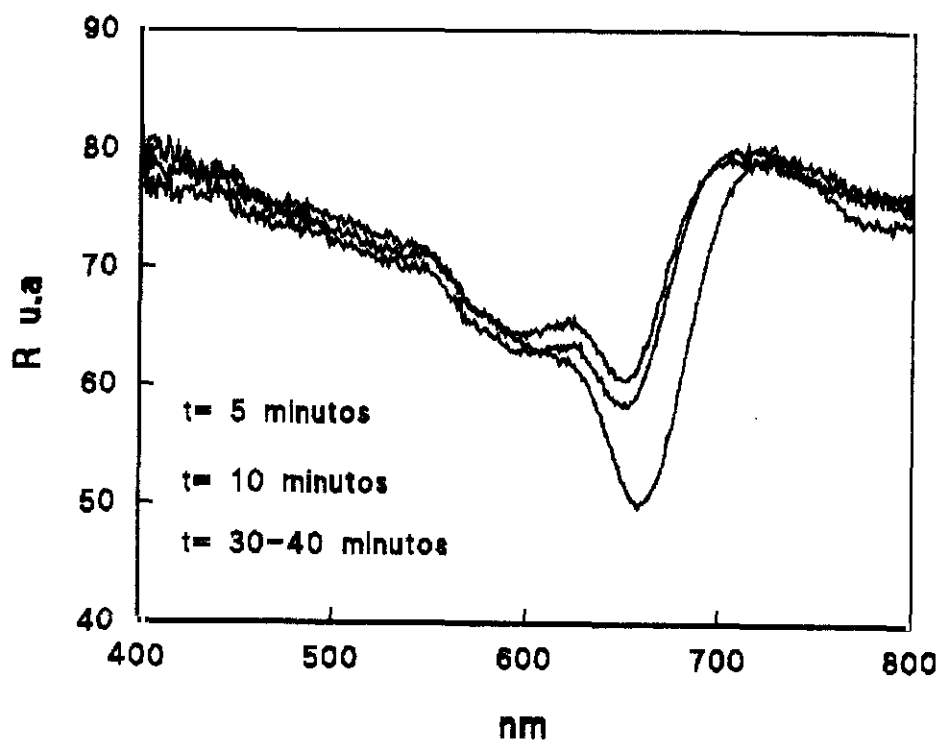


Figura 54. Espectros a diferentes tiempos de formación de complejo CS-Al(III) en gel de sílice. [Al(III)] 2.5 $\mu\text{g/ml}$ pH 4.8

1.3. COMPARACION DE LAS DIFERENTES FASES REACTIVAS

Dado que para un tiempo de análisis de 5 minutos obtenía una señal débil (señal de disminución de la reflectancia) para una concentración de $2.5 \mu\text{ng/ml}$ de aluminio. Se optó por no desarrollar el método puesto que ello conllevaría un tiempo de análisis excesivo para obtener una sensibilidad adecuada.

Con la utilización de soportes inorgánicos se han obviado los problemas de hinchamiento que dificultaban la utilización del sensor en continuo. Por otra parte se produce una clara disminución de la sensibilidad del sistema al variar el soporte sólido. Dado que la concentración del orden de 0.5 ppm prácticamente no da ningún tipo de respuesta para tiempo de 5 minutos con la fase reactiva mientras que en el soporte polimérico se produce una señal analítica perfectamente cuantificable. Este hecho pone de manifiesto una vez más la naturaleza tan compleja de las reacciones sobre sólidos pues en principio ambas inmobilizaciones son de tipo superficial y deberían presentar una sensibilidad parecida. Como se expuso en la introducción la elección del soporte es una etapa clave en la etapa de un sensor pues si bien éste puede ser funcional como sucede en este caso para obtener una sensibilidad adecuada sería preciso un tiempo de análisis largo. No existe una regla generalizada para la elección del soporte más idóneo más que la experiencia.

2.- SENSOR DE REFLECTANCIA EN FLUJO CONTINUO PARA DETERMINACION DE Fe(III) CON CROMAZUROL S INMOVILIZADO Y SU APLICACIÓN ANALÍTICA.

En el Departamento se había desarrollado con anterioridad un sensor de reflectancia tipo sonda para la determinación de hierro (219) basado en el empleo del reactivo cromazurol S inmovilizado en una resina aniónica que fue utilizado en discontinuo. Este sensor no resultó apropiado para monitorizar el hierro debido al problema, ya mencionado, de hinchamiento que tiene este tipo de soportes, cuando se modifica el entorno (pH, fuerza iónica, agente regenerantes, etc).

Por ello se pasó a modificar el mismo empleando otros soportes que eliminaran dichos problemas y que hicieran posible el empleo del sensor en un sistema en flujo continuo para monitorizar hierro. La caracterización del sensor, una vez seleccionado el soporte idóneo, se ha realizado siguiendo el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.2. con el dispositivo 2 del apartado II.2.1.1.

2.1 ELECCIÓN DEL SOPORTE

La elección del soporte se efectuó basándonos principalmente en dos hechos como viene siendo habitual en esta memoria. En primer lugar que no se produzcan pérdidas del reactivo inmovilizado con el tiempo, incluso en condiciones extremas de trabajo, (que darían lugar a derivas de la línea base y pérdida de sensibilidad en ciclos sucesivos). En segundo lugar el proceso de inmovilización no debe modificar la reactividad del CS en disolución.

El CS se inmovilizó enlace covalente en CPG, por atrapamiento físico en vidrio sol-gel y por adsorción en gel de sílice siguiendo los procedimientos descritos en los apartados II.2.2.1.2, II.2.2.1.3. y II.2.2.1.4.

La fase reactiva que emplea gel de sílice como soporte sólido resultó ser la más estable para el mantenimiento del reactivo en todos los medios ensayados como se expuso en el apartado III.1.2.1.1. (Tabla 16).

La reactividad del CS inmovilizado frente al Fe(III) se evaluó cualitativamente poniendo en contacto a diversos pH una misma cantidad de fase reactiva con 2.5 $\mu\text{g/ml}$ y observando a diferentes tiempos la coloración de la misma. Los resultados, que se exponen en la tabla 20, demuestran que el intervalo de pH óptimo para la formación de complejo se encuentra comprendida entre 4-6, y que las tres fases sólidas presentan reactividad frente al Fe(III), si bien el vidrio sol.gel era el soporte que presentaba una respuesta más lenta para este analito tal y como ocurrió para el Al(III).

Tabla 20. Color observado del sistema CS-Fe(III) en diferentes soportes. [Fe(III)] 2.5 $\mu\text{g/ml}$

SOPORTE		pH 2-4	pH 4-6	pH 7-9
SOL-GEL	Blanco	naranja	rojizo	violeta
	Complejo	naranja	violeta(***)	violeta
CPG	Blanco	rojo	rojizo	azul
	Complejo	rojizo	violeta(*)	azul
GEL SILICE	Blanco	naranja	rojizo	azul
	Complejo	rojizo	azul(*)	azul

Tiempo de formación del complejo (*) menos de 5 minutos, (**) 20 minutos

Si comparamos la tabla 20 con la análoga para el Al(III) (tabla 17) se puede observar que en los soportes CPG y gel de sílice, el ión Al(III) reacciona más lentamente con el CS que en estos mismos soportes el Fe(III).

Para confirmar la reactividad de las tres fases reactivas frente al Fe(III) se registraron sus espectros de reflectancia entre 400 - 800 nm en presencia y ausencia del analito, a un pH 4.5 en el que existía reacción según el estudio cualitativo. Los espectros se realizaron dando tiempo suficiente para la formación de cada complejo y se encuentran representados las Figuras 55, 56 y 57. donde los registros corresponden a los espectros

corregidos frente al blanco excepto para la fase reactiva que tiene vidrio de poro controlado como soporte sólido.

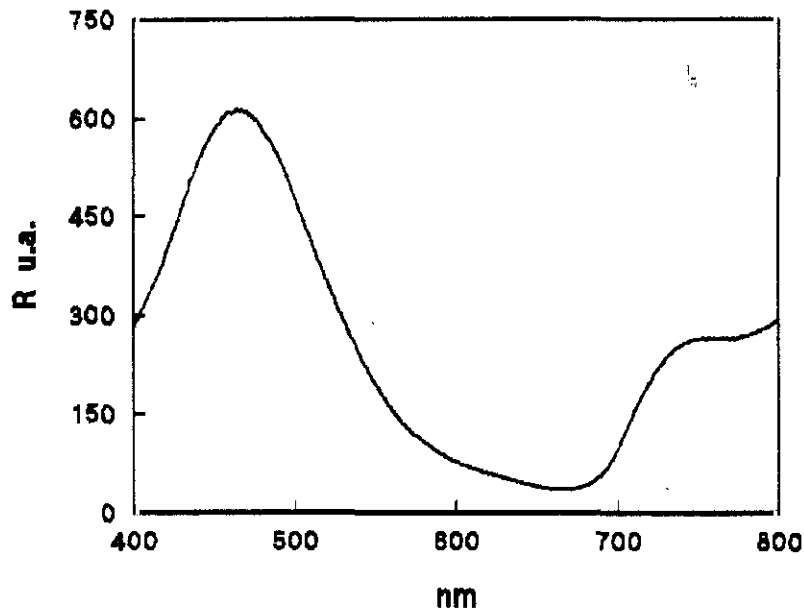


Figura 55: Espectro de reflectancia del sistema CS-Fe(III) atrapado en vidrio sol-gel [Fe(III)] 5 $\mu\text{g/ml}$, pH 4

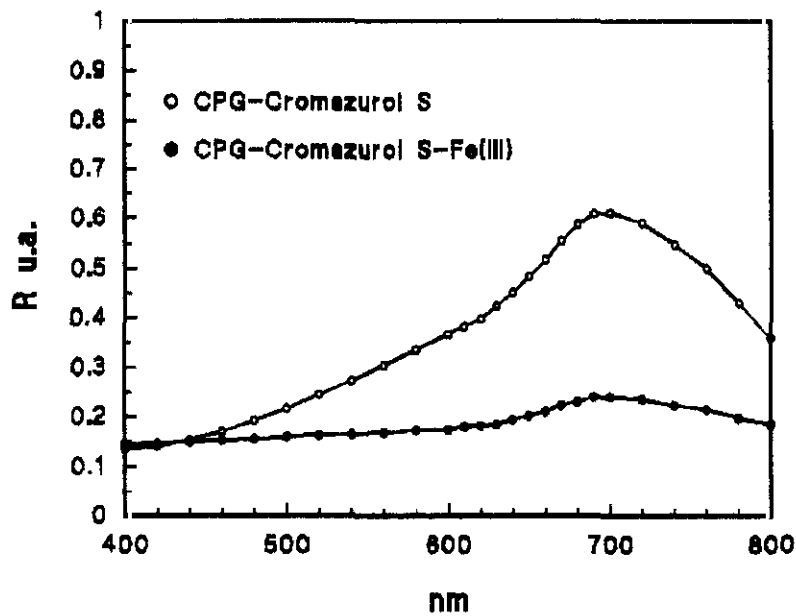


Figura 56: Espectro de reflectancia del sistema CS-Fe(III) en CPG [Fe(III)] 1 $\mu\text{g/ml}$, pH 4

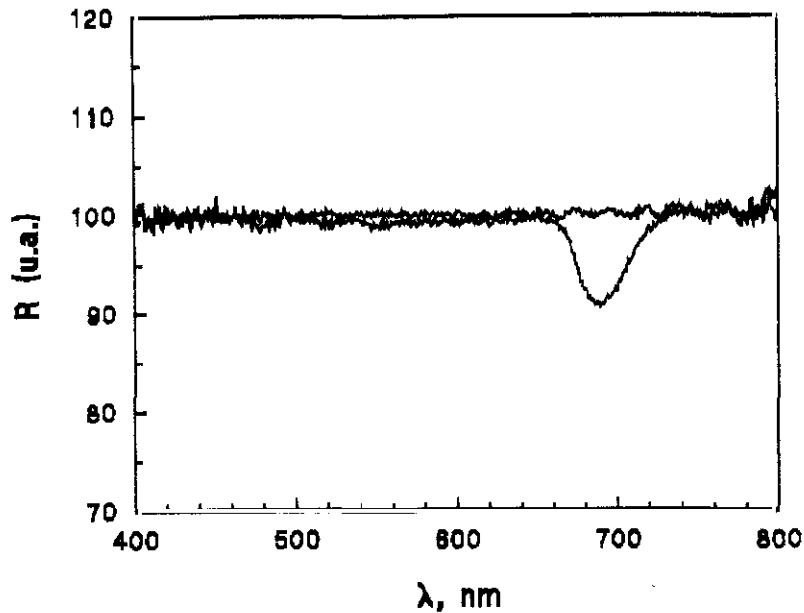


Figura 57: Espectro de reflectancia del sistema CS-Fe(III) en gel de sílice [Fe(III)] 1 $\mu\text{g/ml}$, pH 4

A partir de los espectros obtenidos al igual que por el estudio cualitativo se concluye que la reacción entre el reactivo y el analito se lleva a cabo en todos los tipos de soportes ensayados.

El hecho de que nuevamente vuelva a resultar más lenta la respuesta del soporte vidrio sol-gel parece indicar que debido a que en este caso la inmovilización no es superficial el acceso del analito se ve dificultado, jugando un papel importante en la respuesta no sólo la cinética de la reacción indicador-analito sino la difusión del ión hacia el interior de los poros donde se encuentra alojado el indicador. Estos poros pueden ser modificados como se ha comentado anteriormente sin embargo no se hicieron intentos por mejorar este tipo de soporte.

Una vez rechazado el vidrio sol-gel como soporte por los motivos expuestos, se seleccionó de nuevo el soporte gel de sílice debido a que el mecanismo de inmovilización en gel de sílice mucho más simple que en CPG b) La sílica-gel proporciona mayor reproducibilidad en la realización de diferentes fases reactivas.

2.2. CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR Fe(III)-CROMAZUROL S INMOVILIZADO EN GEL DE SÍLICE.

2.2.1. SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA.

Este estudio se llevó a cabo realizando los espectros de reflectancia desde 400 a 800 nm del blanco de reactivos constituido por gel de sílice-CS a pH 4.2 en acético/acetato, y del complejo CS-Fe(III) en fase sólida, el estudio se efectuó formando los complejos previamente en un tubo de ensayo para una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Fe(III), rellenando posteriormente la célula de flujo con el sólido obtenido y registrando el espectro. El espectrofotómetro toma como referencia el espectro del blanco y registra el espectro corregido del complejo.

Se observa una mayor variación en la reflectancia del complejo CS-Fe(III) respecto al blanco en la región de longitud de onda próxima a 680 nm como puede apreciarse en la Figura 57, por lo que se seleccionó esta longitud de onda para posteriores experiencias.

2.2.2. REGENERACIÓN DE LA FASE REACTIVA.

La regeneración del sistema, es decir, extraer el hierro del reactivo inmovilizado, y por tanto obtener el reactivo de forma inicial, es fundamental para la operatividad de un sensor. Del éxito de este estudio depende su aplicación a medidas en continuo.

Se eligieron como posibles reactivos regenerantes los ácidos clorhídrico y perclórico y se comprobó el potencial del reactivo elegido como regenerante mediante el experimento siguiente:

La fase reactiva (gel de sílice con el reactivo CS inmovilizado al 0.05%) se introdujo en tubos de ensayo en los que se añadió el mismo volumen de una disolución con el analito en medio acético/acetato a pH 4.2. Después de esperar aproximadamente 5

minutos para que apareciese el color azul característico del complejo, se adicionó un mismo volumen de HCl o HClO₄ a distintas concentraciones, observándose a continuación si tiene lugar cambio de color, que pudiera indicar la liberación del analito y por tanto la regeneración de la fase sólida.

El empleo de HClO₄ en el intervalo estudiado (0.1- 1M) produjo la destrucción de la fase reactiva ya que el indicador se libera del soporte.

La disolución HCl 1M fue la que dió lugar a los mejores resultados puesto que el color característico del complejo desaparece inmediatamente lo que implica la ruptura del mismo y se observa el color naranja propio del CS en medio ácido. Si en estas condiciones se vuelve a poner en contacto la fase reactiva con el analito a pH 4.2 vuelve a aparecer el color característico del complejo CS-Fe(III).

2.2.3. INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA.

Se procedió a observar si la fuerza iónica del medio producido desadsorción del reactivo inmovilizado CS y cómo influía ésta en la formación del complejo. Para ello, se colocó la misma cantidad de sílica-gel en diferentes tubos de ensayo en presencia y ausencia de analito y se les fué añadiendo NaCl desde 0.01M a 1M observándose que el reactivo no se desadsorbía en ninguno de los casos y que el complejo Fe(III)-CS se formaba en todo el intervalo estudiado.

2.2.4. CONCENTRACIÓN DE CROMAZUROL S.

La optimización de la concentración de reactivo inmovilizado es muy importante puesto que afecta a la sensibilidad del sistema, cuanto mayor sea la concentración de CS mayor será la capacidad de preconcentración de la fase sólida, pero por otro lado en el caso de medidas de reflectancia puede ser que las variaciones de color no sean tan nítidas debido a fuertes tonalidades lo que se traduciría en una dificultad en la medida de la reflectancia. Interesa tener una fase reactiva en la que la variación de reflectancia sea máxima y posea la mayor capacidad quelatante, por ello se optimizó la concentración de cromazurol S preparando disoluciones acuosas del reactivo al 0.05, 0.1, 0.2%, y una vez

inmovilizado en el soporte silica-gel con el reactivo de la forma ya indicada (apartado procedimiento); se observó el comportamiento a diferentes pH en presencia y ausencia de 1 $\mu\text{g/ml}$ de analito.

Se midió la reflectancia del complejo CS-Fe(III) a distintos tiempos (0 - 20 minutos) a la longitud de onda de 680 nm. Los datos obtenidos se observan en la Figura 58 y demuestran que la concentración de cromazurol S óptima es la del 0.05% ya que proporciona la mayor diferencia de reflectancia entre el blanco y el complejo a todos los tiempos estudiados.

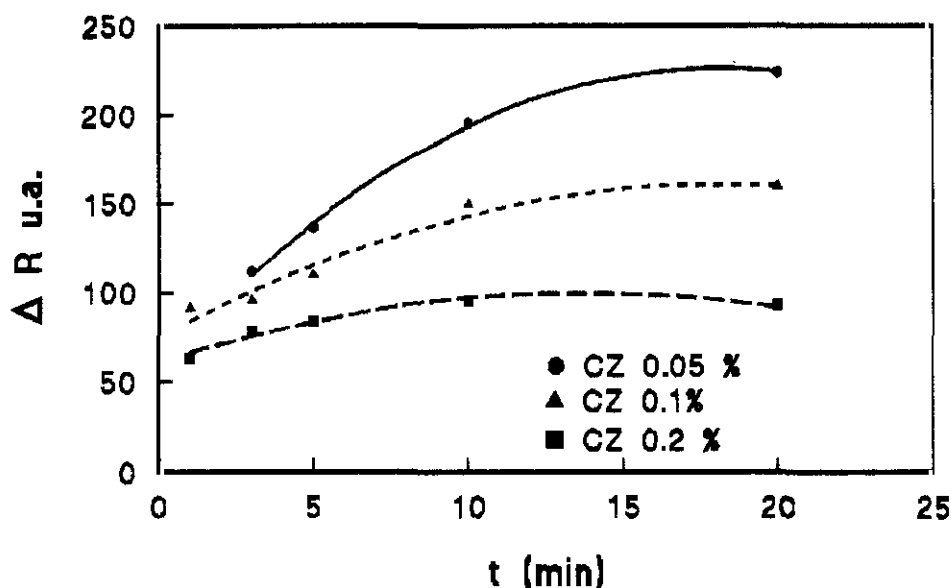


Figura 58. Efecto de la concentración de CS en la reflectancia del complejo CS-Fe(III) respecto al blanco, [Fe(III)] 1 $\mu\text{g/ml}$

2.2.5. INFLUENCIA DEL pH EN LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO

Este estudio se llevó a cabo midiendo la reflectancia a la longitud de onda óptima de sistema CS-Fe(III) en el intervalo de pH 3.5 - 6.0. Los complejos se forman pasando a través de la célula de flujo disoluciones con 0.4 $\mu\text{g/ml}$ de Fe(III) a diferentes pH durante un tiempo de 5 minutos. La figura 42 muestra los resultados obtenidos, los valores de reflectancia representados son la diferencia entre el blanco (fase reactiva al pH deseado) y el complejo. En ella se observa que el pH óptimo de formación del complejo CS-Fe(III) es 4.2.

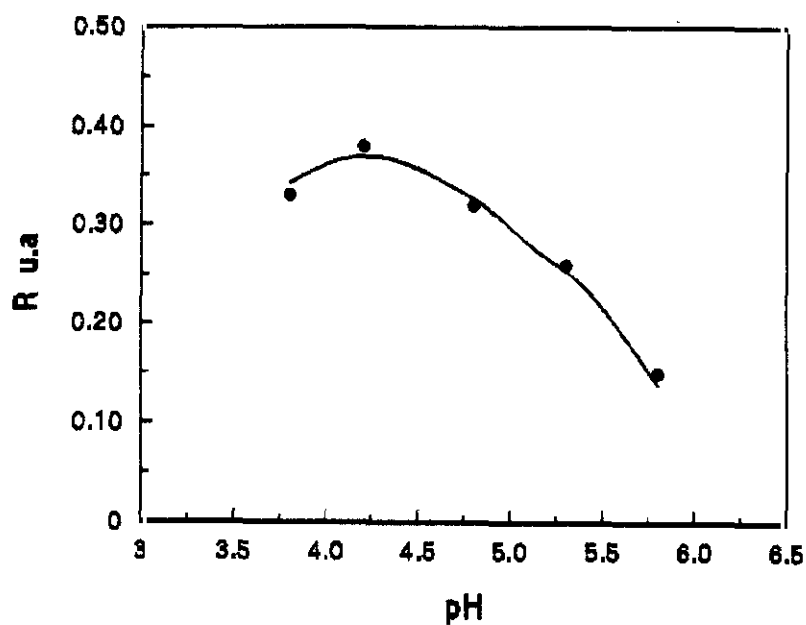


Figura 59. Influencia del pH en la formación del complejo CS-Fe(III) [Fe(III)] 0.4 $\mu\text{g/ml}$

2.2.6. NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA.

Con el fin de estudiar la influencia de la naturaleza de la disolución reguladora en la formación del complejo, se formó éste al pH óptimo en presencia de acético/acetato, succínico/succinato y biftalato/ftalato. La medida de la reflectancia se realizó a los 5 minutos.

La figura 60 representa la reflectancia de los distintos sistemas en función de la naturaleza de la disolución reguladora. En ella se observa una mayor diferencia de reflectancia entre el complejo y el blanco cuando se emplea acético/acetato como disolución reguladora.

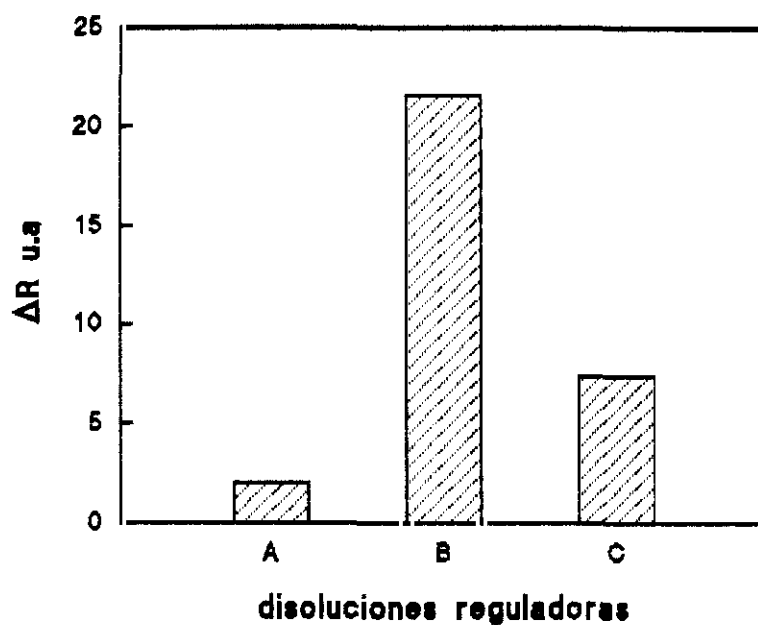


Figura 60. Efecto del medio regulador en la reflectancia del complejo CS.-Fe(III), [Fe(III)] 0.4 $\mu\text{g/ml}$

Una vez optimizado el pH y la naturaleza del tampón se procedió a determinar su concentración óptima. Para ello se varió la concentración de la disolución reguladora acético-acetato desde 0.025M a 0.5M preparando muestras y blancos en las mismas condiciones; una vez formado el complejo (5 minutos) se representaron las diferencia de reflectancia entre blanco y complejo (Figura 61) obteniéndose una concentración óptima 0.05M en acético/acetato para posteriores experimentos.

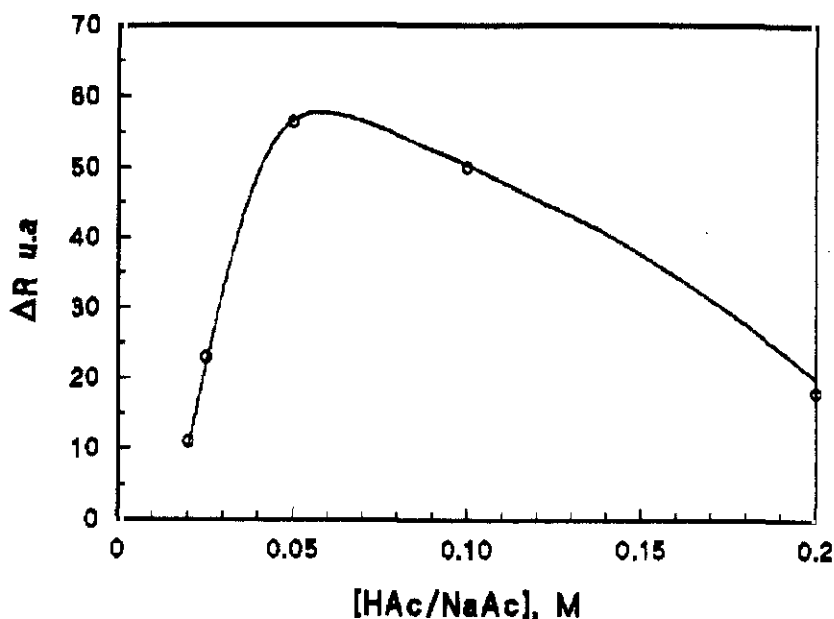


Figura 61. Efecto de la concentración de acético/acetato sobre la señal de reflectancia del complejo CS-Fe(III) respecto al blanco. pH 4.2, [Fe(III)] 0.4 $\mu\text{g/ml}$

2.2.7. CINÉTICA DE LA REACCIÓN.

La cinética de las reacciones sobre superficies sólidas suele ser más lenta que la de las reacciones en disolución, dada la existencia de un fenómeno de transferencia de materia hasta la superficie sólida. Se ha realizado un estudio para conocer la cinética de las reacciones entre CS inmovilizado y Fe (III) registrándose los espectros de reflectancia a distintos tiempos, con el fin de determinar el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en la formación de dicho complejo.

Con esta finalidad, se siguió el procedimiento que a continuación se detalla: -Se rellenó la célula con una cantidad determinada de gel de sílice-cromazurol S, posteriormente se bombeó una disolución que contenía $0.1 \mu\text{g/ml}$ de Fe(III) a pH 4.2 y se realizaron los espectros de reflectancia frente a la longitud de onda, a diferentes tiempos (5, 10, 20, 60 y 180 minutos).

Como se observa en la Figura 62 el complejo CS-Fe(III) alcanza el equilibrio de formación a tiempos inferiores a diez minutos. En esta figura también se observa la variación de la longitud de onda óptima del complejo a medida que evoluciona la formación del mismo. Eligiéndose para los experimentos posteriores la longitud de onda que corresponde a la máxima diferencia de reflectancia entre el blanco y la muestra para un tiempo de 5 minutos (λ 680nm).

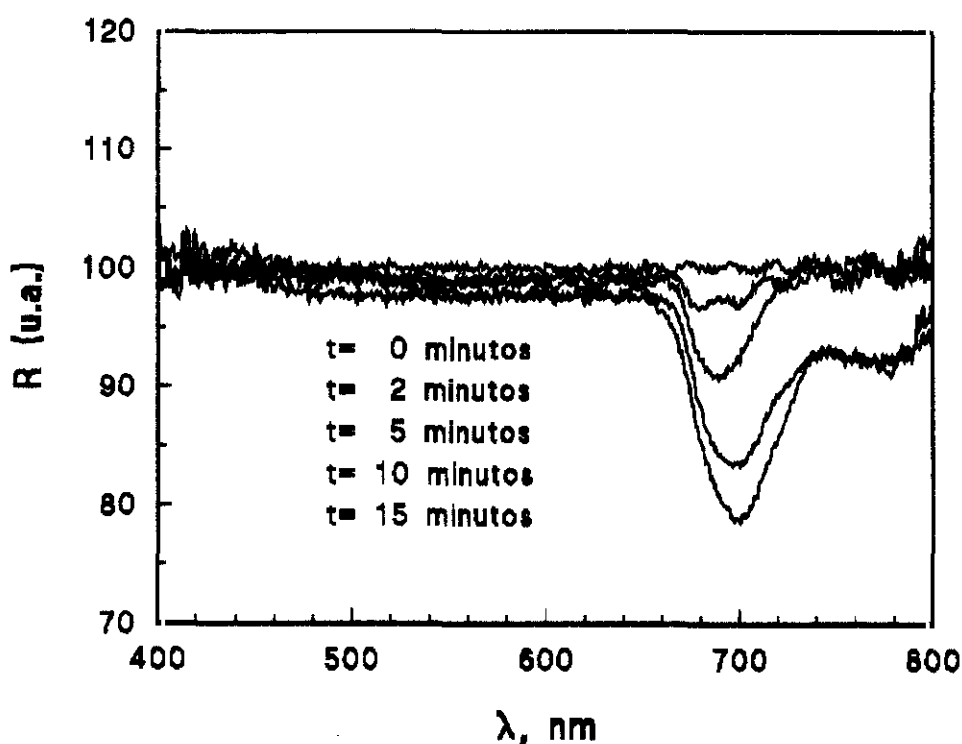


Figura 62. Espectros de reflectancia del complejo CS-Fe(III) [Fe(III)] $0.1 \mu\text{g/ml}$ a distintos tiempos de formación.

2.2.8. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

El establecimiento de las características analíticas del complejo CS-Fe(III) sobre gel de sílice se llevó a cabo siguiendo el procedimiento en flujo descrito en el apartado II.2.3.2.

2.2.8.1. Intervalo de linealidad Con el fin de determinar el intervalo de concentración de Fe(III) que proporciona una respuesta lineal en las medidas de reflectancia se realizó un calibrado en flujo.

Para ello se hace pasar a través de la célula de flujo donde tenemos nuestro soporte con el reactivo inmovilizado, en primer lugar disolución reguladora (acético/acetato 0.05M pH 4.2), hasta mantener la línea base, después la disolución de Fe(III) de una determinada concentración durante 5 minutos que da lugar a una disminución de la intensidad de reflectancia, para pasar por último la disolución regeneradora que en nuestro caso es HCl 1M que nos devuelve la señal a la línea base. Este mismo proceso se efectúa con las diferentes concentraciones de Fe(III). La respuesta del sensor frente al tiempo se encuentra representada en la Figura 63.

La recta de trabajo se obtiene representando las pendientes de la función intensidad de reflectancia-tiempo correspondiente a 5 minutos frente a la concentración de Fe(III). Los datos obtenidos de esta manera se representan en la figura 64 donde se puede observar que el intervalo de linealidad se cumple hasta una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de Fe(III).

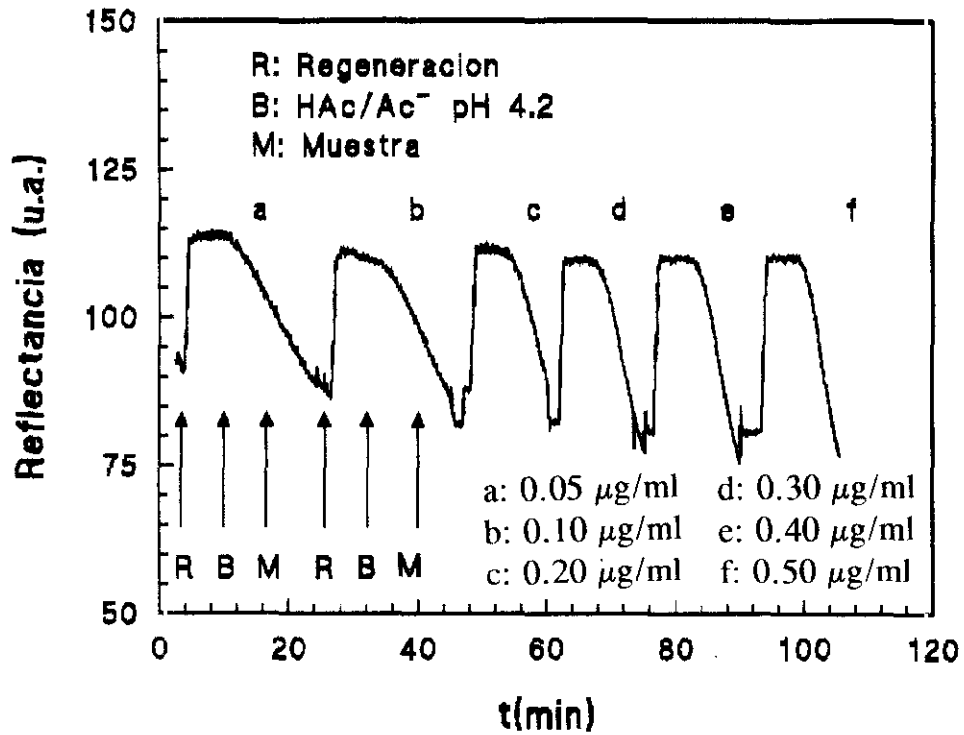


Figura 63. Respuesta de la fase reactiva en presencia de diferentes concentraciones de Fe(III)

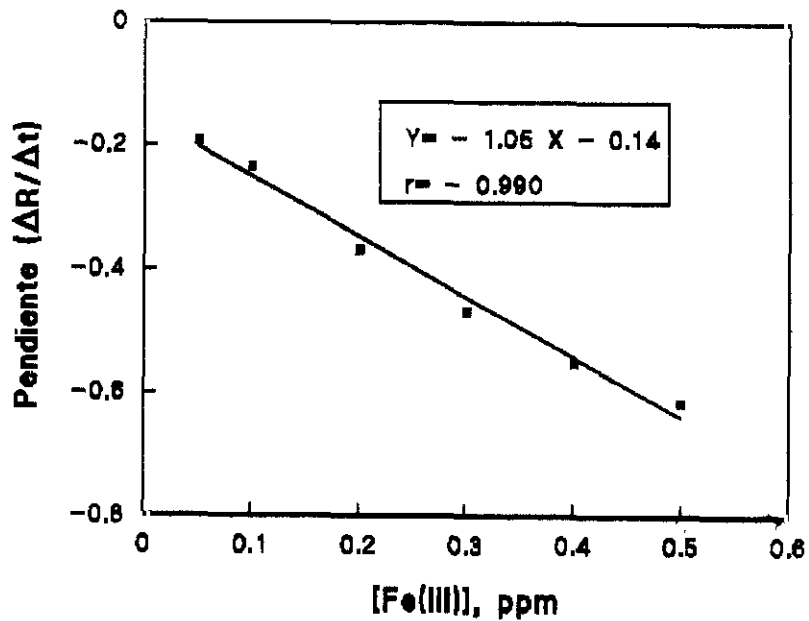


Figura 64: Calibrado para Fe(III) $(\Delta R / \Delta t)$ frente a $[Fe(III)]$

La recta de calibrado responde a la ecuación

$$Y = -1.05 X - 0.14 \text{ con un coeficiente de correlación } 0.989$$

2.2.8.2. Límite de detección, límite de cuantificación y precisión del método El límite de detección del método propuesto se calculó teniendo en cuenta la desviación estándar de 10 determinaciones de un mismo blanco de reactivo y aplicando la norma de la I.U.P.A.C. para calcular dicho valor.

$$L.D. = K s_b/S$$

donde s_b es la desviación estándar de dichos blancos, y S la pendiente del calibrado obtenido en las condiciones antes expuestas. Aplicando la fórmula para $K=3$ el límite de detección obtenido fue de **10 ng/ml para Fe(III)**. El límite de cuantificación calculado para $K=10$ es de 30 ng/ml.

El método desarrollado mejora notablemente el límite de detección del sensor tipo sonda (219) que emplea el mismo reactivo inmovilizado en una resina aniónica. El aumento de sensibilidad obtenido se debe a la preconcentración en continuo que se realiza en la fase reactiva.

El cálculo de la precisión se llevó a cabo preparando 10 disoluciones diferentes de 100 ng/ml de Fe(III) a pH=4.2. y se siguió el procedimiento anteriormente explicado obteniéndose una desviación estándar relativa del 4.8% con los datos adquiridos.

2.2.8.3. Estudio de interferencias. Para este estudio el procedimiento operativo fue el mismo que el empleado para medir sus características analíticas, bombeándose la disolución del analito en presencia del posible interferente. El trabajo se efectuó para una concentración de Fe(III) 200 ng/ml.

Los cationes elegidos fueron aquellos que dan reacción con el cromazurol S en disolución. Igualmente se eligieron los aniones más frecuentes en muestras de agua, así como los aniones complejantes del analito.

Se consideró interferente aquel ión que daba lugar a una variación en la señal de reflectancia superior a $2s$, siendo s la desviación estándar de la disolución que contenía 200 ng/ml Fe(III) en ausencia del ión potencialmente interferente. En este caso no se consideran interferentes todos aquellos iones que produzcan una señal relativa comprendida entre 91 - 109%.

Los resultados obtenidos (tabla 21) muestran una seria interferencia de Al(III), I^- y F^- mientras que el resto de iones ensayados no interfieren hasta concentración 50-100 veces mayores que la Fe(III)

Tabla 21. Estudio de interferencias sobre la reflectancia del complejo CS- Fe(III)

ION	Relación ion/Al(III)(*)	Sensibilidad relativa(**)
Na(I)	100:1	95
K(I)	100:1*	96
Ca(II)	50/1	108
Mg(II)	50/1	108
Cu(II)	10/1	99
Ni(II)	50/1	110
Zn(II)	50/1	95
Pb	10/1	92
Cd	50/1	87
Cu	10/1	100
Al	1/1	78
F^-	1:1	65
Br^-	1:1*	97
I^-	1/1*	120
NO_3^-	50/1	92
Cl^-	100:1*	104
CO_3^{2-}	50:1*	100

(*) Relación máxima ensayada.

(**) Relación entre la señal obtenida de una disolución de Fe(III) en presencia y en ausencia del elemento interferente.

4.2. APLICACION ANALITICA.

Dado que no era probable que en las aguas analizadas objeto de nuestro estudio existieron estos iones interferentes en proporción igual a la de hierro no hubo necesidad de eliminarlos al realizar las determinaciones.

El sensor en flujo desarrollado en el presente trabajo se ha aplicado a la determinación de hierro en aguas potables de distintos orígenes.

Para ello se preparó en primer lugar un calibrado en un intervalo de concentración de hierro (50 a 300 ng/ml) ppm en medio acético-acetato a pH 4.2. Las muestras de agua se diluyeron convenientemente, se tamponaron con HAc/Ac⁻ 0.05 M pH 4.2. Cada muestra se midió por sextuplicado. Las señales registradas llevadas a la recta de calibrado dieron lugar a los resultados que figuran en la tabla 22..

Las muestras se sometieron a diferentes diluciones con el propósito de comprobar si existía algún efecto por parte de los posibles elementos interferentes presentes en las mismas y se cuantificó el contenido de Fe(III) mediante el correspondiente calibrado. Si con todas las diluciones ensayadas se obtiene el mismo valor de la concentración de hierro se puede asegurar que no existe efecto debido a las posibles interferencias. En la tabla 22 se puede observar que en las diluciones efectuadas se obtienen los mismos resultados.

La exactitud del método que se propone para determinar Fe(III) se comprobó mediante el empleo de un método alternativo; para ello las muestras de agua analizadas por el método propuesto fueron contrastadas por AA con llama. Los resultados obtenidos tanto por absorción atómica como por reflectancia demuestra que no existen diferencias significativas entre ambos métodos a un nivel de probabilidad del 95% y por tanto la validez del método propuesto.

Tabla 22. Aplicación del sensor a la determinación del contenido en Fe(III) de diferentes aguas.

MUESTRA	CONCENTRACION Fe(III)*	
	REFLECTANCIA	AA CON LLAMA(**)
Dilución 1:5	0.74± 0.03	
M1		0.71± 0.04
Dilución 1:10	0.72 ± 0.02	
M2	0.26± 0.02	0.25± 0.03
M3	0.55± 0.02	0.52± 0.03

*Media de 6 medidas \pm s expresado en $\mu\text{g/ml}$

(**) Las muestras analizadas por absorción atómica con llama no se diluyeron.

Como conclusión podemos resaltar la posibilidad de aplicar este sensor en flujo para la determinación de Fe(III) en muestras con bajas concentraciones de hierro para las cuales la absorción atómica con llama no es lo suficientemente sensible presentandose por tanto el sensor en flujo continuo como alternativa a la absorción atómica sin llama. Hay que hacer notar que las muestras analizadas por AA no se diluyeron, dada la menor sensibilidad de esta técnica frente al método propuesto.

3. SENSOR DE FLUORESCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE Fe(III) EN FLUJO CONTINUO CON PIOVERDINA INMOVILIZADA.

La determinación de Fe(III) es de gran importancia en numerosos campos pero generalmente adolece de métodos suficientemente selectivos y sensibles para su determinación a nivel de ng/ml como ya mencionamos en la introducción.

El sideróforo fluorescente pioverdina podría solucionar este problema puesto que por una parte compleja selectivamente a este analito y por otra parte daría lugar al desarrollo de un método basado en medidas de fluorescencia. Como es sabido la fluorescencia es intrínsecamente más sensible que la espectrofotometría, sin embargo, los métodos más comúnmente utilizados para la determinación de hierro son los espectrofotométricos. En la bibliografía consultada existen muy pocos métodos para la determinación de hierro basados en medidas de fluorescencia (260) y de estos ninguno que emplee una fase sólida como fase reactiva. En este sentido la inmovilización de la pioverdina debería permitir el desarrollo de un biosensor altamente selectivo y sensible para la determinación de Fe(III), por todo ello iniciamos este camino con gran entusiasmo.

Una vez aislado y purificado el sideróforo del medio de cultivo en que había sido sintetizado por las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado II.1.1.2., se estudió su comportamiento en disolución acuosa frente al ion Fe(III) como paso previo a la búsqueda de soportes sólidos adecuados para su inmovilización.

3.1. ESTUDIO PREVIO DEL COMPORTAMIENTO EN DISOLUCIÓN ACUOSA DEL COMPLEJO Fe(III)-PIOVERDINA.

3.1.1. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

Con objeto de estudiar los espectros de excitación y emisión de fluorescencia se prepararon disoluciones acuosas del pigmento pioverdina a una concentración de $6.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ a pH 7 en ausencia y en presencia de 200 ng/ml de Fe(III). Una vez realizado los espectros de ambas disoluciones se obtuvieron los resultados que se muestran en la Figura 65, en ella observamos que el reactivo pioverdina muestra un máximo a 465 nm cuando se excita a 390 nm. Por otra parte se puede observar que la fuerte emisión de fluorescencia del sistema decrece drásticamente (95%) en presencia de Fe(III) debido a la desactivación estática del sistema por formación de un complejo no fluorescente y muy estable con este analito.

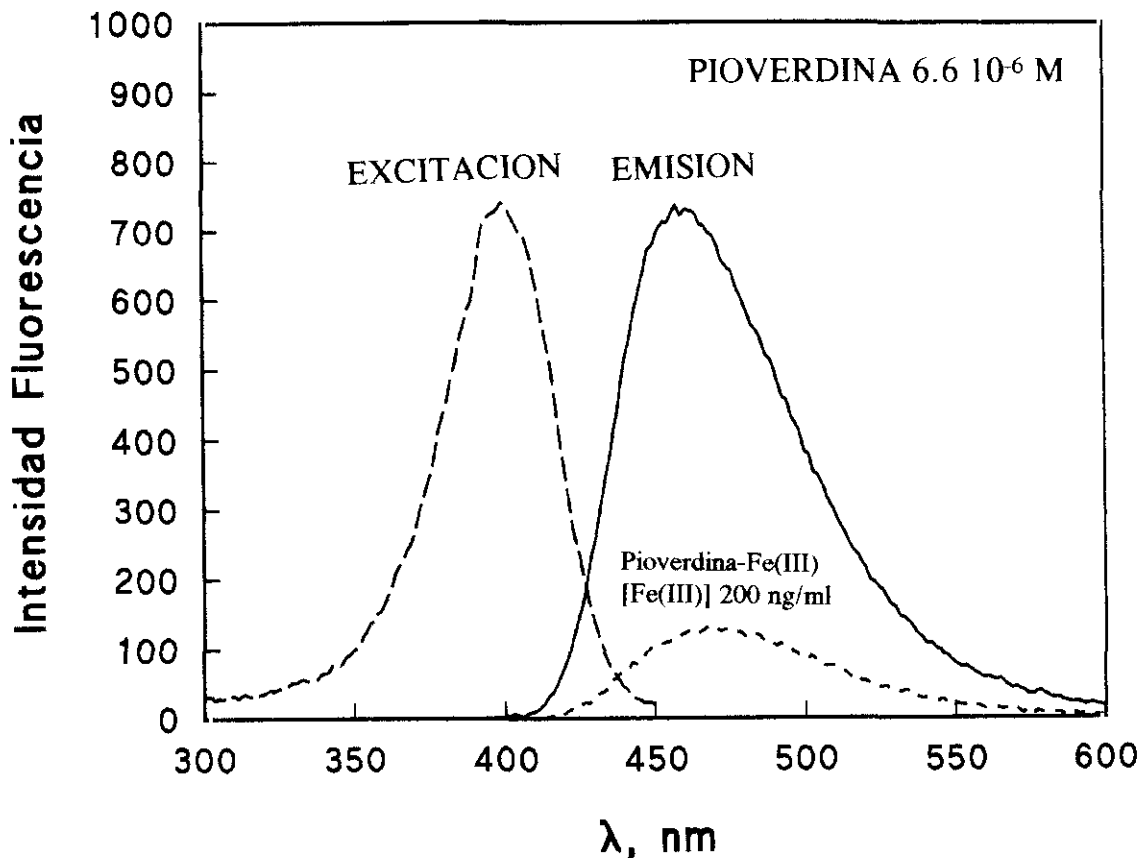


Figura 65. Espectros de luminiscencia de una disolución de pioverdina $6.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

3.1.2. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL pH.

La influencia del pH en la fluorescencia tanto del pigmento libre como del complejo pioverdina-Fe(III) se llevó a cabo preparando una serie de disoluciones con pH comprendido entre 5 y 10 para una concentración $6.6 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de pioverdina en ausencia y en presencia de 200 ng/ml de Fe(III). La figura 66 muestra la emisión de fluorescencia de las diferentes disoluciones frente al pH, en ella se puede observar que pioverdina emite su máxima fluorescencia en el intervalo de pH comprendido entre 6.5-7.5, a pH inferiores o superiores se produce un decrecimiento de la misma. El complejo Fe(III)-pioverdina produce una emisión de fluorescencia constante e inferior a la del pigmento libre en el intervalo estudiado.

El pH seleccionado como óptimo se encuentra comprendido entre 6.2-7.8?? ya que en dicho intervalo se produce la máxima diferencia de fluorescencia entre reactivo y complejo, lo que indica que el pH es favorable para la emisión de fluorescencia por el pigmento y óptimo para la formación del complejo.

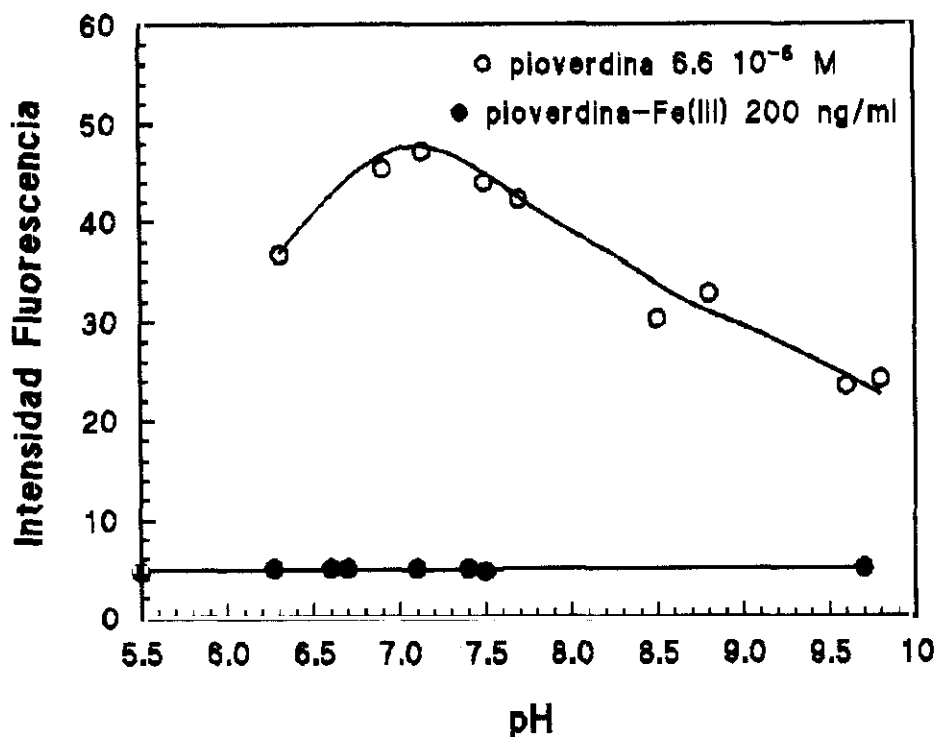


Figura 66. Influencia del pH en la emisión de fluorescencia de disolución de pioverdina y del complejo pioverdina -Fe(III).-

3.1.3. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA

Una vez establecido el intervalo de pH óptimo se estudió el efecto ejercido por la naturaleza de la disolución reguladora sobre el sistema. Se utilizaron TRIS, MES, HEPES; HMTA en concentración 0.5M y a pH dentro del intervalo considerado como óptimo. El estudio se llevó a cabo para una concentración de pioverdina de $6.6 \cdot 10^{-6}M$ y 200 ng/ml de Fe(III). La tabla 23 muestra los resultados obtenidos. En ella se puede observar que todas las disoluciones utilizadas disminuyen la señal fluorescente de la pioverdina respecto a la señal obtenida en ausencia de disolución reguladora. En la misma tabla se refleja la diferencia de fluorescencia entre el blanco y complejo para las distintas disoluciones reguladoras, siendo el tampón MES es el que dió lugar a la mayor diferencia. Por ello se seleccionó dicha disolución como medio idóneo para el estudio del sistema en disolución acuosa.

Tabla 23. Efecto de la naturaleza de la disolución reguladora en la intensidad de fluorescencia (IF) de la pioverdina y en la extensión de la formación del complejo con hierro.

DISOLUCION REGULADORA	IF BLANCO	IF MUESTRA	IF BLANCO - MUESTRA
	59.6	3.0	56.3
H2MTA+ /HMTA	46	30.9	15.1
MES	42.9	15.1	27.8
TRIS	46.3	25.2	21.1
IMIDAZOL	42.6	17.4	25.2
CITRATO	47	37.6	10.4

Una vez resuelta la naturaleza de la disolución reguladora que se va a utilizar se optimizó la concentración de la misma; para ello se prepararon disoluciones de pioverdina tanto en presencia como en ausencia de Fe(III) con diferentes concentraciones de MES (0 - 0.5M) y se midió la intensidad de fluorescencia a 465 nm. En la Figura 67 se representan los resultados obtenidos observándose que cuanto más diluida es la concentración

reguladora más elevada es la señal, este resultado era previsible ya que como hemos expuesto antes, la presencia de disolución reguladora sea de la naturaleza que fuere disminuye la intensidad de fluorescencia del pigmento y afecta a la extensión de la formación del complejo. Se eligió 0.05M para experimentos posteriores para asegurar la capacidad de tamponamiento de la disolución reguladora si bien produce un decrecimiento de la señal analítica de un 8%

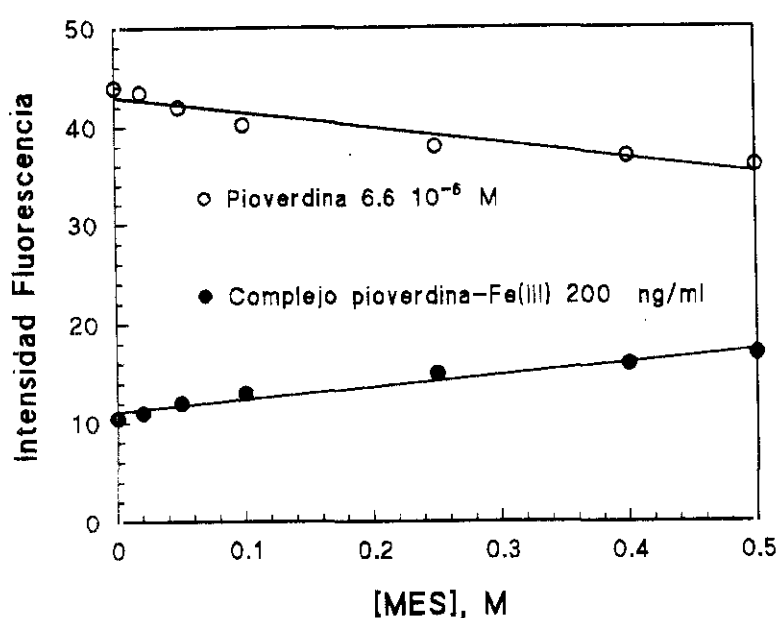


Figura 67. Influencia de la concentración de MES en la señal de fluorescencia de pioverdina y de su complejo con hierro.

3.1.4. INFLUENCIA DE LA FUERZA IÓNICA

Para determinar la influencia que ejerce la fuerza iónica del medio sobre la señal analítica se prepararon disoluciones que contenían electrolitos de diferente naturaleza (KCl o NaClO_4) en concentraciones variables (0 - 1M) en presencia de una concentración de $6.6 \cdot 10^{-6}$ M de pioverdina y 200 ng/ml de Fe(III) a pH 6.5 en ausencia de disolución reguladora con objeto de no modificar con su presencia la fuerza iónica. La tabla 24 muestra los resultados obtenidos no existiendo efecto alguno sobre la señal fluorescente del pigmento, ni sobre la señal de fluorescencia del sistema en presencia del hierro (III) a fuerza iónica < 0.5M. Para fuerza iónica superiores se produce un menor decrecimiento de la intensidad de fluorescencia de la pioverdina en presencia de ión férrico.

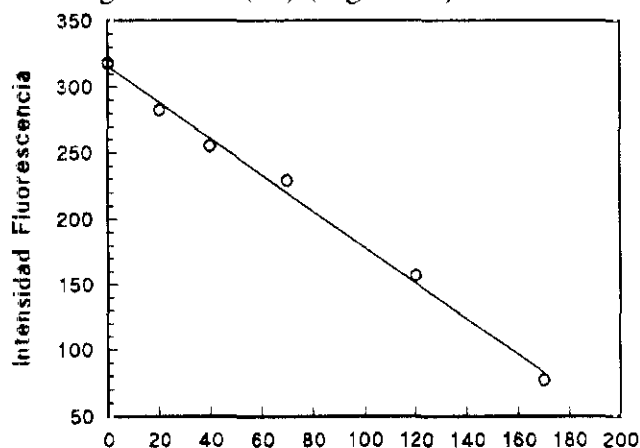
Tabla 24 Efecto de la fuerza iónica sobre la señal relativa de fluorescencia del complejo pioverdina-Fe(III) frente al blanco

	KCl 0.1 M	KCl 0.5M	KCl 1M	NaClO ₄ 0.5M	NaClO ₄ 1M
IF _(B- C)	29.8	27.2	13.5	28.6	17.3

3.1.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

Siguiendo en la línea de caracterizar completamente el comportamiento de la pioverdina en disolución acuosa antes de proceder a su inmovilización con objeto de ser utilizada como fase reactiva en sensores ópticos, se procedió a establecer las características analíticas del método.

3.1.5.1. Intervalo de linealidad. Con objeto de establecer el intervalo de linealidad se prepararon disoluciones, en las condiciones óptimas de trabajo, que contenían Fe(III) en concentración variable entre 10 y 200 ng/ml obteniendo las lecturas de intensidad de fluorescencia a 465 nm (λ_{exc} 390 nm). El calibrado se efectuó representando la intensidad de fluorescencia frente a la concentración de Fe(III); se obtiene de esta manera una respuesta lineal hasta 180 ng/ml de Fe(III) (Figura 68)

**Figura 68** Calibrado en disolución acuosa

La recta obtenida responde a la ecuación:

$$I_f = -1378,42 [\text{Fe(III)}] + 317.66 \quad \text{con un coeficiente de correlación de } 0.995$$

3.1.5.2. Límite de detección, límite de cuantificación y precisión. El límite de detección del método se halló preparando 10 disoluciones del blanco preparados en las mismas condiciones que las muestras de la recta de calibrado y midiendo su intensidad de fluorescencia. El límite de detección se calculó aplicando la norma recomendada por la IUPAC como viene siendo habitual en esta memoria

$$LD = K S_{\text{blanco}} / P_{\text{dte calibrado}},$$

donde K toma un valor de 3 para el nivel de probabilidad del 99.7% Si $K = 10$ se obtiene el límite de cuantificación.

El LD obtenido fue de 10 ng/ml mientras que el de cuantificación fue de 31 ng/ml.

El estudio de la precisión se efectuó midiendo la señal analítica de 10 disoluciones análogas con una concentración de Fe(III) de 50 ng/ml, MES 0.051M y pH 6.5. La precisión expresada como desviación estándar relativa fue del 4%

3.1.5.3. Estudio de las interferencias. Por último y para completar el estudio del pigmento pioverdina en disolución acuosa se procedió a estimar la influencia sobre la señal analítica de posibles elementos interferentes. El estudio se efectuó efectuando dos calibrados uno de ellos en ausencia de interferencias y el segundo en presencia de varios iones potencialmente interferentes (Ca 0.5 ppm, Mg 0.5 ppm, Cu 0.1ppm, Zn 0.4 ppm, Cd 0.5 ppm, Ni 50 ppb, Pb 50 ppb)

Los calibrados obtenidos se representan en la figura 69 y si bien sus pendientes son paralelas no lo son sus ordenadas en el origen lo que nos hace suponer que la menor intensidad de fluorescencia del calibrado en presencia de los posibles interferentes pueden estar contaminados con hierro.

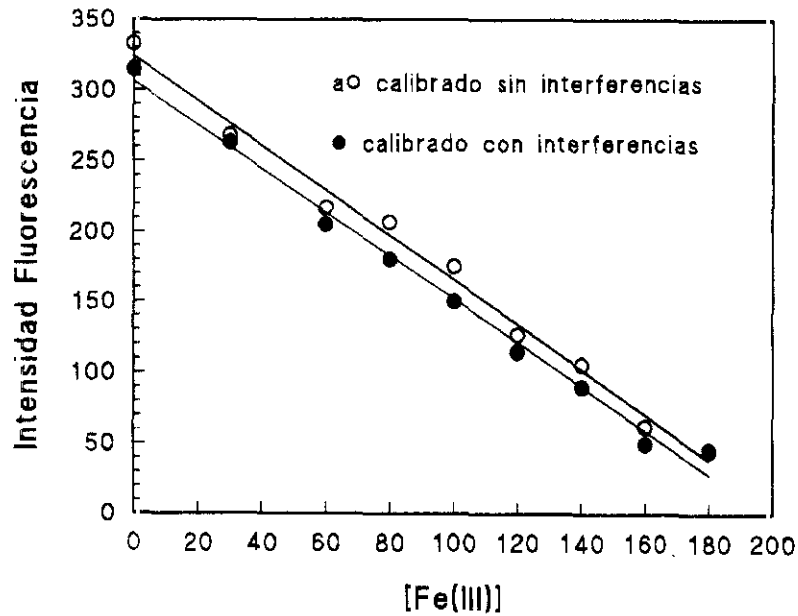


Figura 69. Calibrado en presencia y en ausencia de interferentes

Las ecuaciones de las rectas correspondientes son:

○ $Y = - 1.58 X + 324.13$

● $Y = - 1.54 X + 306.16$

La caracterización del sideróforo proporcionó un resultado prometedor para proseguir con la siguiente etapa, su inmovilización, ya que es de preveer que dado que en las "fases reactivas" se preconcentra el analito, el límite de detección deberá mejorar.

3.2. CARACTERIZACIÓN EN FLUJO CONTINUO DEL SISTEMA Fe(III)-PIOVERDINA INMOVILIZADO SOBRE CPG Y SU APLICACION ANALITICA.

Una vez concluido el estudio en disolución se procedió a inmovilizar el reactivo en diferentes soportes. La inmovilización se llevó a cabo mediante dos mecanismos diferentes con el fin de poder comparar las fases reactivas obtenidas: enlace covalente sobre vidrio de poro controlado y atrapamiento físico en vidrio obtenido por un procedimiento sol-gel. A continuación se pasará a exponer la caracterización del sensor obtenido mediante enlace covalente, mientras que el obtenido con el vidrio sol-gel se describirá en los apartados siguientes (III.3.3. y III.4.)

Se seleccionó el vidrio como soporte idóneo dado que: a) es altamente inerte, b) no está sujeto a degradación microbiana y c) no está sujeto a hinchamiento al variar la fuerza iónica del medio como es el caso de los intercambiadores iónicos.

En la bibliografía consultada es de uso generalizado el vidrio de poro controlado para la inmovilización de enzimas, nuestro reactivo no es una enzima pero posee una corta cadena de aminoácidos además de centros involucrados en la formación del complejo con Fe(III) que deben estar orientados adecuadamente para formar dicho complejo ya que es de estructura octaédrica. Es por esta "similitud" que juzgamos oportuno utilizar alguno de los muchos procedimientos descritos ya en bibliografía, la mayoría de ellos supone la unión covalente de la enzima a la superficie del vidrio para la inmovilización de enzimas en CPG.

El estudio se ha llevado a cabo en flujo continuo con el dispositivo de medida descrito en el apartado II.2.1.2. y siguiendo el procedimiento que se expone en II.2.3.3.1.

3.2.1. INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PORO DEL VIDRIO DE PORO CONTROLADO.

El vidrio de poro controlado es un soporte ampliamente utilizado para la inmovilización de toda clase de moléculas principalmente enzimas por ser altamente inerte y por la amplia gama existente en el mercado en cuanto al tamaño de poro que lo hace adecuado para la inmovilización de reactivos de muy diferente tamaño.

En el diseño de esta experiencia se contó con CPG de dos tamaños de poro para la inmovilización de pioverdina (237 y 460 Å). En los dos casos se siguió el mismo procedimiento de inmovilización descrito en el apartado II.2.2.2.1. La fluorescencia emitida por el pigmento inmovilizado en CPG de 460 Å fue significativamente mayor que la emitida al inmovilizar sobre CPG de 237 Å. Este hecho coincide con las observaciones hechas por Kurtz (261) que observó mayor eficiencia de inmovilización de enzimas cuanto mayor es el tamaño de poro. Según otros autores el tamaño de poro útil es aproximadamente al tamaño de molécula a inmovilizar. La reaccinabilidad frente al Fe(III) se cuantificó haciendo reaccionar los dos soportes con la misma cantidad de Fe 100ng/ml durante dos minutos (Figura 70) obteniéndose una mayor respuesta en el CPG de tamaño de poro mayor, por lo que a la vista de estos resultados se seleccionó CPG de 460 Å para posteriores experimentos.

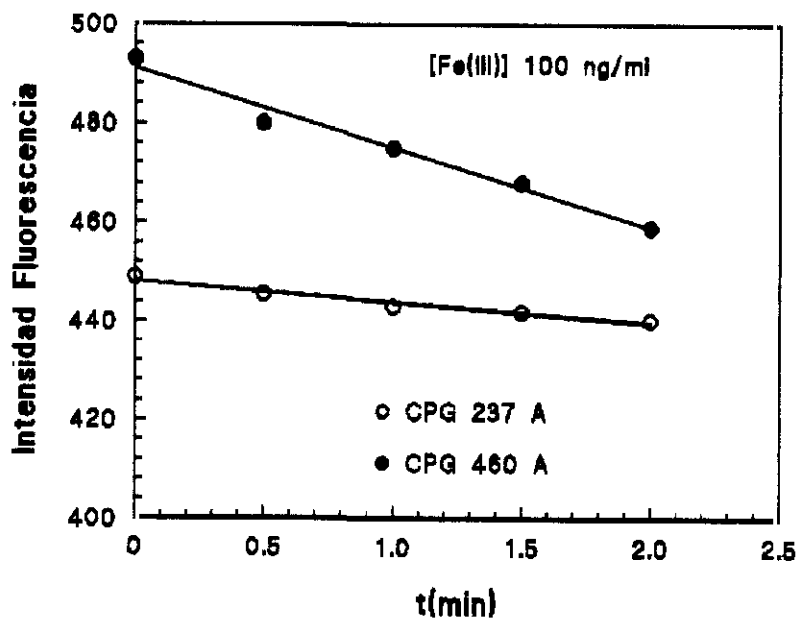


Figura 70: Intensidad de fluorescencia de fases reactivas en presencia de Fe(III) frente al tiempo CPG 460 Å y 237

3.2.2. CONCENTRACIÓN DE REACTIVO.

Esta variable es de vital importancia a la hora de disponer de una fase sólida reactiva. En nuestro caso y ya que el reactivo en sí mismo es fluorescente y su complejación con Fe(III) produce disminución de la fluorescencia nos interesa obtener una fase reactiva de partida con una elevada intensidad de fluorescencia. Para seleccionar la concentración óptima de pioverdina se procedió a la inmovilización de tres concentraciones diferentes de reactivo ($6.65 \cdot 10^{-5}M$, $1.3310^{-4}M$ y $6.6510^{-4}M$) utilizando en cada caso la misma cantidad de CPG como soporte sólido.

Una vez realizado el procedimiento de inmovilización se procedió a cuantificar la cantidad de pioverdina que permanecía en disolución mediante la medida de la absorbancia a 405 nm. La cantidad de reactivo inmovilizado se calculó por diferencia entre la concentración de partida y la final. Este estudio demostró que la cantidad de pioverdina inmovilizada en CPG había sido 0.001 mmol/g en los tres casos con lo que aseguramos haber inmovilizado la mayor cantidad posible de pigmento y por tanto tener la máxima intensidad de fluorescencia inicial. La inmovilización de mayor cantidad de reactivo supondría "activar al máximo" la superficie del vidrio o elegir otro CPG con mayor superficie.

3.2..3. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

Se registró el espectro de emisión de fluorescencia (Figura 71) del pigmento inmovilizado en CPG cuando se excita a 500 nm cuando se encuentra situada en la célula de flujo Hellma 176.52

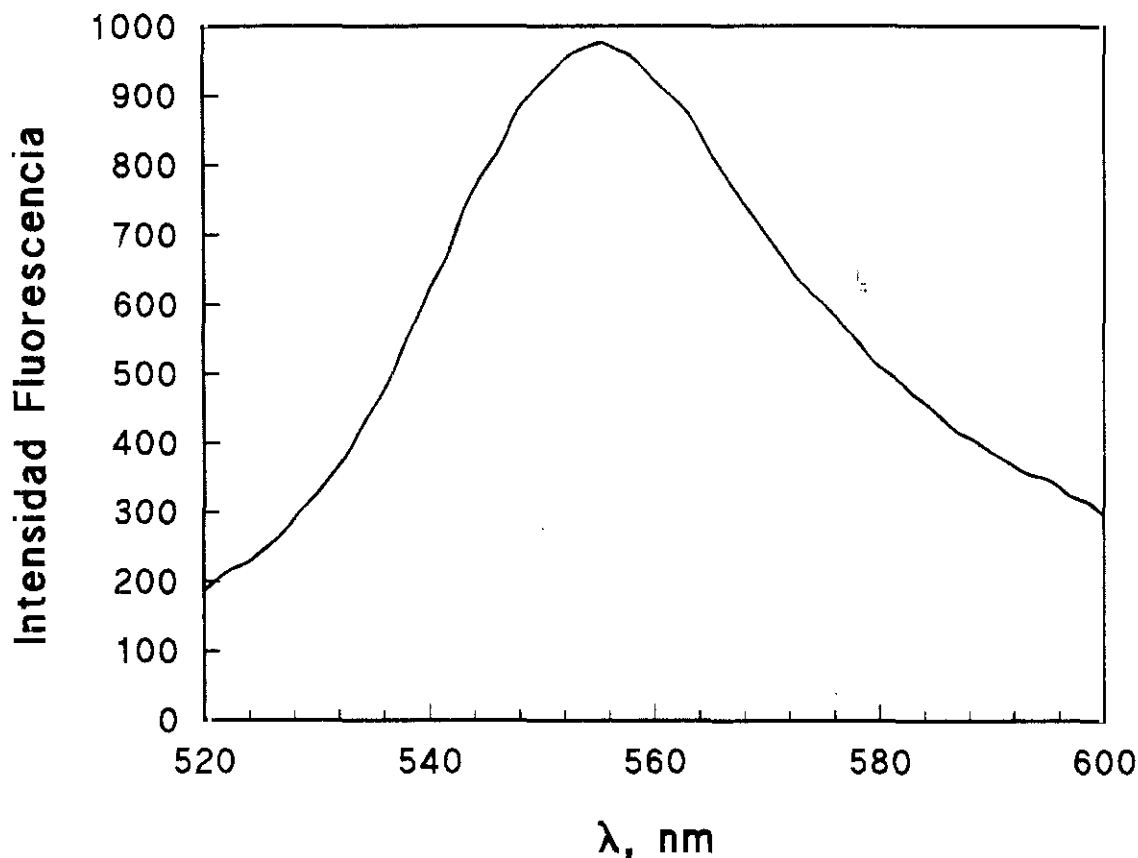


Figura 71: Espectro de emisión de fluorescencia λ_{exc} 500 nm no corregido de pioverdina inmovilizada en CPG

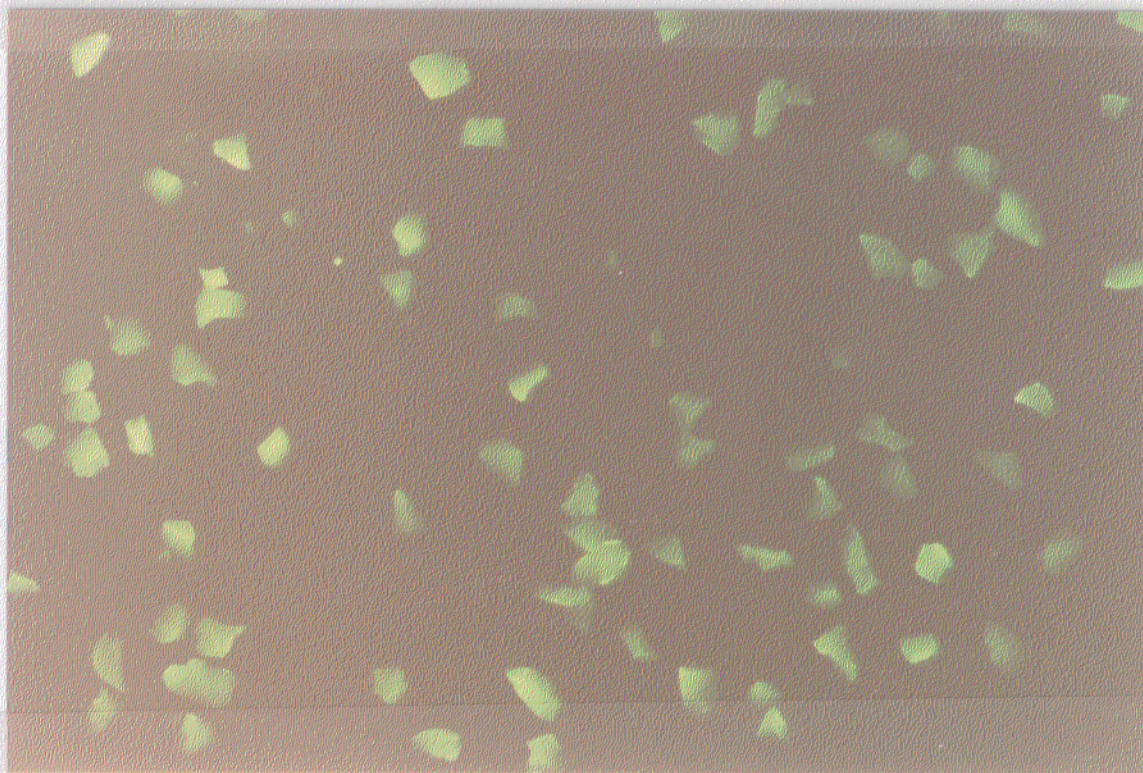
Si comparamos estos máximos con los obtenidos en disolución acuosa (emisión 465 nm y excitación 390 nm) se observa que se produce un importante desplazamiento hacia el rojo cuando el reactivo está inmovilizado. En un principio se pensó que este hecho era el resultado de las importantes modificaciones estructurales y electrónicas debidas a la formación del enlace covalente en el proceso de inmovilización, sin embargo en ningún trabajo de los consultados en la bibliografía se encuentra un desplazamiento tan drástico en las características espectrales de reactivos inmovilizados; la presencia de un enlace covalente puede producir una modificación de las mismas como máximo de 30 - 50 nm.

Con objeto de esclarecer este hecho, se estudió detalladamente el proceso seguido para la inmovilización registrándose en cada etapa la fluorescencia del soporte sólido. Así se comprobó que después de la aminación del vidrio, éste no presenta fluorescencia. El siguiente paso supone el entrecruzamiento con glutaraldehído y la inmediata adición del

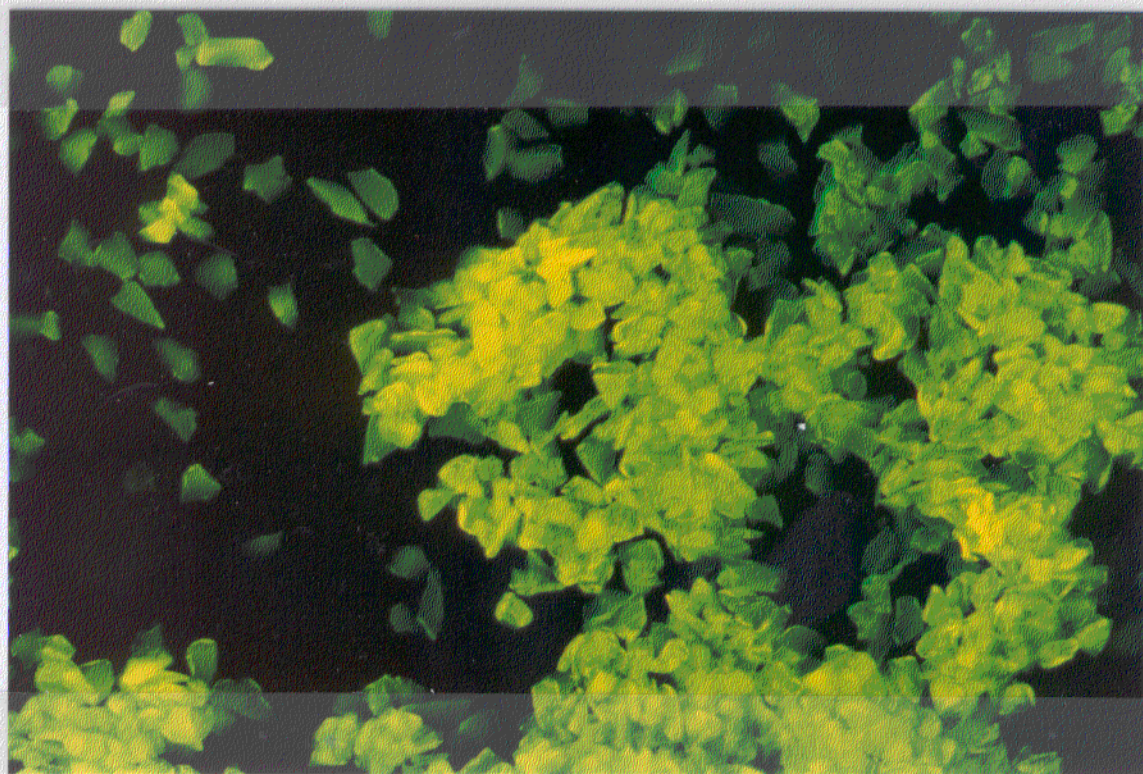
sideróforo. Si en esta última etapa solo se produce el entrecruzamiento con glutaraldehído y se analiza este soporte sólido fluorimetricamente se observa la existencia de una débil luminiscencia con un máximo a 540 nm, que no se debe al siderofofo puesto que este no ha sido inmovilizado todavía, por lo que es de suponer que el entrecruzamiento con el glutaraldehído es el responsable de la fluorescencia. Esta fluorescencia no se ve modificada ni en la posición del máximo ni en intensidad cuando el soporte sólido está en presencia de Fe(III).

El paso siguiente fue analizar el mismo soporte sólido una vez unido el sideróforo, observándose entonces un máximo a 552 nm cuya intensidad se había incrementado notablemente y se modificaba con la presencia de Fe(III) (la intensidad de fluorescencia era máxima cuando no existe Fe(III) y decrece cuando aumenta la concentración de Fe(III) presente en la disolución). De esta manera se comprobó que el glutaraldehído es el responsable del gran desplazamiento batocrómico observado en la emisión de fluorescencia y por otra parte que el comportamiento frente al Fe(III) es análogo al exhibido en disolución acuosa.

La microscopía de fluorescencia fue utilizada para confirmar la diferencia de fluorescencia obtenida en las diferentes etapas del proceso de inmovilización. En la fotografía 1 se ve observa la fluorescencia del vidrio de poro controlado tras la etapa de entrecruzamiento con glutaraldehído (débil fluorescencia) y en la fotografía 2 la fluorescencia después de la inmovilización del sideróforo.



Fotografía 1. Fluorescencia del soporte CPG con glutaraldehído en ausencia de pioverdina, observada en el microscopio de fluorescencia



Fotografía 2. Fluorescencia del soporte CPG con pioverdina inmovilizada, observada por microscopía de fluorescencia.

3.2.4. INFLUENCIA DEL pH

Puesto que la intensidad de fluorescencia de una disolución acuosa de pioverdina depende del pH como hemos visto en el apartado III.3.1.2., fue preciso caracterizar el comportamiento de la fase sólida cuando varía el pH del medio.

El estudio se llevó a cabo bombeando a través de la célula de flujo disoluciones en el intervalo de pH comprendido entre 2 y 9 y midiendo la intensidad de fluorescencia a 552 nm. Igualmente se estudió el efecto del pH sobre la formación del complejo Fe(III)-pioverdina sobre la fase sólida, para ello se bombearon a su través disoluciones de Fe(III) de 100 ng/ml a diferentes pH dentro del intervalo comprendido entre 2-8 y se midió la IF obtenida una vez transcurridos 2 minutos.

La Figura 72 muestra los resultados obtenidos, observando una máxima emisión de fluorescencia del pigmento inmovilizado en el intervalo 3.2-4.5. Por otra parte la zona óptima de pH para la formación del complejo se produce en el intervalo 3.5 y 6, produciéndose la máxima diferencia entre la intensidad de fluorescencia de pioverdina y del complejo en el intervalo comprendido entre 3.5-4.5.

En esta figura también se compara el resultado obtenido en fase sólida con el obtenido en disolución acuosa, deduciéndose que: 1) la intensidad de fluorescencia emitida por la pioverdina se produce a pH más ácido que en disoluciones acuosas, 2) la formación del complejo con el ión férrico en fase sólida tiene lugar también a pH más ácidos que en disolución acuosa.

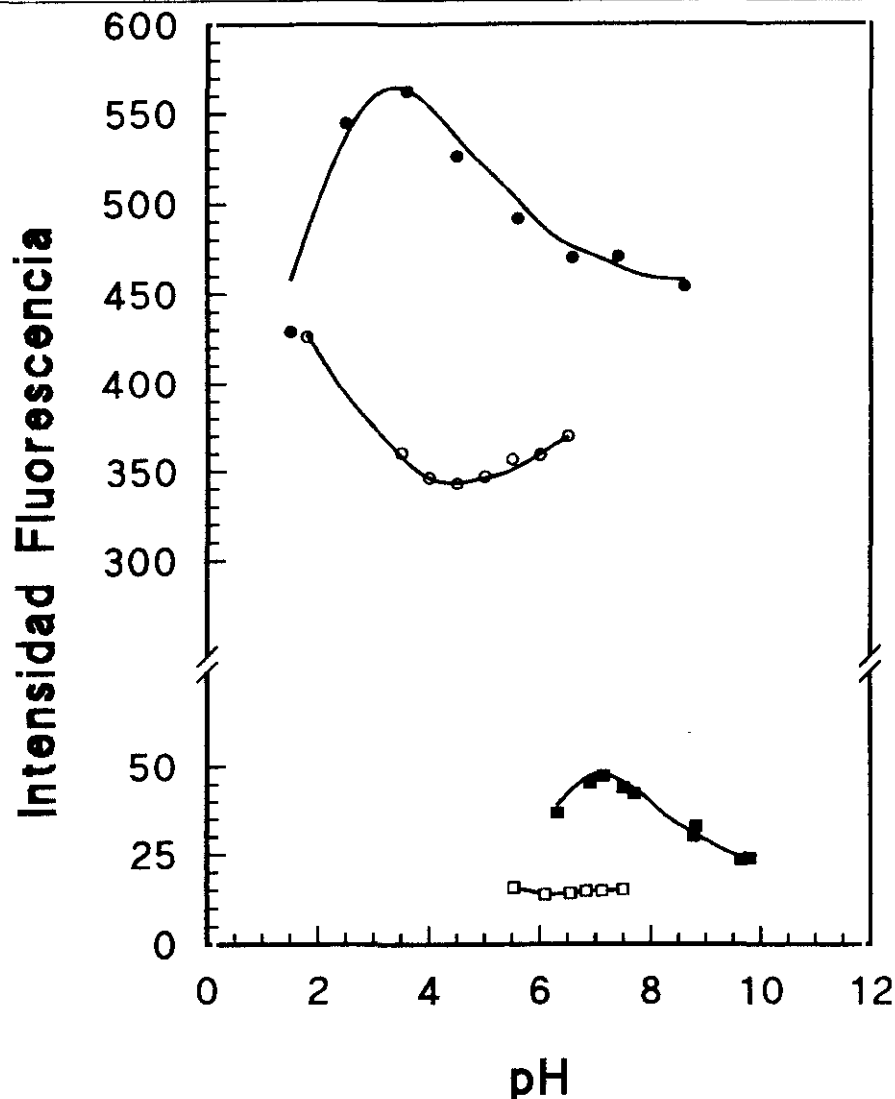


Figura 72. Efecto del pH sobre la intensidad de fluorescencia de: ■ disolución acuosa de pioverdina 6.6 μ M □ sistema pioverdina-Fe(III) en disolución acuosa [Fe(III)] 200 ng/ml, ● 0.001 mmol/g pioverdina inmovilizada en CPG ○ complejo pioverdina-Fe(III) inmovilizado en CPG, [Fe(III)] 60 ng/ml

3.2.5. NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA

Una vez obtenido el valor óptimo de pH para el análisis de hierro con el sistema inmovilizado se procedió a optimizar la naturaleza y concentración de la disolución reguladora a emplear. Se seleccionaron disoluciones reguladoras que mantuvieran el pH en el intervalo óptimo (3.5-4.5) tales como succínico/succinato, acético/acetato, MES, biftalato/ftalato, TRIS y se hizo reaccionar en cada caso la fase sólida durante 2 minutos con disoluciones que contienen la misma concentración de Fe(III) (100ng/ml). En la figura 73 se refleja la influencia de la naturaleza de la disolución reguladora sobre la señal neta

obtenida al restar de la I_F del pigmento inmovilizado la I_F del complejo Fe(III)-pioverdina. Se observa que la máxima señal analítica se obtiene en ausencia de disolución reguladora, (comportamiento similar al empleo del reactivo en disolución acuosa Apartado). La introducción de cualquier disolución reguladora en el sistema de medida disminuye la señal analítica (diferencia en intensidad de fluorescencia entre el blanco y el complejo). Por otra parte todas ellas producen una disminución de I_F de la línea base. La disolución reguladora que menos afecta a la respuesta es biftalato/ftalato por lo que fue seleccionada para posteriores experimentos.

De igual manera cuanto menor es la concentración de la disolución reguladora menor es el efecto que ejerce sobre la señal y sobre la deriva de la línea base. De este estudio se concluyó que la mayor sensibilidad en la determinación de Fe(III) en el sistema en fase sólida se producía a pH 4.5 biftalato/ftalato 0.01M (figura 74). Esta concentración originaba una disminución de la señal analítica de la línea base de únicamente un 10% a los 2 minutos.

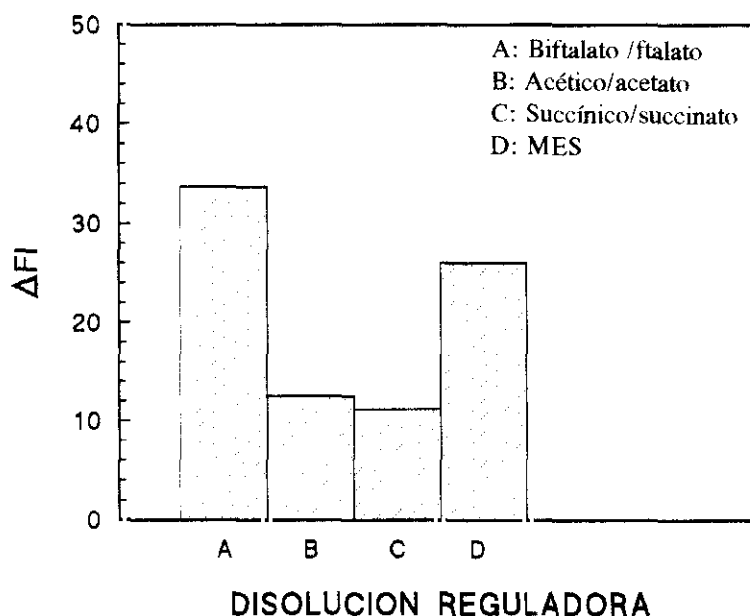


Figura 73. Efecto del medio regulador en la fluorescencia del sistema pioverdina-Fe(III) en CPG

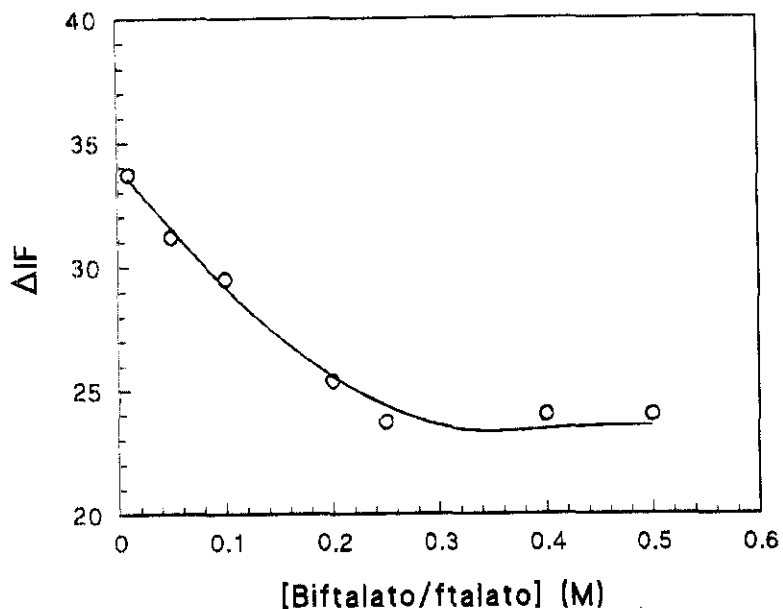


Figura 74 Efecto de la concentración de la disolución reguladora en la intensidad de fluorescencia del complejo pioverdina-Fe(III)

3.2.6. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA.

Con el fin de comprobar si la respuesta de la pioverdina inmovilizada en CPG frente a Fe(III) se ve alterada por la fuerza iónica del medio se evaluó el efecto que la presencia de diferentes electrolitos (KCl, NaClO₄) en distintas concentraciones (0 - 1M) tiene sobre la respuesta del sensor. La señal analítica no se ve afectada por fuerzas iónicas < 0.5 M. Una fuerza iónica superior produce una menor pendiente en el decrecimiento de la fluorescencia en presencia de hierro. Este comportamiento es análogo al obtenido en medio acuoso. En la Tabla 25 se muestran los resultados obtenidos

Tabla 25. Efecto de la fuerza iónica sobre la pendiente de decrecimiento de fluorescencia del complejo pioverdina-Fe(III) [Fe(III)] 60 ng/ml.

	KCl	KCl	KCl	NaClO ₄	NaClO ₄	NaClO ₄
	0M	0.1 M	0.5 M	0M	0.1M	0.5M
Pendiente	- 15.60	-15.45	- 7.84	-15.60	-15.2	- 5.9

3.2.7. ESTUDIO DEL FLUJO EN LA RESPUESTA DEL SENSOR

El flujo de las disoluciones portadoras es una variable crítica cuando se trata de medidas que utilizan reactivos en "fase sólida" puesto que dado que estas fases actúan como sistemas de preconcentración es preciso tener en cuenta por un lado la cantidad absoluta de analito que queda retenido en la fase reactiva (una medida de la capacidad de preconcentración del sólido) y por otro lado la cinética de la reacción puesto que ésta determinará el tiempo óptimo de contacto entre el analito y el reactivo inmovilizado.

El flujo óptimo seleccionado corresponderá a una situación de compromiso entre el tiempo de contacto Fe(III)-pioverdina y la cantidad de hierro que atraviesa la célula de flujo.

El flujo de la disolución que contiene el analito se varió en el intervalo 0.5 - 5 ml/min observándose que la respuesta del sideróforo frente al Fe(III) durante un tiempo de dos minutos es inmediata y se produce un decrecimiento progresivo de la intensidad de fluorescencia inicial debido a la continua formación de complejo pioverdina-Fe(III) en la fase sólida. El estudio se realizó para una concentración de Fe(III) de 60 ng/ml.

La Figura 75 muestra la pendiente de la respuesta obtenida a los distintos flujos, esta es máxima para un flujo de 5 ml/min, seleccionándose este flujo para los estudios posteriores. El hecho de que se pueda trabajar con un flujo tan elevado demuestra una rápida cinética de formación del complejo que hace que tenga más "peso" la cantidad de analito preconcentrado que el tiempo de contacto entre Fe(III) y fase reactiva.

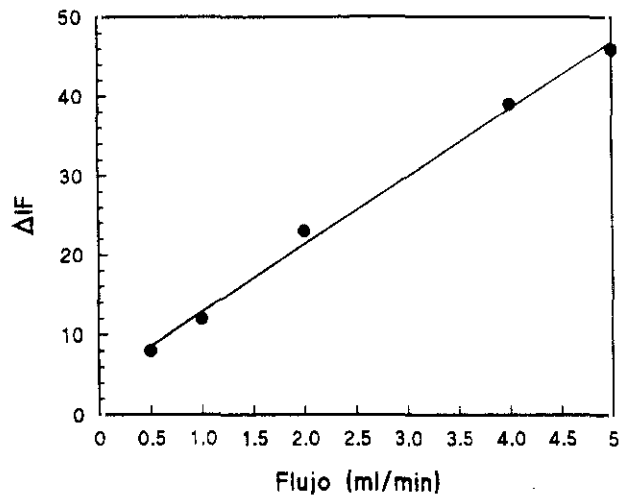


Figura 75.: Efecto del flujo en la respuesta de la fase reactiva.

3.2.8. REGENERACIÓN DEL SISTEMA.

En el desarrollo de sensores químicos que utilizan fases reactivas sólidas la elección de la reacción en que se basa la determinación del analito deseado es fundamental no solo porque de ello dependerá la sensibilidad y selectividad del sensor construido sino también porque dada la forma de operar de un sensor, se requiere que el terminal sensible se pueda utilizar de manera sucesiva para subsiguientes determinaciones. Por ello si la reacción que origina la señal analítica no es reversible como es el caso que nos ocupa, formación de un complejo Fe(III)-pioverdina, es fundamental que este complejo se rompa, para que el reactivo inmovilizado quede libre otra vez en el terminal sensible, esta etapa denominada regeneración ha permitido la utilización de una extensa gama de reacciones como base de sensores químicos.

La regeneración de la fase reactiva una vez formado el complejo pioverdina-Fe(III) supondrá la obtención de pioverdina libre en la superficie sólida y por tanto la recuperación de la intensidad de fluorescencia inicial. Como regenerantes se han utilizado diversos agentes complejantes del catión férrico (EDTA y 8- hidroxiquinoleína), agentes

reductores de Fe(III) a Fe(II) y medios fuertemente ácidos. El efecto regenerador de todos los agentes complejantes fue lento debido a la mayor constante de formación del complejo pioverdina-Fe(III). Por otra parte no era fácil la reducción de Fe(III) a Fe(II) en medio 4.5 y la reducción a otro pH suponía la intervención de otra etapa lo que redundaría en un aumento del tiempo de respuesta del sensor a la vez que la presencia de otras sustancias. Sin embargo la presencia de un pH muy ácido dado que a pH muy ácido el complejo (Fe(III)-pioverdina no se forma dio lugar a una forma rápida y sencilla de regenerar el sistema. Se eligió HCl 1 M como el mejor camino para la regeneración dado que la señal inicial (pioverdina libre) se obtenía inmediatamente después del contacto de la fase sólida con el regenerante y una vez reestablecido el pH inicial. Para asegurar la regeneración total del reactivo la etapa de regeneración se prolongó durante 1 minuto. La tabla muestra los resultados obtenidos.

3.2.9. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

3.2.9.1. Intervalo de linealidad. El establecimiento del intervalo de trabajo se llevó a cabo bombeando sucesivamente a través de la célula de flujo donde se encuentra empaquetada la pioverdina inmovilizada en CPG, diferentes disoluciones: disoluciones reguladoras (blanco), disoluciones con concentraciones variables de Fe(III) (10 - 200 ng/ml) y disoluciones del regenerante HCl 1M (procedimiento descrito en el apartado??), La respuesta se registró al representar la I_F frente al tiempo.

La figura 76 muestra esta respuesta, en ella se observan las diferentes etapas del análisis: una intensidad de fluorescencia constante y máxima cuando atraviesa la célula de flujo la disolución reguladora, a continuación una disminución progresiva de la I_F al introducir Fe(III) en la célula de flujo y por último una recuperación de la línea base al atravesar la célula de flujo y el reactivo regenerante seguido de la disolución reguladora. La pendiente de la disminución de fluorescencia aumenta según lo hace la cantidad de Fe(III) existente en la disolución.

La gráfica de calibrado (Figura 77) se obtuvo al representar las pendientes de la curva de respuesta (durante un tiempo de 2 minutos) frente a la concentración de Fe(III). Las pendientes obtenidas proceden de multitud de datos puesto que directamente se transferían los datos del registro con el tiempo (tiempo de integración 0.1sg) a un

programa matemático de tratamiento de datos. La respuesta así obtenida es lineal para el intervalo comprendido entre 3 y 200 ng/ml de Fe(III). La recta obtenida responde a la ecuación:

$$Y = -0.198141X - 5.18 \quad \text{con un coeficiente de correlación } 0.993.$$

las desviaciones estándar de la pendiente ($9.41 \cdot 10^{-3}$) y de la ordenada en el origen (1.168)

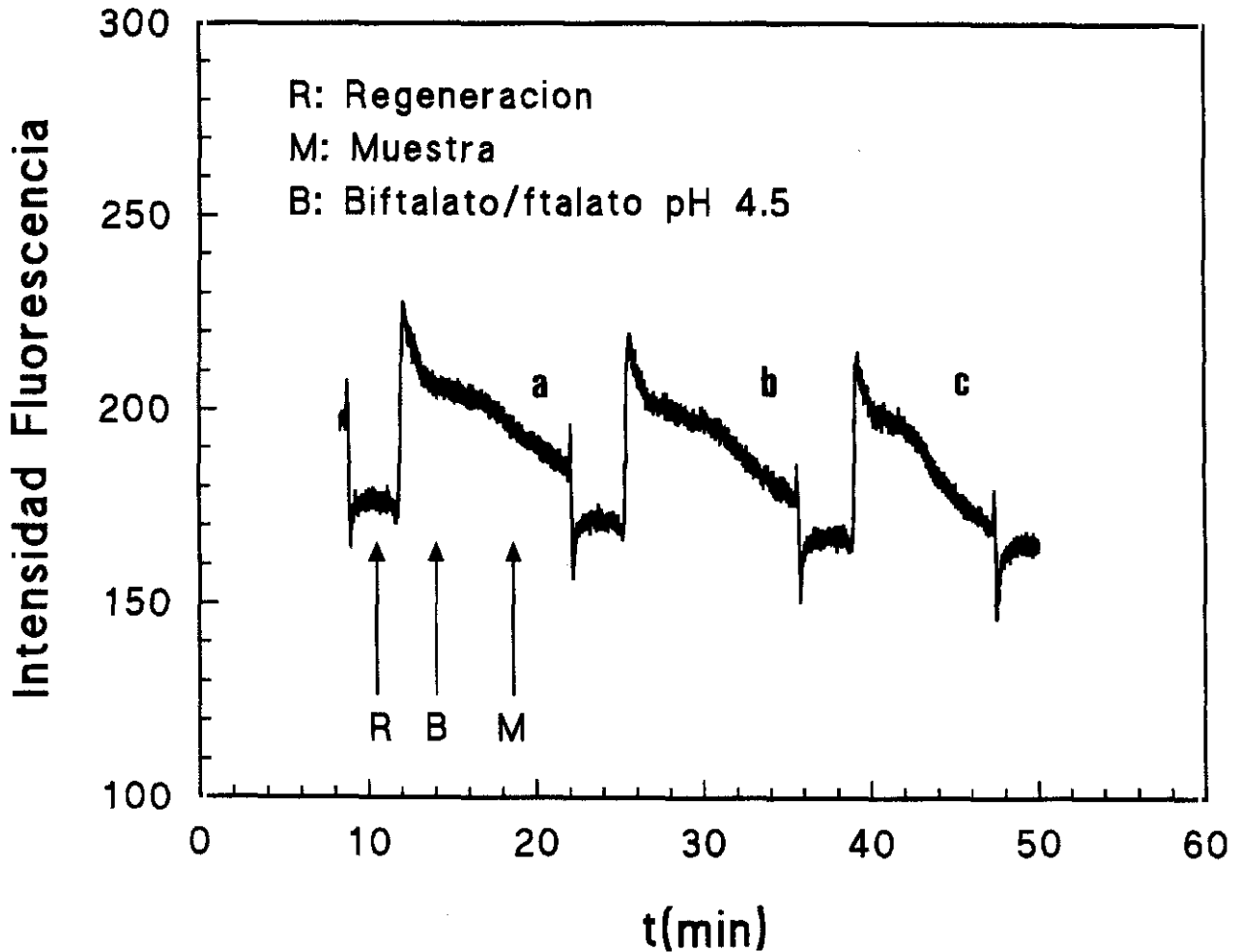


Figura 76. Curva de respuesta (intensidad de fluorescencia frente al tiempo) a diferentes concentraciones de Fe(III) a) 50ng/ml, b) 70 ng/ml, y c) 100 ng/ml.

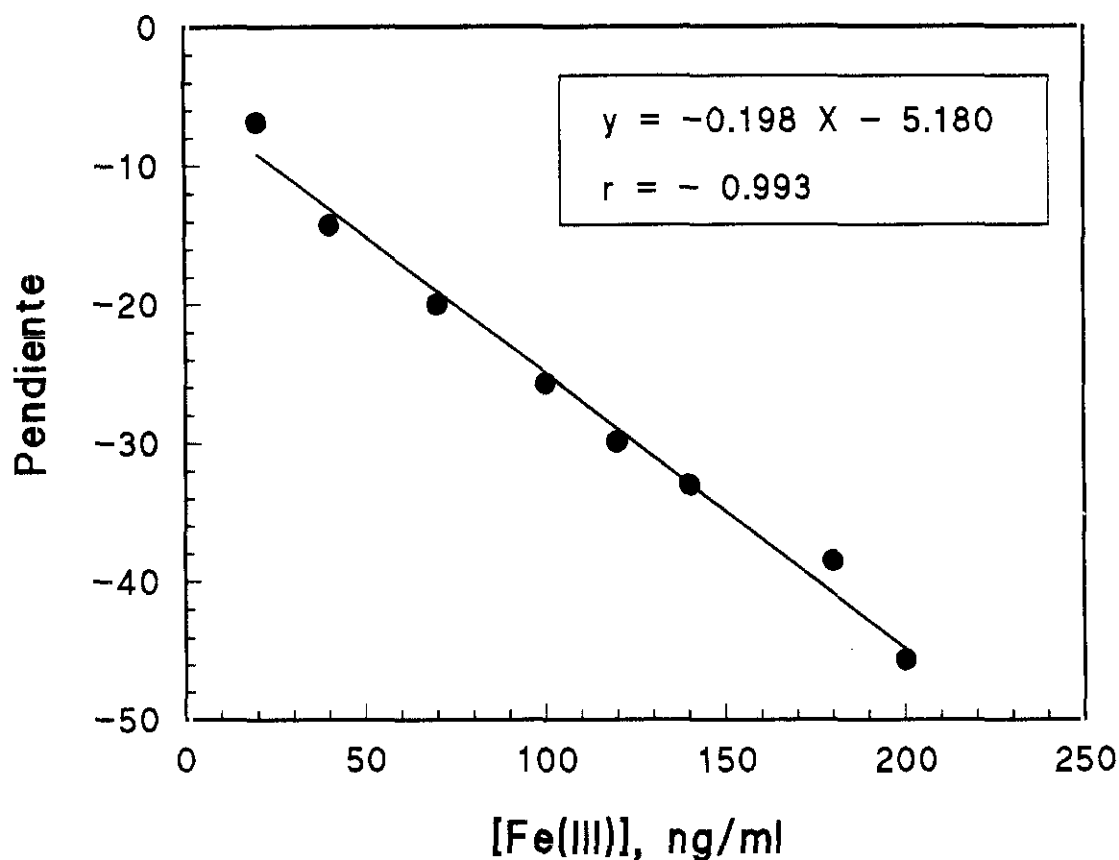


Figura 77. Recta de calibrado para el sistema pioverdina-Fe(III)

3.2.9.2. Límite de detección límite de cuantificación y precisión. La obtención de estos parámetros se ha llevado a cabo bombeando alternativamente a través de la célula de flujo donde se encuentra empaquetada la fase reactiva la disolución reguladora (biftalato/ftalato 0.01M pH 4.5 durante 5 minutos) y la disolución regenerante (HCl 1M durante 1 minuto). Se efectuaron 11 ciclos sucesivos. Los límites de detección y de cuantificación del método se determinaron calculando la desviación estándar de los valores de las pendientes debidas a la disolución reguladora en cada etapa.

La expresión utilizada para la obtención del límite de detección como es habitual fue

$$LD = 3sb/Pdte \text{ de calibrado}$$

El cálculo del límite de cuantificación se efectuó con la expresión

$$LQ = 10 \text{ sb/Pendiente del calibrado}$$

Utilizando ambas expresiones se obtiene un límite de detección de 3ng/ml y 9ng/ml como límite de cuantificación.

El estudio de la precisión se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el apartado. La desviación estándar relativa obtenida para 10 determinaciones de una concentración de 60 ng/ml de Fe(III) es del 3%.

3.2.9.3. Estudio de interferencias. Para evaluar la selectividad del reactivo inmovilizado en CPG se seleccionaron diversos cationes así como conocidos complejantes de Fe(III). Se ha estudiado el efecto de los posibles interferentes en la respuesta de la pioverdina, el estudio se llevó a cabo para 60 ng/ml de Fe(III).

Se consideran interferentes aquellas especies que a una determinada concentración originaban una variación en la intensidad de fluorescencia superior a dos veces la desviación estándar de las medidas de intensidad de fluorescencia de una serie de muestras en ausencia del elemento potencialmente interferente. En nuestro caso se considera interferente aquella especie que produzca una variación de la intensidad de fluorescencia igual o superior a 6% en la respuesta del sensor por la concentración de Fe(III) ensayada.

En la tabla 26 se expresan los resultados obtenidos, considerando una sensibilidad del 100% a la señal obtenida en ausencia de interferentes, se observan porcentajes mayores o menores según la interferencia sea positiva o negativa. En ella se pone de manifiesto que ninguno de los iones probados interfiere seriamente, lo que significa que el sensor desarrollado es altamente selectivo para la determinación de Fe(III) de acuerdo a lo publicado en la bibliografía donde se habla de la alta selectividad (casi especificidad) de los sideróforos para la complejación del catión férrico. De todos los iones ensayados es de reseñar que el fluoruro (agente complejante del hierro) no interfiere en una concentración 100 veces superior a la de hierro presente en un nivel de 60 ng/ml.

Tabla 26. Estudio de interferencias sobre la fluorescencia del complejo CS- Fe(III)

ION	Relación ion/Al(III)(*)	Sensibilidad relativa(**)
Na	500/1	100
Ca	100/1	100
Mg	500/1	98
Cu	50/1	97
Ni	100/1	100
Zn	100/1	97
Pb	100/1	100
Al	50/1	98
Mn	10/1	100
Be	10/1	100
Fe(II)	100/1	102
Cr(III)	100/1	90
Cr(III)	10/1	100
F ⁻	100/1	100
Cl ⁻	1000/1	100
SO ₄ ²⁻⁻	1000/1	100

(*) Relación máxima ensayada.

(**) Relación entre la señal obtenida de una disolución de Fe(III) en presencia y ausencia de interferente.

Todos los ensayos están efectuados para [Fe(III)] 60 ng/ml y pH 4.5

3.3.2. APLICACIÓN ANALÍTICA.

La fase sólida reactiva que utiliza la pioverdina inmovilizada covalentemente en vidrio de poro controlado fué utilizada para la determinación de hierro en agua de grifo y agua mineral. Las muestras fueron analizadas sin ningún tratamiento especial. A 5 ml de las mismas se añadió 1 ml de disolución reguladora y se diluyó todo a 50 ml con agua Milli-Q. La determinación se llevó a cabo por triplicado según se indica en el apartado II.2.3.3.1.

La exactitud del método propuesto se verificó comprobando que no existen diferencias significativas a un nivel de probabilidad del 95% entre los resultados obtenidos y los que proporcionó el método alternativo ICP-AES con lo que se demostró la validez del método desarrollado. Los resultados se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Concentración de Fe(III) en diferentes muestras de aguas analizadas con el sensor de fluorescencia y con la técnica alternativa ICP-AES

MUESTRA	SENSOR EN FLUJO	ICP-AES
Agua grifo 1	0.36 ± 0.03 mg/ml	0.33 ± 0.04 mg/ml
Agua grifo 2	0.26 ± 0.02 mg/ml	0.25 ± 0.03 mg/ml
Agua grifo 3	0.22 ± 0.02 mg/ml	0.24 ± 0.03 mg/ml
Agua mineral	0.08 ± 0.01 mg/ml	-----

3.3. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA Fe(III)-PIOVERDINA INMOVILIZADO EN VIDRIO SOL-GEL EN FLUJO CONTINUO Y SU APLICACION ANALITICA

La preparación de vidrios porosa obtenidas por un proceso sol-gel a temperatura ambiente constituye un método atractivo relativamente nuevo para la inmovilización de todo tipo de moléculas e iones según se describe en la bibliografía.

Se trata de una inmovilización por atrapamiento o retención física de la molécula en las cavidades del vidrio poroso obtenido a temperatura ambiente, no existiendo por lo tanto modificación de la estructura de los reactivos atrapados si bien puede alterarse sus propiedades por las modificaciones existentes en su entorno.

El atrapamiento físico utilizando el método sol-gel es en principio un procedimiento con muchas posibilidades para la construcción de fases sólidas reactivas ya que permite el atrapamiento de la cantidad deseada del reactivo sin que existan pérdidas de éste una vez dispuesto en el interior del vidrio. Por otra parte la elaboración del cristal es extremadamente de fácil ejecución una vez establecidas las condiciones óptimas de pH, temperatura, tiempo de envejecimiento etc, factores que resultan críticos a la hora de producir fases reactivas operativas y reproducibles.

La selección de este soporte para la determinación de Fe(III) con pioverdina nos permitiría la comparación desde el punto de vista analítico de dos fases reactivas obtenidas mediante diferentes mecanismos de inmovilización. Una vez inmovilizado el reactivo pioverdina siguiendo el procedimiento descrito en II.2.2.2.2. se caracterizó el sensor en flujo continuo mediante el dispositivo de la Figura 37 y siguiendo el procedimiento descrito II.2.3.3.1.

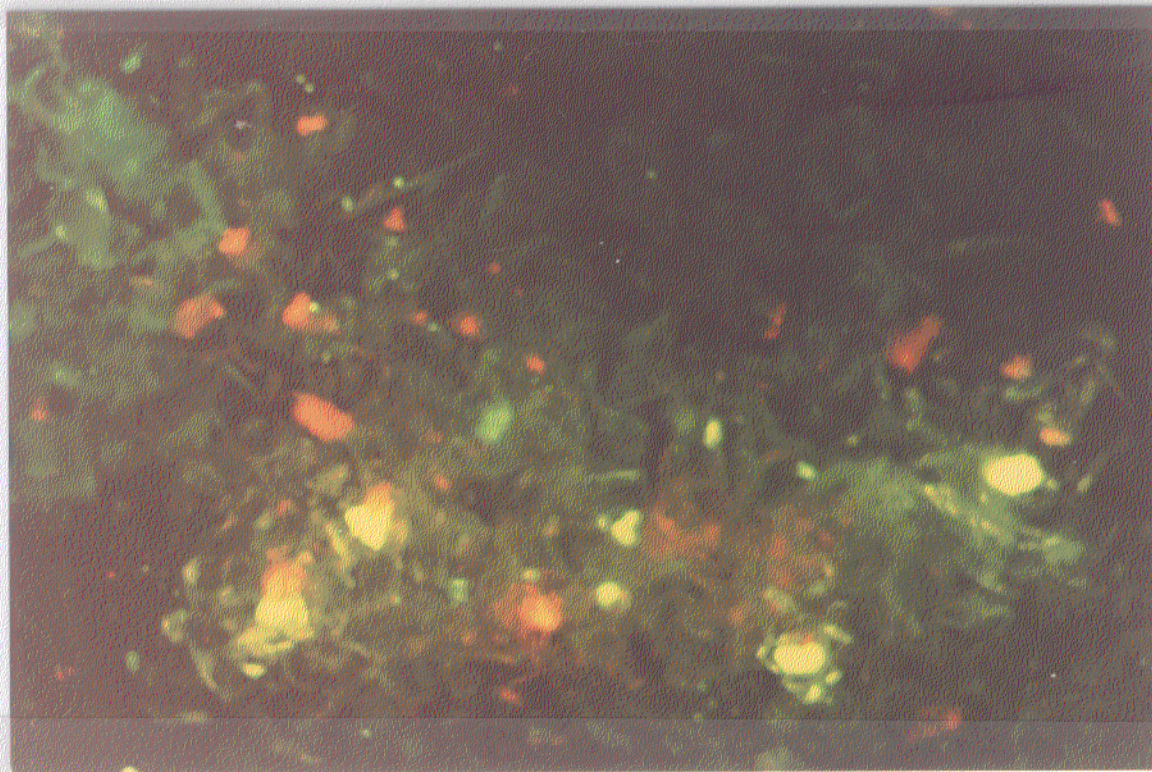
3.3.1. CONCENTRACIÓN DE REACTIVO Y TAMAÑO DE PORO

En la obtención del vidrio sol-gel "dopado" con pioverdina las dos variables (concentración de reactivo y tamaño de poro) son interdependientes y es sumamente difícil controlarlas y manteniendo una de ellas constante variar la otra. En este sentido, este tipo de inmovilización en este sentido es muy dificultosa a diferencia de la inmovilización en vidrio de poro controlado donde el soporte de tipo comercial posee un tamaño de poro constante que no se puede modificar y donde la inmovilización del reactivo se produce en la superficie.

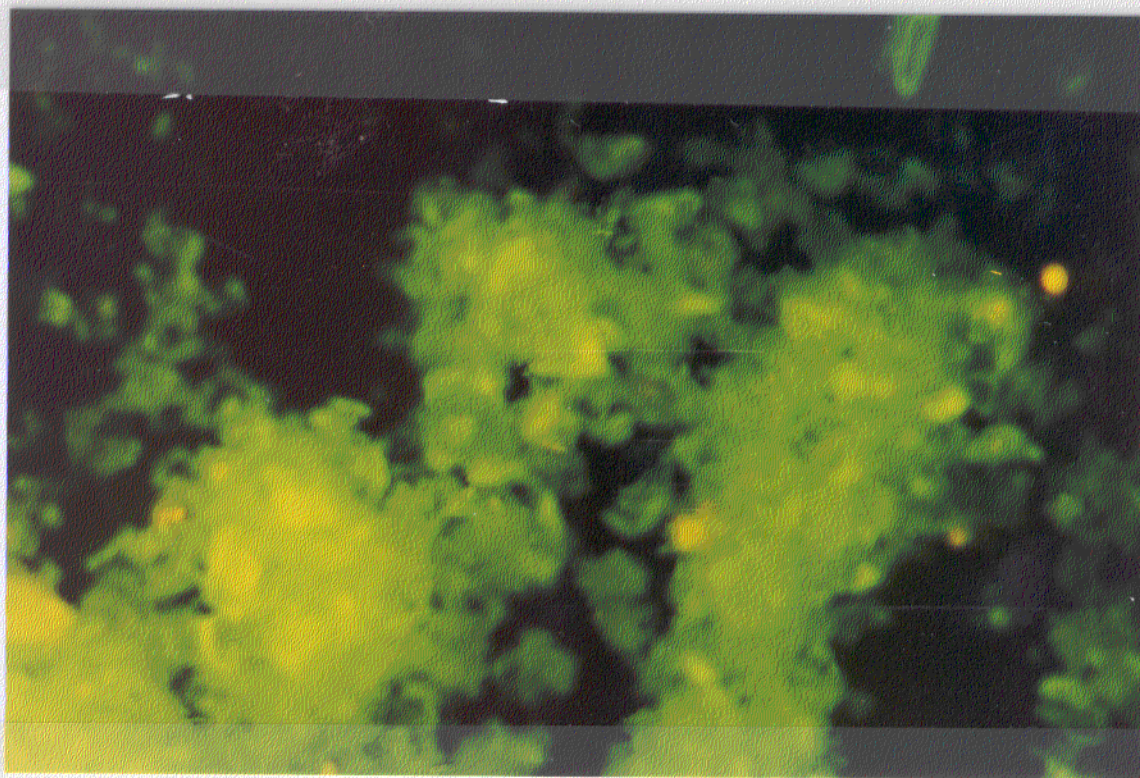
La formación de una fase sólida reactiva por el procedimiento sol-gel da lugar a una matriz de sílice tridimensional que aloja la molécula deseada (pioverdina) en el interior de unos poros que están conectados entre sí. El tamaño de estos poros depende de factores tales como pH de la disolución inicial, la velocidad de hidrólisis y condensación, T^a , concentración de reactivo atrapado, etc.; a su vez de este tamaño de poro depende el tiempo de respuesta de la molécula atrapada frente al analito a determinar.

La inmovilización se llevó a cabo repetidamente cambiando en cada ocasión algunas variables que influyen en el proceso, se seleccionaron aquellas variables que dieron lugar a la formación de una fase reactiva más funcional desde el punto de vista de la señal analítica obtenida y su tiempo de respuesta. El procedimiento operatorio seleccionado se encuentra descrito en el apartado II.2.2.2.2. y la concentración de sideróforo presente en la fase sólida es de 0.124 mmol/g, cantidad aproximadamente 1000 veces superior a la cantidad de reactivo inmovilizado en CPG.

La estructura interna del vidrio se intentó estudiar mediante microscopía electrónica y evaluar la influencia que tenían sobre la misma factores tales como tamaño de poro, concentración de reactivo etc pero no fue posible hacerlo dado que la estructura del vidrio se veía alterada (modificación en los poros y túneles existentes) en el transcurso del análisis debido a la potencia del haz de electrones. Se procedió entonces al estudio por microscopía de fluorescencia que si bien no mostraba la estructura interna del vidrio (de suma importancia para el tiempo de respuesta del sensor) podría aportar información sobre la distribución del reactivo en el soporte. Según se demuestra en las fotografías el soporte sin dopar (fotografía 3) no presenta fluorescencia mientras que el vidrio que contiene pioverdina (fotografía 4) posee una intensa emisión.



Fotografía 3. Fluorescencia del soporte sol-gel en ausencia de pioverdina, observada en el microscopio de fluorescencia



Fotografía 4. Fluorescencia del vidrio sol-gel con pioverdina atrapada en su interior, observada por microscopía de fluorescencia.

3.3.2. CARACTERÍSTICAS ESPECTRALES.

En la Figura 78 se representan los espectros no corregidos de excitación y emisión de fluorescencia del sideróforo una vez atrapado en vidrio sol-gel una vez empaquetada la fase reactiva en la célula de flujo.

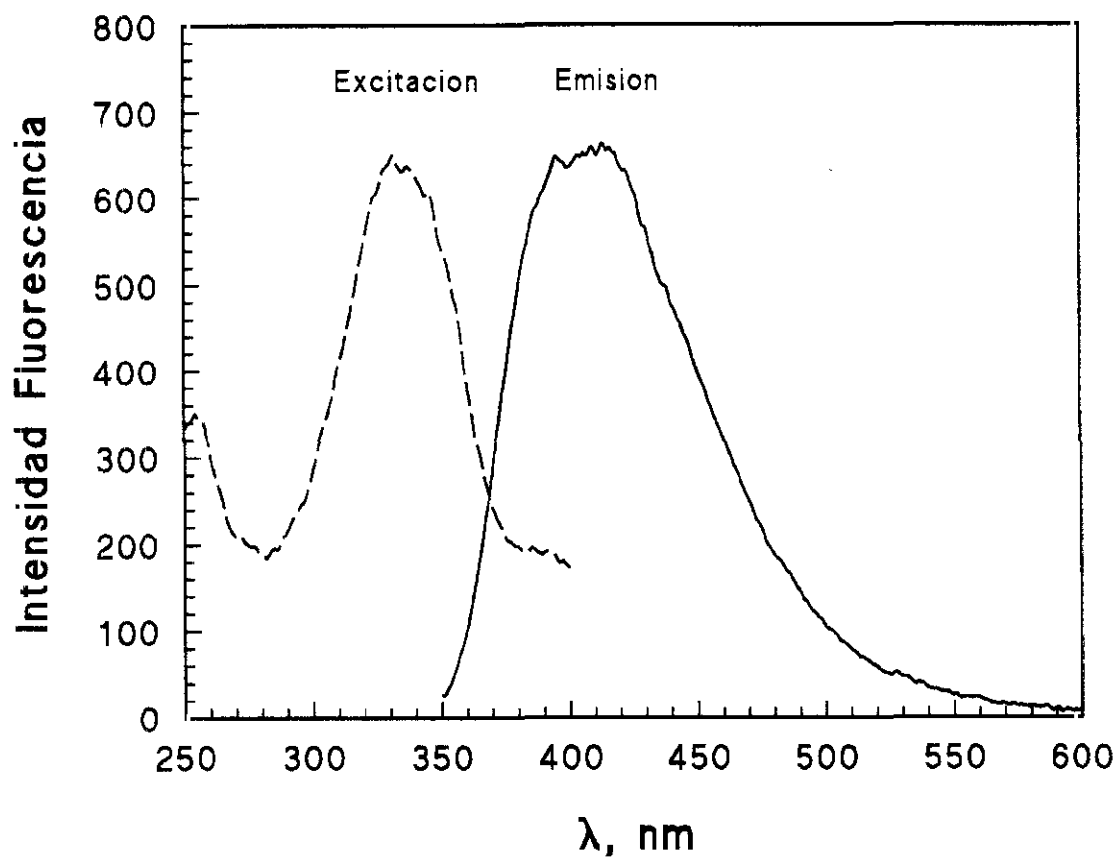


Figura 78: Espectros de excitación y emisión del vidrio sol-gel sin pioverdina y dopado con pioverdina

Comparando los máximos de fluorescencia en disolución acuosa y en el vidrio sol-gel se observa que existe un desplazamiento hipsocrómico del máximo de emisión de 65 nm (de 465 nm a 405 nm) cuando se excita a 330 nm debido a que la molécula se atrapada tiene un entorno diferente al que presenta en disolución acuosa. El vidrio sol-gel sin reactivo atrapado no presentaba fluorescencia. La presencia de Fe(III) en bajas concentraciones produce una drástica disminución de la fluorescencia al igual que ocurría con el soporte CPG.

3.3.3. INFLUENCIA DE pH

Con objeto de determinar el intervalo óptimo para la determinación de Fe(III) se procedió a estudiar el decrecimiento de la fluorescencia de pioverdina soportada en la matriz sol-gel al bombear a su través una disolución de Fe(III) (60 ng/ml durante 2 minutos) a diferentes pH (intervalo 3-9). En la figura 79 se representa el efecto del pH sobre la pendiente de decrecimiento de la fluorescencia de la pioverdina. De ella se deduce que el intervalo óptimo es el comprendido entre 6.2 - 7.2, muy próximo al obtenido en disolución acuosa y ligeramente diferente al obtenido cuando el reactivo es atrapado de forma covalente sobre CPG. Ello puede ser debido a que el entorno del reactivo atrapado físicamente en sílice es más parecido al que tiene en disolución acuosa que en el caso de la inmovilización covalente.

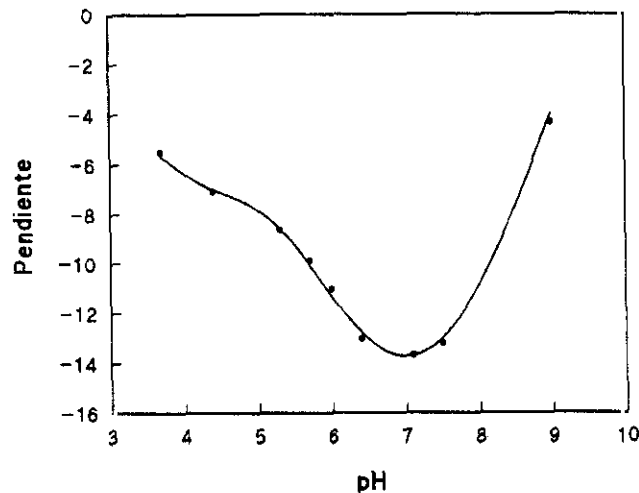


Figura 79. Efecto pH en la disminución de fluorescencia de pioverdina soportada en sol-gel

3.3.4 NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA.

Se ha estudiado el efecto que ejercen diferentes tampones en el intervalo de pH 6.2 - 7.2. En la figura 80 se representan los resultados obtenidos. El comportamiento en este sentido es similar a disolución acuosa y en CPG puesto que de nuevo la máxima señal (diferencia entre fluorescencia del reactivo y la del complejo) se obtiene en ausencia de disolución reguladora, siendo MES la disolución reguladora elegida para posteriores estudios por ser la que menos disminuía la señal analítica.

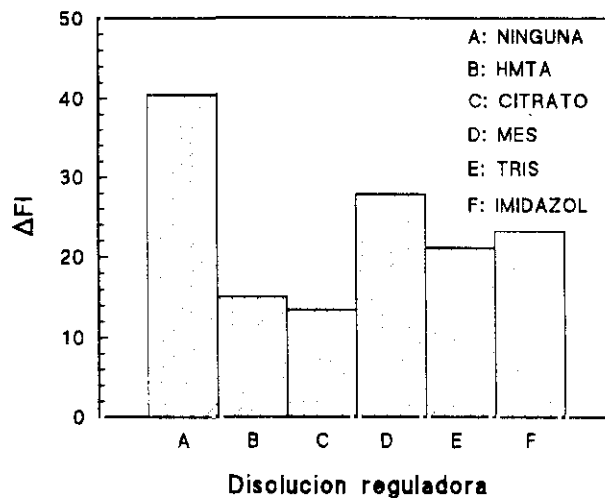


Figura 80. Efecto del medio regulador en la respuesta del sensor

Una vez elegida la disolución reguladora para la obtención de pH 6.5 (MES), se evaluó el efecto de su concentración, para ello se utilizaron disoluciones reguladoras de concentración variable. De la figura 81 se deduce que cuando la concentración de MES aumenta disminuye la sensibilidad para la determinación de Fe(III), por ello se seleccionó 0.05M como concentración óptima. Su elección fue un compromiso entre la sensibilidad y la seguridad de la consecución de un medio tamponado.

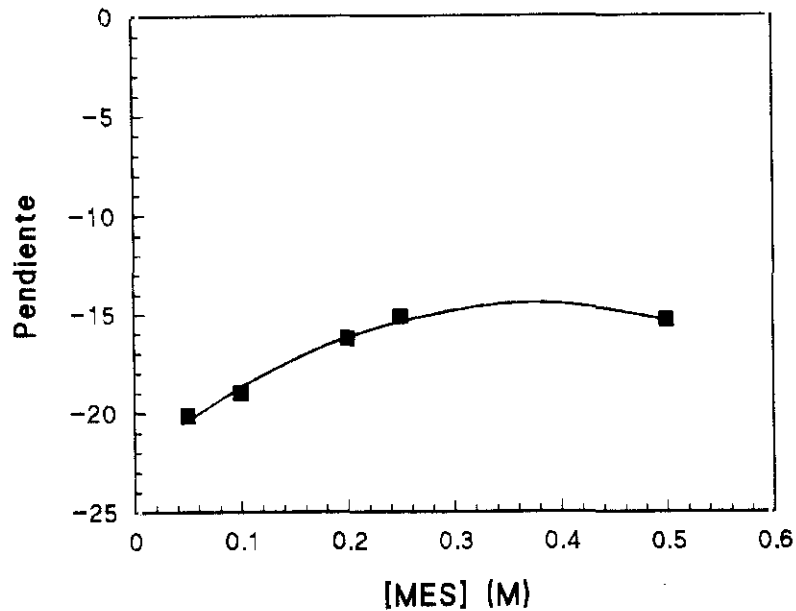


Figura 81 Efecto concentración de la disolución reguladora

3.3.5. EFECTO DE LA FUERZA IONICA.

Dada la influencia de la concentración de la disolución reguladora en la respuesta obtenida frente al Fe(III) era de suponer que la presencia de otros iones en el medio también podrían ejercer algún tipo de efecto. Por ello se procedió a la variación de la fuerza iónica del sistema en estudio mediante la adición de electrolitos fuertes en concentración variables hasta 1M a la disolución de Fe(III).

La presencia de dichos electrolitos (NaClO_4 o KCl) en la disolución no afecta la respuesta del reactivo atrapado en la fase sólida siempre que se encuentren en concentraciones inferiores a 0.5M, si la concentración es superior, se produce una disminución en la respuesta del sensor, como se refleja en la tabla 27

Tabla 27. Efecto de la fuerza iónica sobre la pendiente de decrecimiento de fluorescencia del complejo pioverdina-Fe(III). [Fe(III)]

	KCl	KCl	KCl	NaClO ₄	NaClO ₄	NaClO ₄
	0M	0.1 M	0.5 M	0M	0.1M	0.5M
Pendiente	-31.33	-32.08	-19.93	-29.03	-29.2	-26.46

3.3.6. INFLUENCIA DEL FLUJO DE MUESTRA

Como se ha expresado en el apartado III.3.2.6 el flujo portador es una variable de suma importancia cuando se trata de la utilización de fases sólidas preconcentradoras puesto que con su variación se estudia por una parte la influencia de la cinética de la reacción y por otro lado el máximo volumen de muestra que puede ser preconcentrado, pudiendo aumentarse enormemente la sensibilidad del método siempre que el tiempo de respuesta sea rápido (si es el volumen de muestra el factor determinante) sin más que aumentar el flujo de la disolución que porta la muestra.

El tamaño de partícula y la estructura del soporte pueden limitar el flujo máximo de la muestra debido a problemas de sobrepresión en la célula de flujo que hacen inviable la medida en continuo. El vidrio de poro controlado se expende comercialmente con un tamaño de partícula que no puede ser variado, pero en este caso se podría trabajar con vidrios sol-gel de diferente tamaño de partícula.

El soporte sólido se trituró y se tamizó a través de dos luces de malla, separando entonces dos fracciones, una de tamaño de partícula menor de 0.16 mm y otra de mayor tamaño (< de 0.5 mm). Ambas fracciones se lavaron abundantemente con agua bidestilada convenientemente para asegurar la eliminación del pigmento que haya podido quedar en la superficie (metanol, y agua). En principio se puede pensar que la fracción de menor tamaño de partícula puede ofrecer mayor sensibilidad por poseer una mayor área superficial que favorezca el contacto entre el reactivo sólido y la disolución que contiene el

analito, favoreciendo al mismo tiempo su acceso hacia el interior de los poros donde se encuentr alojada la pioverdina. Sin embargo el empaquetamiento de la fase sólida de menor tamaño de partícula en la célula de flujo produjo enormes problemas de sobrepresión por lo que se utilizó la fracción que tenía mayor tamaño de partícula.

El estudio se ha realizado variando el flujo desde 0 - 2 ml/min. La Figura 82 muestra los resultados obtenidos. Se consideró como valor óptimo para el flujo 1.8 ml/min por obtenerse una mayor respuesta del sensor frente a una misma concentración de hierro

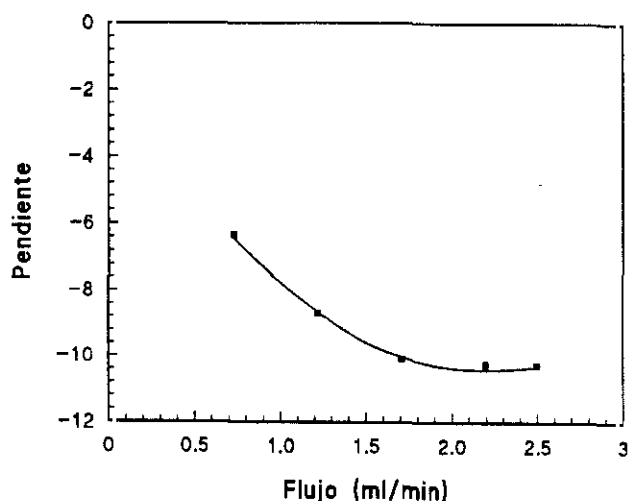


Figura 82 Influencia del flujo de muestra sobre la respuesta del sensor

3.3.7. REGENERACIÓN

El ácido clorhídrico 1M fue el primer reactivo regenerante empleado teniendo en cuenta la eficacia de la regeneración y la facilidad de operatividad que había proporcionado con el empleo del reactivo inmovilizado en CPG. Su utilización fue totalmente satisfactoria dado que siendo la constante de formación del complejo pioverdina-Fe(III) muy alta a pH próximos a la neutralidad, a pH muy ácidos la constante condicional se ve drásticamente disminuida. En principio podría temerse por la integridad del soporte activo en un medio tan drástico pero la realidad es que el pigmento inmovilizado se encuentra totalmente protegido por su entorno de manera que aún con la exposición a HCl 1M sigue siendo

operativo. La concentración de ácido elegida fue 1M para asegurar la rápida ruptura del complejo y la completa regeneración de la fase sólida.

3.3.8. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

3.3 8.1. Intervalo de linealidad. El modo de operar se describe en el apartado 3.3.1.6.1?? siendo el mismo que se utilizó al emplear pioverdina inmovilizada en CPG. A través de la célula de flujo se bombean las diferentes disoluciones: reguladora (blanco), disoluciones con Fe(III) en diferentes concentraciones y seguidamente el regenerante para la recuperación de la línea base. Esta secuencia se repite para cada concentración del catión férrico ensayada. En el registro obtenido (Figura 83 A) se observa que la disminución de la intensidad de fluorescencia es proporcional a la cantidad de Fe(III) presente en la disolución.

La gráfica de calibrado se obtiene al igual que el sensor en flujo descrito en el apartado anterior representando la pendiente de la curva de respuesta del sensor frente al tiempo (correspondiente a la disminución de fluorescencia por la formación del complejo durante 2 minutos) frente a la concentración de Fe(III) (Figura 83 B). El tramo de respuesta lineal corresponde a un intervalo de concentración comprendido entre 10-300ng/ml. La recta obtenida responde a la ecuación:

$$Y = - 0.094 X - 0.656 \quad \text{con un coeficiente de correlación } r = - 0.997$$

La desviaciones estándar de la pendiente y de la ordenada en el origen son:

$$\text{Desviación estándar de la pendiente (Sb)} = 4.84 \cdot 10^{-3}$$

$$\text{Desviación estándar de la ordenada en el origen (Sa)} = 0.834$$

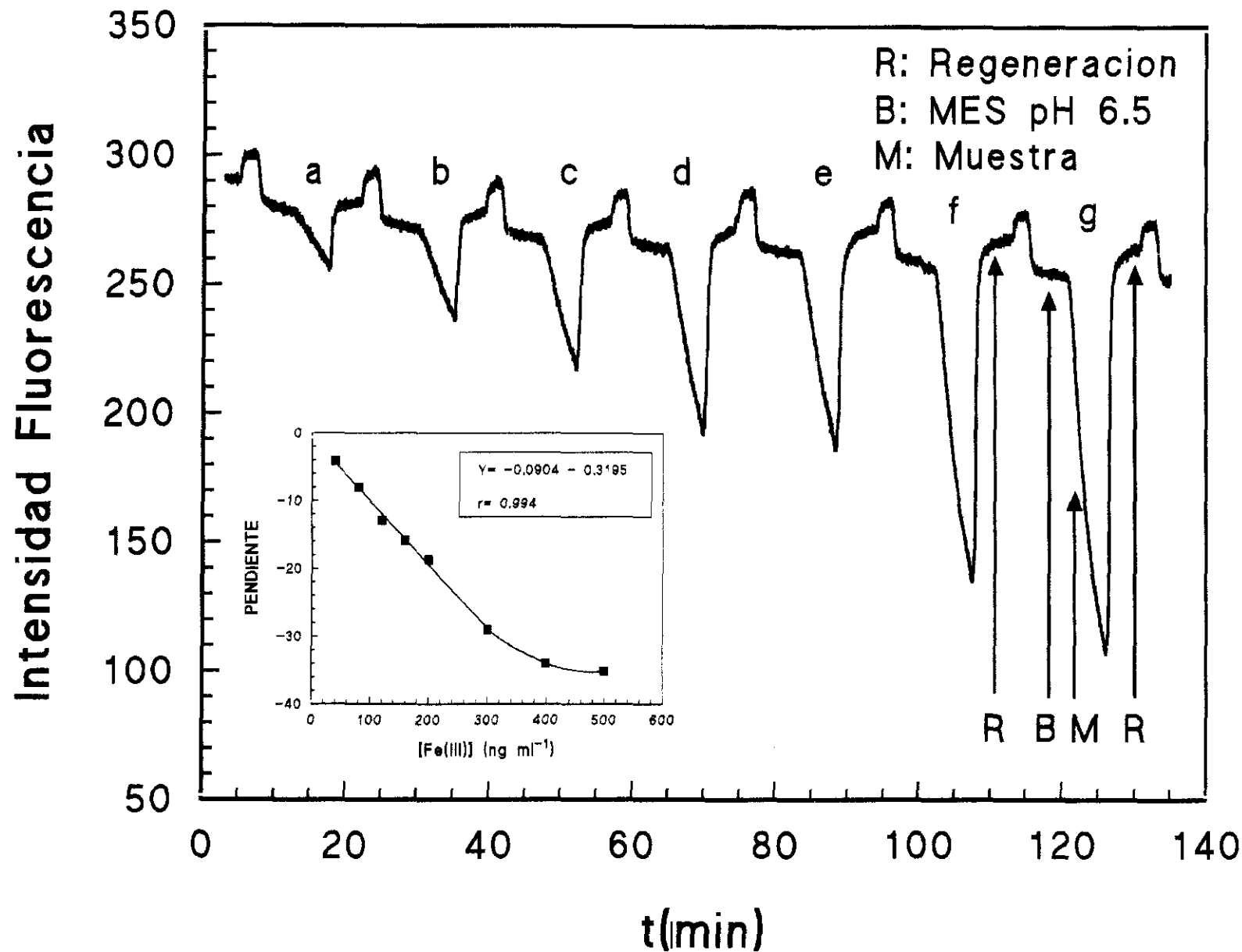


Figura 83. A . Respuesta del sensor frente a distintas concentraciones de hierro en función del tiempo. [Fe(III)] a) 40 ng/ml, b) 80 ng/ml, c) 120 ng/ml, d)160 ng/ml e) 200 ng/ml, f) 300ng/ml g) 400ng/ml. B. Intervalo de linealidad, pendiente curva de respuesta frente a [Fe(III)].

3.3.8.2. Límite de detección, límite de cuantificación y precisión. La sensibilidad del método se evaluó en términos de límite de detección y cuantificación. Se calculó a partir de los valores de las pendientes obtenidas al pasar la disolución reguladora MES 0.01M pH 6.5. Se observó una ligera pendiente de decrecimiento en la señal de fluorescencia en ausencia de analito debido a una ligera deriva de la línea base. Una vez obtenidos 11 valores de la señal del blanco, se procedió al cálculo del límite de detección como 3 veces la desviación estándar del blanco, según la fórmula recomendada por la IUPAC (criterio habitual en esta memoria), obteniéndose un valor para el límite de detección de 3 ng/ml y 30 ng/ml el límite de cuantificación.

El valor de la precisión obtenida expresada como desviación estándar relativa es de 3%. Este valor corresponde a 10 determinaciones de una disolución con un contenido en Fe(III) de 150 ng/ml

3.3.8.3. Estudio de interferencias. Se analizaron como interferentes los mismos iones que habían sido estudiada con el soporte CPG. El estudio se llevó a cabo para una concentración de Fe(III) de 150 ng/ml. Un elemento se consideró interferente cuando produce una variación de la sensibilidad relativa entre 94% y 106% (siendo 100% la señal obtenida en ausencia del elemento interferente) En la Tabla?? se resumen los resultados obtenidos .La selectividad es excelente como ocurría con el empleo del vidrio de poro controlado, si bien con el vidrio sol-gel algunos elementos son incluso tolerados en proporciones mayores. Es de destacar, como mencionamos en el caso del soporte CPG, que el ión Fe(II) no produce interferencia hasta una concentración 100 veces superior a la de Fe(III). De este estudio se deduce la mayor protección o menor accesibilidad del reactivo encapsulado en la matriz de sílice dado la mayor tolerancia de algunos elementos en este soporte comparado con el vidrio de poro controlado.

Tabla 27. Estudio de interferencias sobre la fluorescencia del complejo CS- Fe(III)

ION	Relación ion/Al(III)(*)	Sensibilidad relativa(**)
Na	500:1	104
Ca	100/1	105
Mg	500/1	106
Cu	50/1	97
Ni	100/1	103
Zn	100/1	98
Pb	100/1	100
Al	50/1	99
Mn	10/1	100
Cr(III)	100/1	99
Fe(II)	100	103
F ⁻	100/1	100
Cl ⁻	1000/1	100
CO ₃ ²⁻	50/1	94
SO ₄ ²⁻	1000/1	100

(*) Relación máxima ensayada.

(**) Relación entre la señal obtenida de una disolución de Fe(III) en presencia y ausencia de interferente.

Todos los ensayos están efectuados para [Fe(III)] 150 ng/ml y pH 4.5

3.3.9. APLICACIÓN DEL SENSOR DESARROLLADO A LA DETERMINACIÓN DE Fe(III) EN MUESTRAS DE AGUAS.

La fase reactiva preparada atrapando pioverdina en una matriz de sílice por el procedimiento sol-gel ha sido utilizada para la determinación de Fe(III) en muestras de agua de grifo. El tratamiento de la muestra es mínimo, sólo se procedió a la adición de la disolución reguladora para obtener el pH óptimo y se diluyó convenientemente. La dilución correspondiente. La disolución de muestra así obtenida se bombea en continuo a través de la célula de flujo proporcionando una disminución de fluorescencia cuya pendiente se evalúa en la recta de calibrado obtenida en las mismas.

Los resultados obtenidos se han comparado con los obtenidos por la técnica de espectroscopía por absorción atómica (AA) (Tabla 28) observando que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos por ambos métodos a un nivel de probabilidad del 95%.

Tabla 28. Determinación del contenido en Fe(III)* en muestras de aguas naturales mediante el sensor

Muestra	Sensor fluorescente	AA sin llama
Muestra 1	0.69 ± 0.03 mg/l	0.71 ± 0.02 mg/l
Muestra 2	1.10 ± 0.02 mg/l	1.15 ± 0.03 mg/l

* Media de tres determinaciones ± s expresada en mg/l.

3.4. COMPARACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SENSOR CARACTERIZADO EN FLUJO CONTINUO PARA LA DETERMINACIÓN DE Fe(III) UTILIZANDO COMO SOPORTE SÓLIDO CPG Y VIDRIO SOL-GEL.

Una vez caracterizados y aplicados a la determinación de Fe(III) en aguas ambos sensores es interesante comparar las condiciones óptimas de trabajo de cada uno de ellos así como las características analíticas de ambos métodos. En las tablas ?? y ?? se recogen los resultados tanto de la pioverdina en disolución acuosa como inmovilizada en ambos soportes.

Tabla 29: Comparación de parámetros óptimos para la determinación de Fe(III) utilizando pioverdina en disolución acuosa, inmovilizada en CPG y atrapada en un vidrio sol-gel.

Parámetro	Disolución acuosa	CPG	Vidrio sol-gel
Máximo excitación	390 nm	500 nm	330 nm
Máximo emisión	465 nm	550 nm	405 nm
pH	6.8	4.5	6.5
Disolución reguladora	MES	Biftalato/Ftalato	MES
Regeneración	HCl 1M	HCl 1M	HCl 1M
Flujo (ml/min)		5	1.8

Tabla 30. Características analíticas de los métodos de determinación de Fe(III) utilizando pioverdina en disolución acuosa e inmovilizada en CPG y sol-gel.:

Parámetro	Disolución acuosa	CPG	Sol-gel
Intervalo lineal (ng/ml)	10 - 180	3 - 200	3-300
Límite detección (ng/ml)	10	3	3
Desviación estándar relativa	4% (n=9, 50 ng/ml)	3% (n=10, 60 ng/ml)	3% (n=10, 150 ng/ml)

A la vista de los resultados puede concluirse que la sensibilidad de los métodos que utilizan el reactivo inmovilizado es superior al método en disolución debido a que como se ha dicho repetidamente en esta Tesis, la utilización de fases sólidas producen la retención/preconcentración del analito. Las condiciones óptimas de trabajo como se expone en la Tabla 29 son similares para la determinación de Fe(III) utilizando pioverdina en disolución acuosa o atrapada en una matriz de sílice por el procedimiento sol-gel. Los parámetros óptimos para la utilización del sensor que utiliza el reactivo inmovilizado en CPG difieren notoriamente de los métodos anteriores. Este hecho tiene su explicación debido a que la utilización de este soporte supone el atrapamiento físico del reactivo con lo que tan solo el entorno del mismo varía no su estructura como sucede en el caso de enlace covalente (CPG). Ambas fases sólidas han sido aplicadas satisfactoriamente al análisis de hierro en diferentes clases de aguas.

4. CARACTERIZACIÓN EN FIA DEL SISTEMA Fe(III)-PIOVERDINA INMOVILIZADO EN VIDRIO SOL-GEL Y SU APLICACIÓN ANALÍTICA.

En los dos apartados anteriores se han desarrollado con éxito sendos sensores para monitorizar hierro(III) con alta selectividad y sensibilidad, pero es necesario disponer de al menos 10 ml o de 3 ml respectivamente para hacer una única determinación

En muestras en las que sea importante el análisis de este ión como en suero humano, se presenta un problema ya que el volumen disponible de muestra suele estar restringido, se necesita por lo tanto controlar el volumen de muestra. Una manera sencilla de controlar dicho volumen es introduciendo en el sistema de flujo continuo una válvula de inyección que proporcione un volumen exacto de muestra (del orden de microlitros) para entrar en contacto la fase reactiva. Dado que la sensibilidad del método depende de la cantidad absoluta de ng de hierro retenido en la fase sólida, para desarrollar el sistema FIA se eligió como soporte sólido el vidrio-sol gel dopado con pioverdina puesto que según se observa en la tabla se obtiene la misma sensibilidad que con CPG con menor volumen de muestra.

Dado que sobre la fase reactiva se produce una continua retención del analito de forma irreversible, la señal obtenida "fiagrama" no responde al perfil típico de una señal transitoria, sino que es una señal acumulativa por lo que se necesita una etapa de regeneración de la fase sólida para proceder a una nueva inyección de muestra. La respuesta analítica en este caso se cuantificó con la altura del "pico FIA" debido a que se alcanza una señal constante una vez retenido todo el "bolo" de muestra.

Se procedió de nuevo a caracterizar el sistema Fe(III)-pioverdina soportado en vidrio sol-gel utilizando el dispositivo del apartado II.2.1.2. (figura 39) y el procedimiento descrito en el apartado II.2.3.3.2.

La única diferencia respecto al método anterior (desarrollado en el apartado III.3.3.) es el volumen de muestra introducido y la forma del registro obtenido. Por ello, es de suponer que las variables tanto físicas como químicas afectarán en el mismo sentido que anteriormente, no obstante se procedió al ajuste de dichas variables de una manera más estricta para obtener la máxima sensibilidad.

4.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES.

La tabla 31 muestra los resultados obtenidos de las condiciones óptimas comparando los resultados con los obtenidos en flujo continuo. Se observa que solo el valor óptimo del flujo es ligeramente menor.

Tabla31. condiciones óptimas par la determinación de Fe(III) utilizando pioverdina inmovilizada en sol-gel en flujo continuo y en uns sistema de inyección en flujo.

Parámetro	Continuo	FIA
Máximo excitación (nm)	330	330
Máximo emisión (nm)	405	405
pH	6.5	6.5
Disolución reguladora	MES 0.05M	MES 0.05M
Regenerador	HCl 1M	HCl 1M
Flujo (ml/min)	1.8	1.2

El *volumen de muestra* afecta a la respuesta en el sentido esperado, la disminución observada en la intensidad de fluorescencia inicial es mayor cuanto mayor es el volumen de muestra inyectado (ya que la cantidad de analito neta sobre la fase sólida es mayor). En la Figura 84 se representa esta variación que como vemos responde a una recta ya que en realidad se trataría de un "pequeño calibrado" puesto que sobre la fase sólida queda retenida mayor cantidad de Fe(III) cuanto mayor es el volumen de muestra inyectado. La concentración de Fe(III) inyectada fue de $0.6 \mu\text{g/ml}$. El volumen del bucle de muestra puede variarse según la cantidad de muestra disponible. Se han utilizado volúmenes de muestra entre $250 \mu\text{l}$ - $1000 \mu\text{l}$. Se ha considerado $1000 \mu\text{l}$ como un buen compromiso entre la cantidad de muestra y la sensibilidad obtenida.

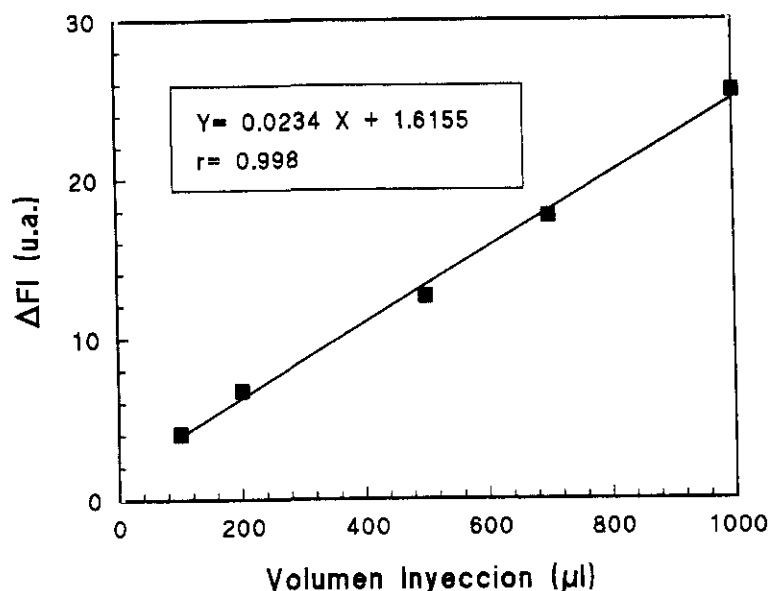


Figura 84. Efecto del volumen de muestra en la respuesta del sistema pioverdina-Fe(III).

4.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

Intervalo de linealidad. El registro obtenido al inyectar disoluciones con contenido en Fe(III) creciente se representa en la Figura 85 A. En la misma está indicada la intensidad de fluorescencia correspondiente al blanco, la correspondiente a las diferentes concentraciones de hierro y la recuperación de la línea base tras la etapa de regeneración. La recta de calibrado se ha obtenido al representar la diferencia entre la intensidad de fluorescencia en ausencia de analito y la obtenida cuando se inyecta la muestra, frente a la concentración de Fe(III). El intervalo de linealidad (Figura 85 B) obtenido es 20 - 900 ng/ml con un coeficiente de correlación de 0.997 cuando se inyecta 1 ml de muestra. La respuesta lineal responde a la ecuación

$$Y = 46.31 X + 2.63 \text{ con un coeficiente de correlación de } 0.997$$

Desviación estándar de la pendiente es 1.90

Desviación estándar de la ordenada en el origen es 1.09

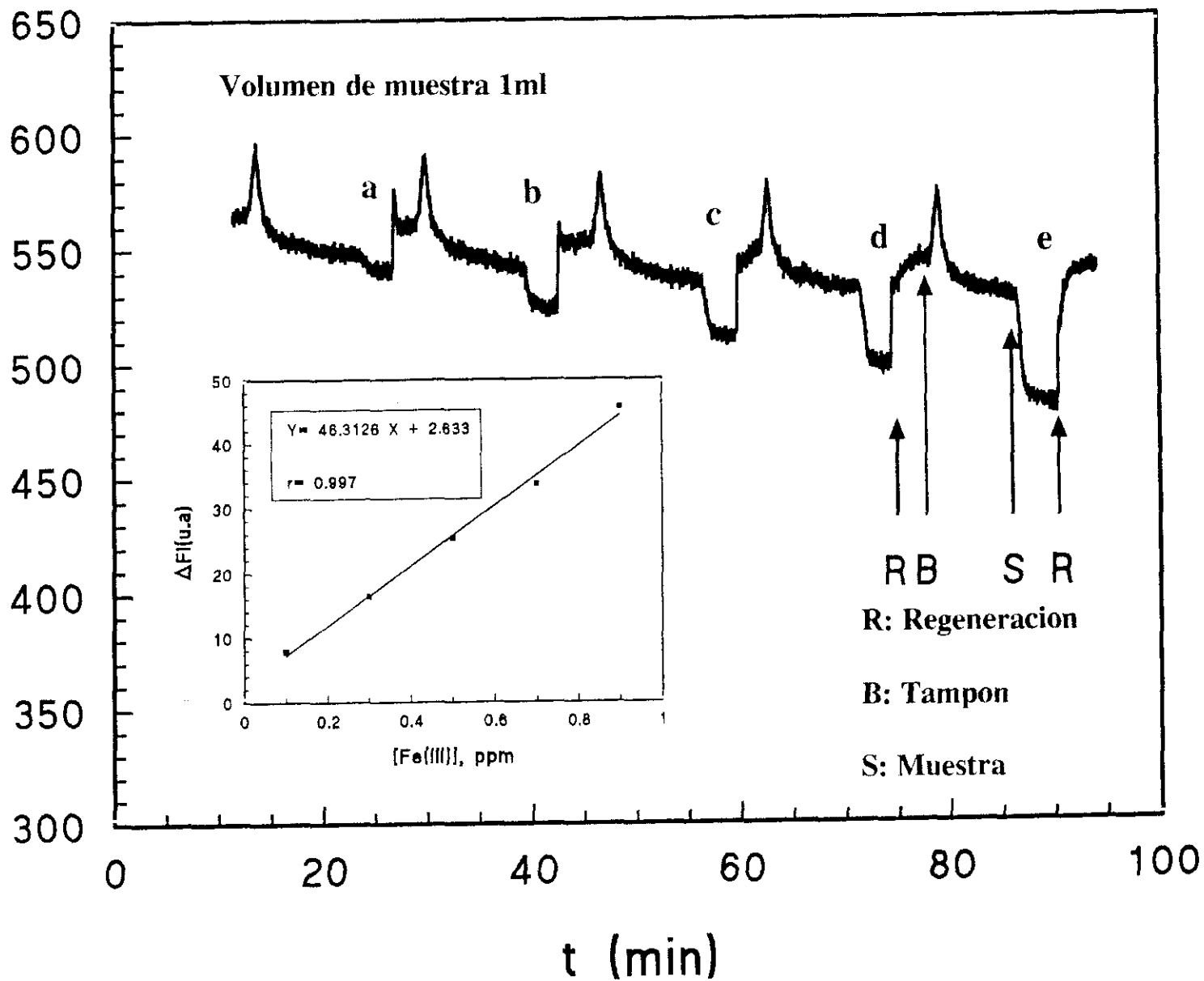


Figura 85 A . Respuesta del sensor frente a distintas concentraciones de hierro en función del tiempo. [Fe(III)] a) 100 ng/ml, b) 300 ng/ml, c) 500 ng/ml, d) 700 ng/ml e) 900. **B.** Intervalo de linealidad, $\Delta F I$ frente a [Fe(III)].

Límite de detección y cuantificación y precisión. El límite de detección se ha obtenido como 3 veces la desviación estándar del blanco (valor obtenido inyectando 1 ml de disolución reguladora MES 6.5 10 veces consecutivas tras la etapa de regeneración y una vez recuperado el pH óptimo). El límite de detección obtenido con un volumen de inyección de 1 ml es de 20 ng/ml. Si el volumen de inyección es de 250 μ l el límite de detección es algo superior, 70 ng/ml. Los límites de cuantificación han sido 60 y 210 ng/ml respectivamente.(Tabla 32)

La precisión expresada en términos de coeficiente de variación para 10 determinaciones de 500 ng/ml (1 ml de muestra) es de 4.5%. Si el volumen de muestra es de 250 μ l se obtiene una desviación estándar relativa de 6%.

Tabla 32. Características analíticas del método en FIA utilizando diferentes volúmenes de muestra.

Parámetro	Inyección 250 μ l	Inyección 1000 μ l
Intervalo linealidad (ng/ml)	-----	20 - 900
Límite de detección (ng/ml)	70	20
Precisión	6% (n= 10, 500ng/ml)	4.5 % (n=10 500 ng/ml)

El estudio de *interferencias* se llevó a cabo inyectando 1ml del analito en presencia del posible ión interferente evaluándose su efecto con el mismo criterio utilizado en toda la memoria. Como era de esperar afecta en el mismo sentido que en el sistema caracterizado en continuo (tabla 27) excepto para Cl y Na que se observa una menor interferencia , en este caso y considerando interferencia el criterio seguido en todos los casos antirores se considera interferente aquel ión que no entre en el intervalo 91-109 habiendo hecho corresponder el 100 a la inyección de 1ml de una disolución de Fe(III) 500ng/ml continuo en MES pH6.5 la relación en que interfiere 1000/1 para ambos iones

4.3. APLICACIÓN A MUESTRAS DE SUERO HUMANO.

El método puesto a punto se ha aplicado a la determinación de hierro en muestras de suero control Cromatrol T, que se utilizan como control en química clínica. Este es un suero valorado de origen humano carente de conservadores, liofilizado y estable. Contiene 23 componentes valorados. La valoración del suero ha sido realizada por los participantes en el programa nacional de control de calidad de la Sociedad Española de Química Clínica. En los valores estipulados sólo se han recogido las técnicas para las que se han obtenido un mínimo de 60 valores en total. Este producto está particularmente indicado para el control de exactitud, valoración de técnicas, estudio de interferencias, etc. Puede también ser utilizado como patrón de calibración en analizadores automáticos tanto centrífugos como discretos.

La muestra liofilizada en primer lugar se reconstituye según se indica en el vial (adición de 5 ml de agua destilada). A continuación se trata el suero con ácido acético con el fin de romper el complejo Fe(III) proteína y se centrifuga (2000 rpm) en unidades de filtración Millipore hasta recoger todo el volumen en la parte inferior del filtro (la disolución aparece ahora incolora). Estas unidades contienen un filtro que poseen tamaño de poro 5000 dalton, es decir en la parte superior se queda las proteínas de tamaño mayor de 5000 mientras que las moléculas de menor tamaño molecular pasan a la parte inferior donde se recoge todo el hierro presente en la muestra.

En primer lugar se efectuó un calibrado según se ha expuesto en el procedimiento, a continuación se aplicó el método de adiciones estándar y se representaron ambos observándose un efecto matriz bastante acusado como se observa en la figura 86. Los resultados obtenidos han sido validados por el método ferrozine (24).

Los resultados obtenidos por la recta de adiciones estándar así como los resultados estipulados aparecen en la tabla 33 de donde se infiere la aplicación con éxito de este sensor a la determinación de hierro en suero humano. El método propuesto supone la determinación directa de Fe(III) evitando de esta manera la etapa de reducción que es necesaria en la mayoría de los métodos espectrofotométricos utilizados en química clínica. También puede observarse que los valores estipulados por el método de referencia suponen

un amplio margen, si bien es cierto que la determinación exacta de Fe(III) en este campo quizás no sea necesaria los métodos actuales adolecen de una precisión adecuada sin existir actualmente un método utilizado y recomendado como referencia (24). El método desarrollado en este trabajo mejora notablemente la precisión de los métodos existentes, proporcionando valores acorde a los estipulados.

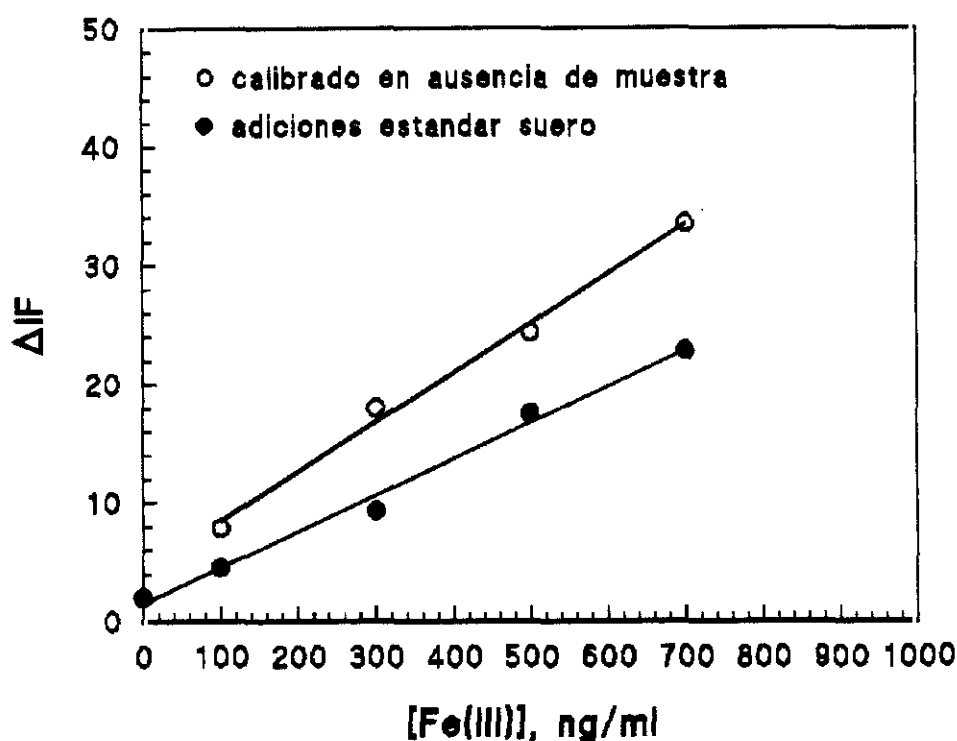


Figura 86 . Calibrado de hierro y adiciones estándar para muestra de suero.

Tabla 33. Determinación de Fe(III)* en suero de origen humano Cromatest con el sensor de fluorescencia utilizado en modalidad FIA y el método espectrofotométrico FerroZine

Muestra	Sensor fluorescencia	Ferrozine
Suero 1	2.46 ± 0.05	2.23 ± 0.24
Suero 2	1.63 ± 0.07	1.54 ± 0.26

* Media de tres determinaciones ± s expresada en $\mu\text{g/ml}$

5. EL REACTIVO PIOVERDINA COMO INDICADOR FLUORESCENTE.

En el diseño y construcción de sensores de fibra óptica, los que responden al pH, han sido los primeros en desarrollarse, su caracterización ha contribuido de forma importante a la gran expansión de sensores químicos y ha servido de gran ayuda para el esclarecimiento de otros muchos sensores desarrollados, dado que las reacciones ácido-base al igual que en disolución son las más sencillas. Los primeros sensores desarrollados de pH respondían al pH en el intervalo de pH fisiológico puesto que es en este intervalo donde tiene aplicación los sensores de fibra óptica de pH por su posibilidad de medida "in vivo". En el mismo sentido se ha incrementado la utilización de estos sensores en sistemas en flujo como en la determinación de pH en agua de lluvia.

Los primeros sensores de pH se basaban en la variación de reflectancia del indicador ácido-base inmovilizado en el soporte sólido. La utilización de sensores basados en fluorescencia procede de su mayor sensibilidad si se compara con reflectancia, lo que es de gran importancia cuando se utiliza pequeñas fibras como en el caso de medidas in vivo.

El reactivo pioverdina puede comportarse como un indicador ácido-base fluorescente y por ello se se consideró de interés profundizar en el comportamiento ácido-base de este reactivo tanto en disolución como inmovilizado en vidrio de poro controlado y sol-gel en ambos soportes, en primer lugar conocer los pK del reactivo y si ellos resultaban de interesantes para alguna aplicación establecer su potencial analítico como sensor de pH.

5-1. CÁLCULO DE pKa DE PIOVERDINA.

Si bien en bibliografía existe un estudio del comportamiento en **disolución acuosa** de la pioverdina procedente de *pseudomonas fluorescens* (254), no se establece sin embargo el valor del pK, por ello decidimos estudiar el comportamiento de este reactivo en disolución acuosa. En este estudio se han hecho espectros tanto de **absorbancia** como de

fluorescencia en el intervalo de pH 3 - 10 (Figuras 87 y 88). Los espectros de absorbancia (250 - 500 nm) corresponden a disoluciones $1.3 \cdot 10^{-4}M$ de pioverdina.

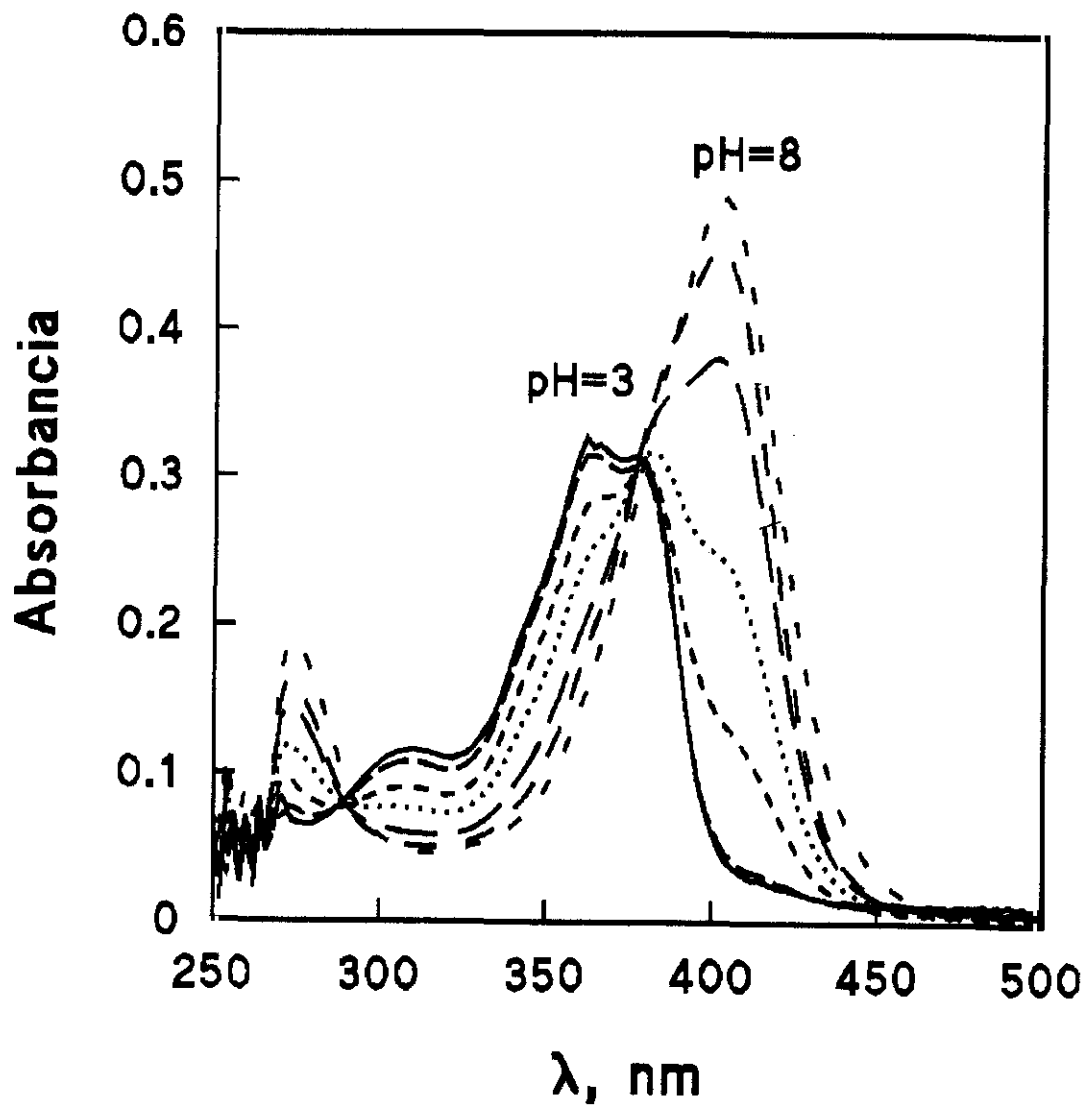


Figura 87. Espectro de absorción de una disolución de pioverdina $1.3 \cdot 10^{-4}M$, en el intervalo de pH 3 - 8

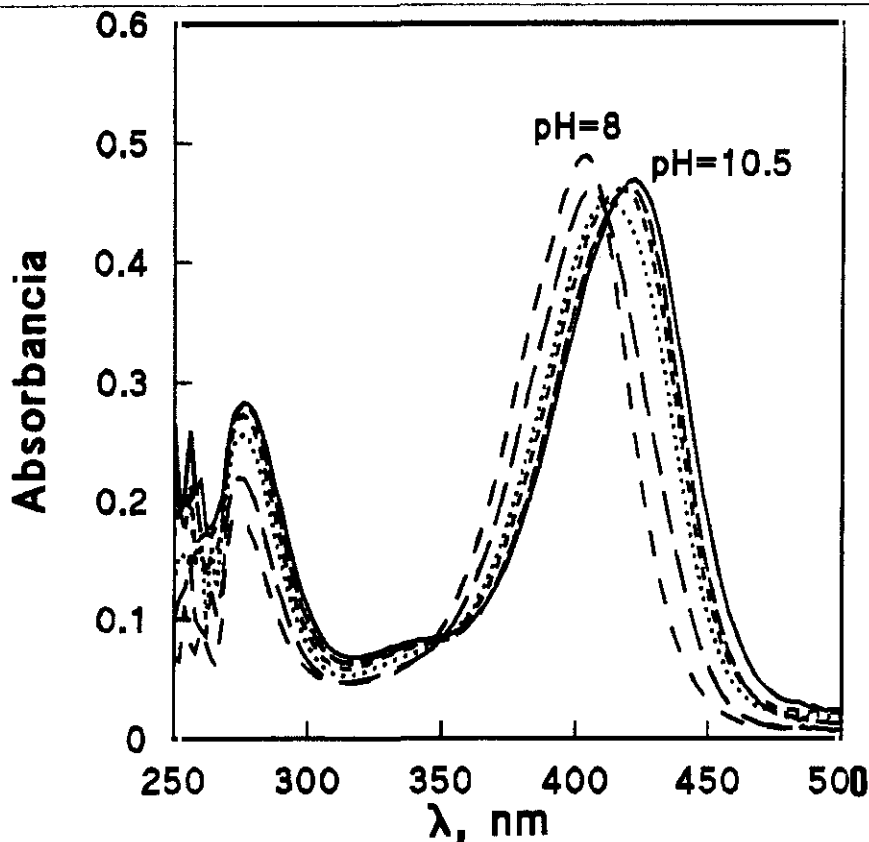


Figura 88. Espectro de absorción de una disolución de pioverdina $1.3 \cdot 10^{-4}M$, en el intervalo de pH 8 - 11

En estas figuras se observa la variación del espectro de absorbancia y por tanto el distinto comportamiento en tres zonas diferentes de pH. La zona del espectro a valores inferiores de 275 nm presenta mucho ruido debido a que el detector presenta baja sensibilidad para dicha zona. En esta figuras se puede observar los siguientes hechos:

- A pH < 4 el espectro de absorbancia presenta un máximo a 365 nm y un hombro a 380 nm.

- A pH comprendidos entre 4 y 7 desaparece el máximo a 360 nm y aparece una nuevo máximo a 400 nm. Igualmente aparece pun nuevo máximo a 275 nm.

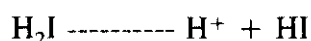
- A pH > 7 el máximo a 400 nm sufre un desplazamiento batocrómico (λ 415 nm) mientras que el máximo a 275 nm se incrementa (efecto hiperocrómico).

- En el intervalo de pH 3 - 7.5 aparecen claramente dos puntos isobésticos (280 y 375 nm).

- En la zona de pH comprendido entre 8 y 10.5 aparece un punto isobéstico a 350 nm.

La pioverdina en disolución acuosa a pH ácido es incolora y a pH alcalino la disolución toma un color amarillo fuerte.

Estas observaciones parecen indicar la existencia de una única especie a pH inferiores a 4 (que la llamaremos H_2I dado que no conocemos exactamente la estructura de la pioverdina y sus cargas); entre pH 4 y 7.5 se produce el siguiente equilibrio



En el intervalo 7.5 - 8.5 existe la especie HI. A partir de 8.5 la especie predominante es la especie indicador libre.

Todo lo expuesto se ha comprobado con la representación de los valores de absorbancia a una longitud fija (406 nm) frente a pH (Figura 89). Se eligió esta longitud de onda por ser la que mayor variación de absorbancia presentaba.

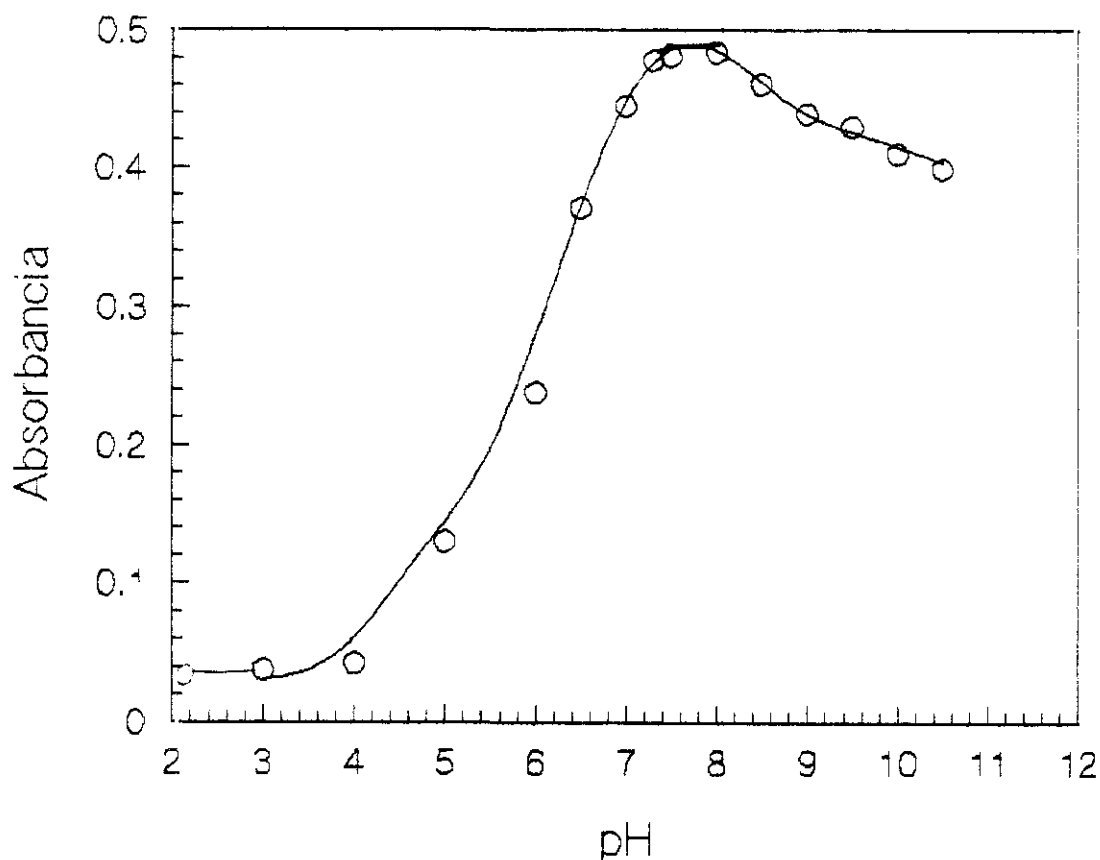


Figura 89. Absorbancia a 406 nm de una disolución de pioverdina $1.3 \cdot 10^{-4}M$ en función del pH.

Teniendo en cuenta la gráfica se ha calculado el pK según la fórmula

$$pK = pH + \log (A_1 - A_{\text{máx}} / A_{\text{mín}} - A_1)$$

donde A_1 es la absorbancia a un determinado pH, $A_{\text{máx}}$ la absorbancia máxima y $A_{\text{mín}}$ el valor mínimo de absorbancia. Aplicando dicha fórmula se obtiene un valor de pK_a de **6.05. ± 0.05**. El segundo pKa propuesto no se ha podido evaluar debido a que la variación de absorbancia es mínimo y no se llegó a una estabilidad en la misma.

Una vez caracterizado el pigmento en cuanto a absorción, se procedió a estudiar el espectro de **fluorescencia** de una disolución acuosa de pioverdina $1.3 \cdot 10^{-5}M$ en función del pH en el intervalo 1 - 10. Las longitudes de onda de excitación y emisión del pigmento en disolución acuosa son 390 y 465 nm respectivamente (Figura 65).

En la Figura 90 se observan los espectros obtenidos desde 400 a 600 nm excitando a 390 nm con rendijas de excitación y emisión de 5 nm. Se observa que a pH ácido 2 existe un máximo a 530 nm muy débil y que conforme el pH va haciéndose más básico (2.5 a 9) el máximo se va desplazando hacia longitudes de onda menores (460 nm). Por otra parte la intensidad de fluorescencia en el máximo de emisión aumenta al aumentar el pH (2 - 9).

A pH más básicos (8.5 - 12) el máximo de emisión sufre desplazamiento batocromico (500 nm) a la vez que la banda se van ensanchando.

La representación de la variación de intensidad de fluorescencia frente al pH a 465 nm se representan en la siguiente Figura 91.

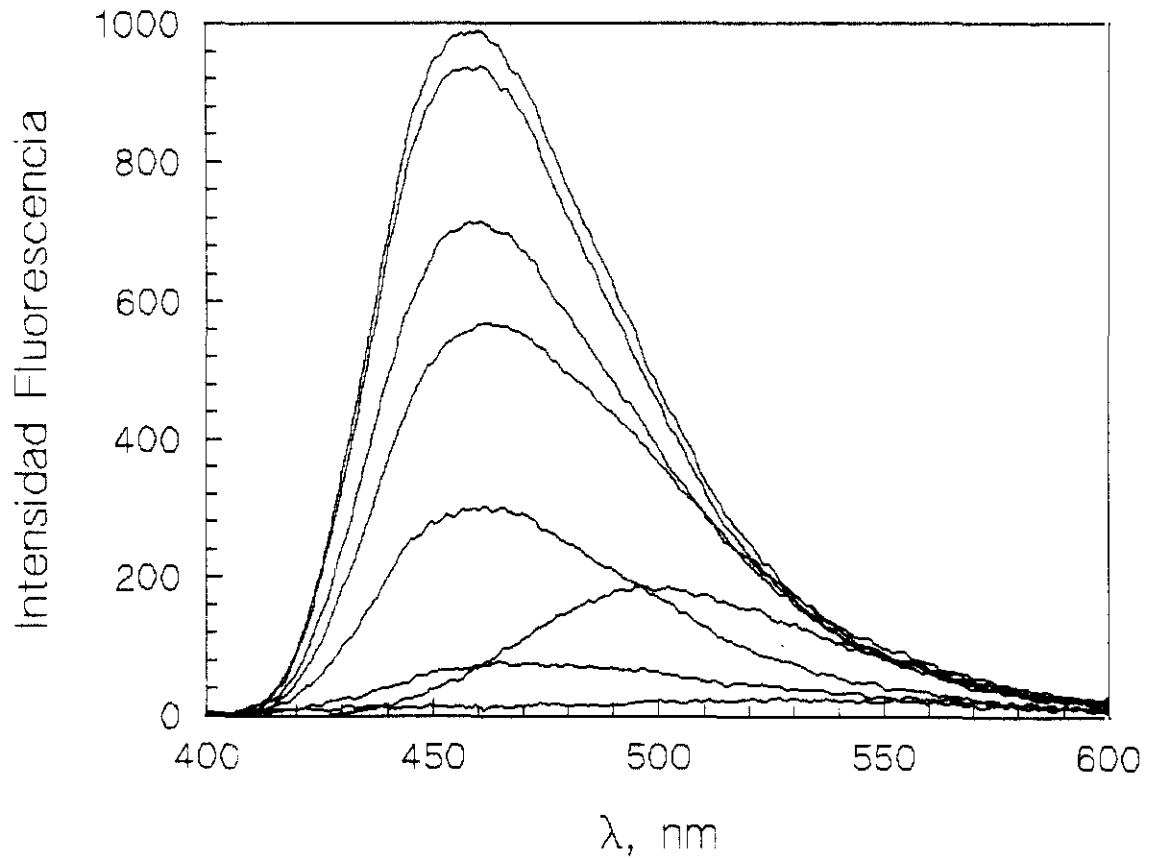


Figura 90 Espectros de emisión de fluorescencia de una disolución de pioverdina $1.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ($\lambda_{\text{exc}} 390 \text{ nm}$) en función del pH

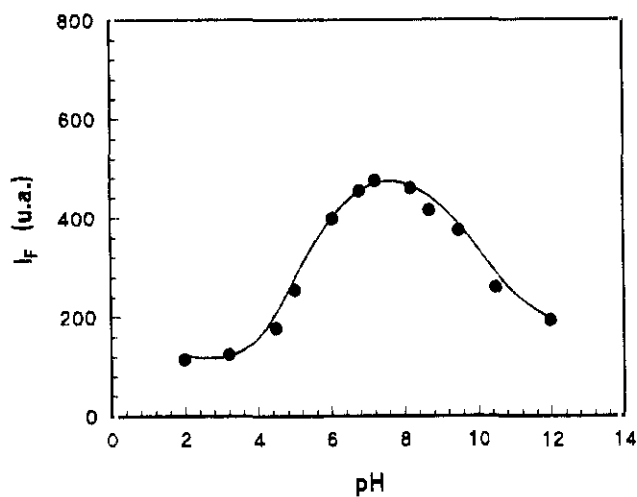


Figura 91. Intensidad de fluorescencia de una disolución de pioverdina $1.3 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ a 465 nm ($\lambda_{\text{exc}} 390 \text{ nm}$) en función del pH

Para el cálculo del pKa se utilizó una fórmula similar al caso de absorbancia, obteniendo un valor de pK 6.5 ± 0.03 .

$$pK = pH + \log \left(\frac{I_{F1} - I_{Fm\acute{a}x}}{I_{Fm\acute{i}n} - I_{F1}} \right)$$

Una vez observado el comportamiento del sideróforo en disolución acuosa, se procede al estudio de su comportamiento frente al pH en ambas **fases sólidas** CPG y so-gel..

En sol-gel. Para estudiar el comportamiento frente al pH de la fase sólida obtenida se coloca la fase reactiva en una célula de flujo (Figura 38) y se obtienen las longitudes de excitación y emisión de esta fase reactiva (330 y 405 nm respectivamente (apartado III.3.3.2.)). Una vez localizadas estas longitudes de onda se pasan a través de la célula de flujo disoluciones con diferentes pH (intervalo 1 - 10) y se registra el espectro de fluorescencia en cada caso. En la figura 92 se representan los espectros obtenidos en este estudio observándose que existe un máximo de emisión a pH ácidos que va ensanchándose conforme el pH va haciéndose básico a la vez que la intensidad de fluorescencia disminuyen en igual sentido.

De la representación de IF frente al pH (Figura 93) pueden obtenerse dos intervalos lineales uno al variar el pH de 2.2 a 4.2 y otro de 9 a 10.5. Los intervalos lineales obtenidos al igual que en la mayoría de los sensores de pH descritos en bibliografía con un único indicador inmovilizado es de aproximadamente 2 unidades de pH. Como era de esperar se observa una modificación del pK del reactivo inmovilizado, en este caso la inmovilización del reactivo produce una mayor estabilidad del reactivo en pH neutros y y modificación de ambos pK hacia valores inferiores, lo que indica que el reactivo inmovilizado en este soporte se comporta como un ácido más fuerte.

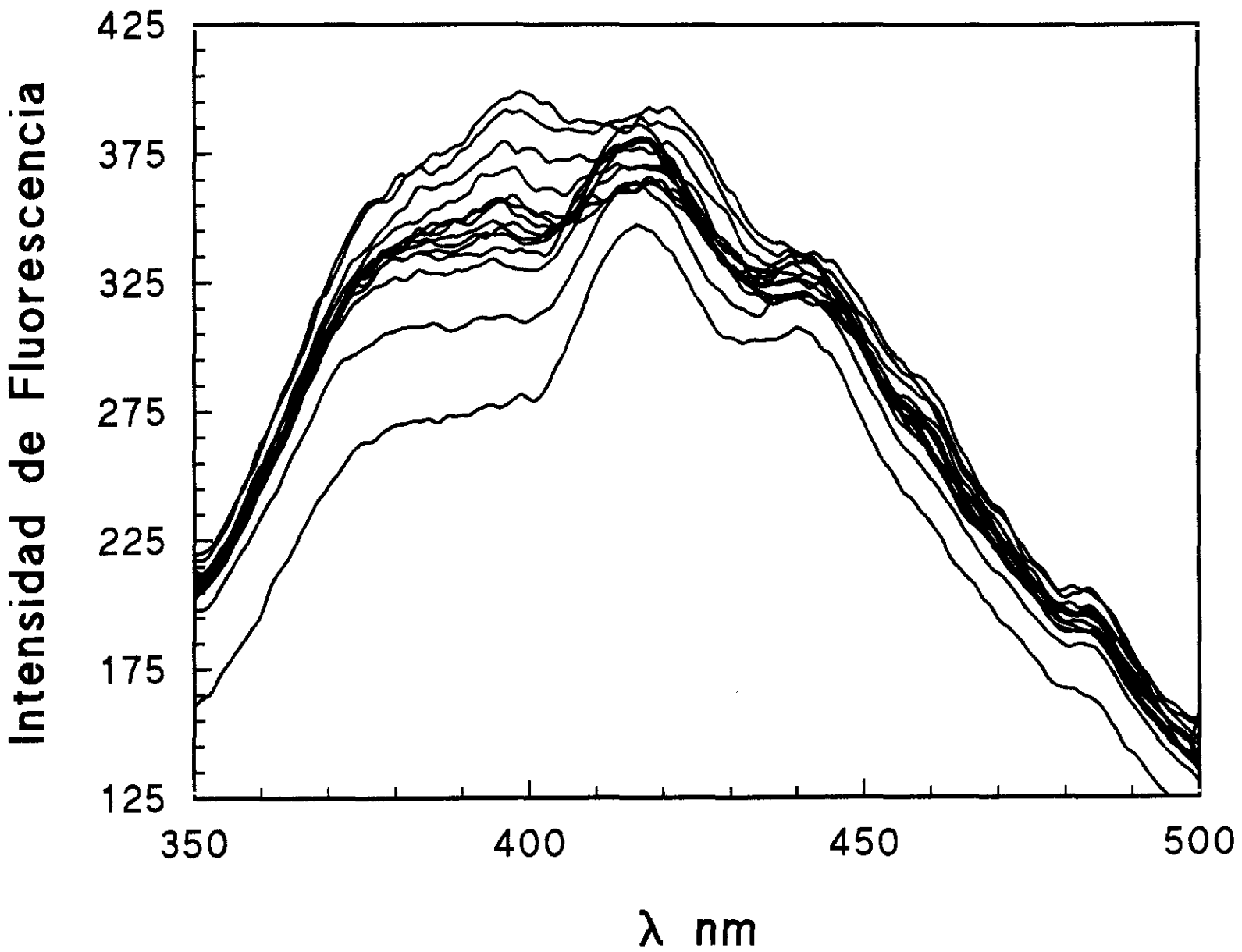


Figura 92 Espectros de emisión (λ exc 330 nm) de poverdina atrapada en vidrio sol-gel en función del pH.

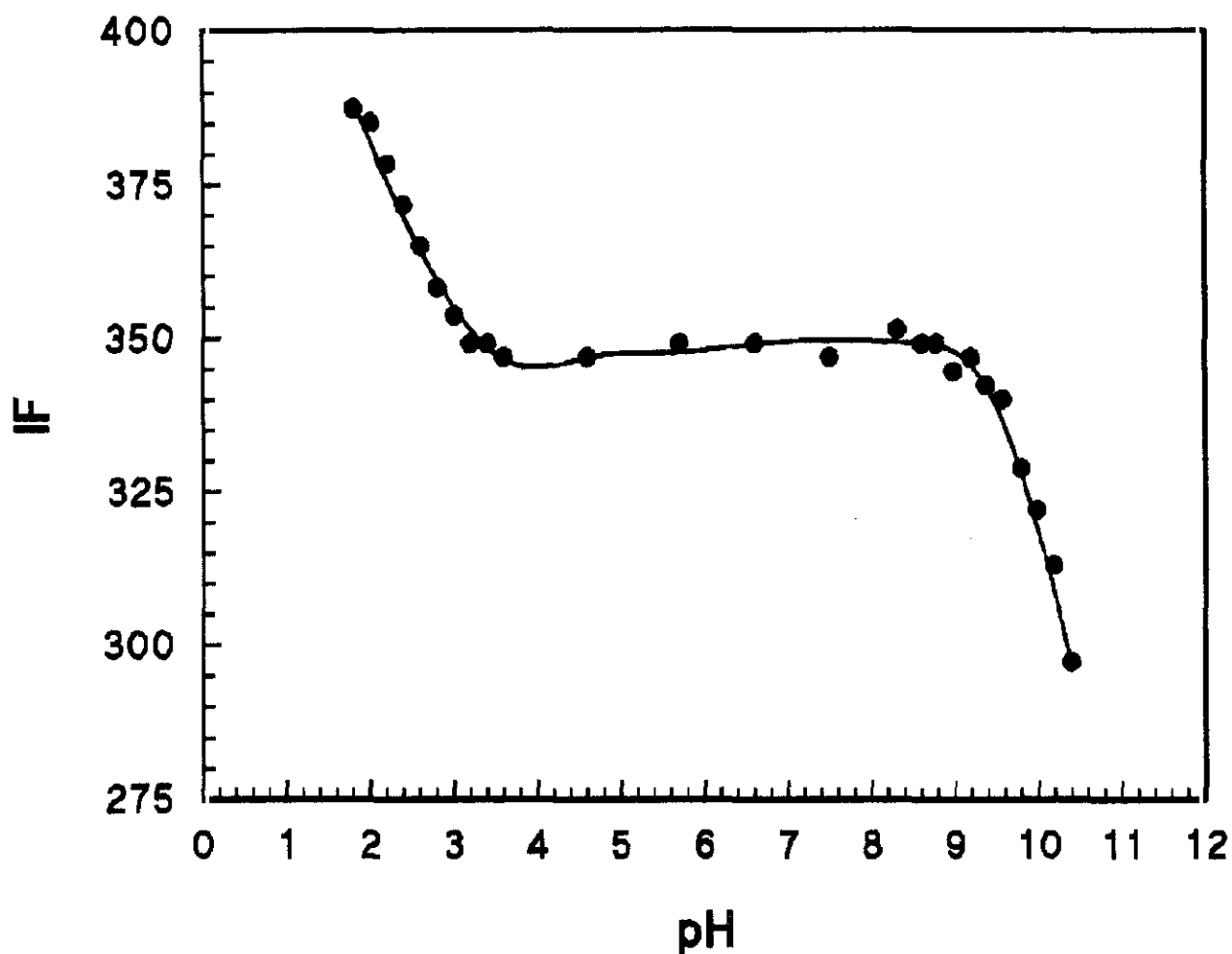


Figura 93 Intensidad de fluorescencia (405 nm λ exc 330 nm) de pioverdina atrapada en sol -gel IF de pioverdina en sol-gel frente a p

En CPG. La fase reactiva se empaquetó al igual que en el caso anterior en la célula de flujo Hellma 178.52 QS que se dispuso en el portacubetas del espectrofluorímetro. A través de ella se pasaron disoluciones con distinto pH y se registraron los espectros de fluorescencia no corregidos (Figura 94)

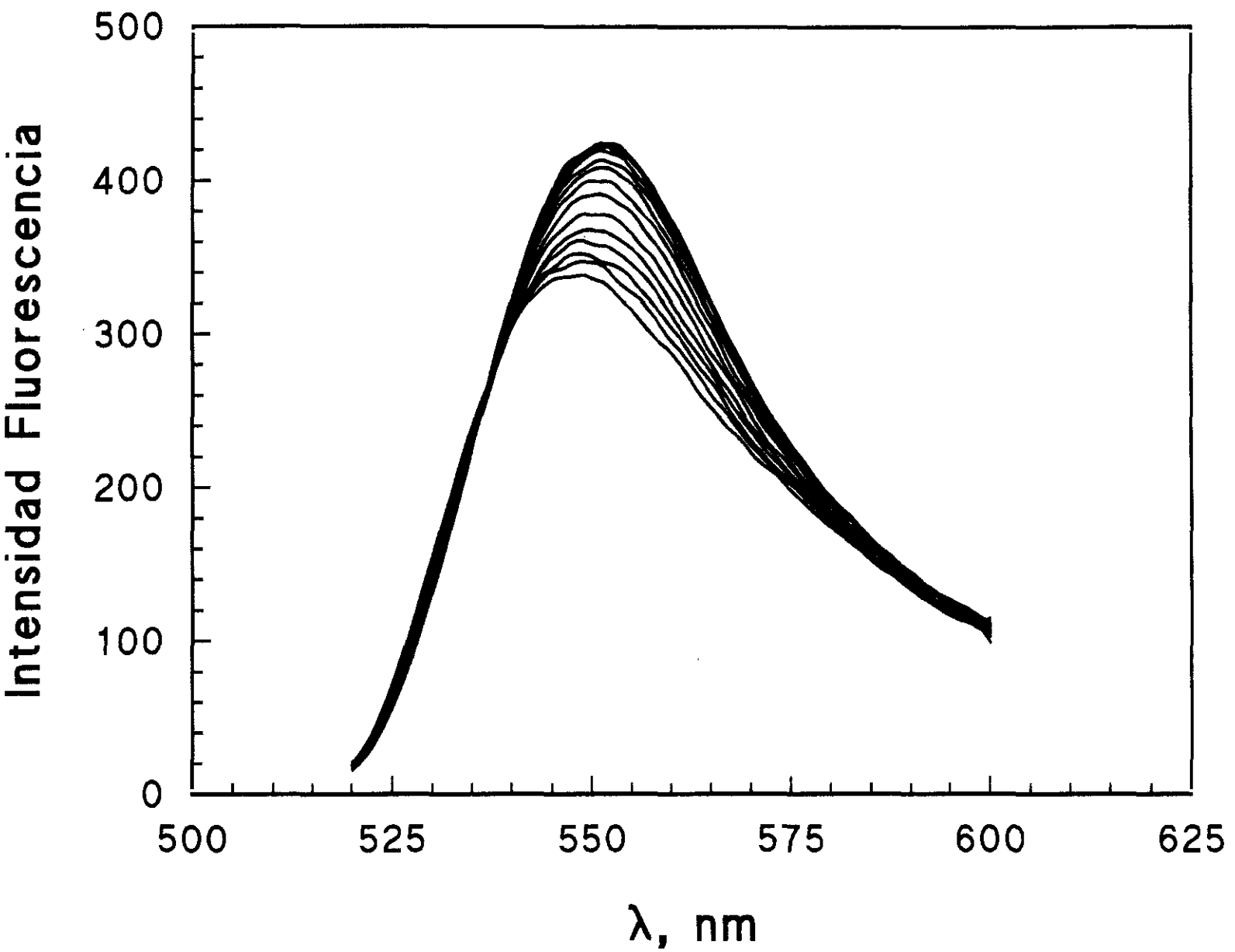


Figura 94. Espectros de emisión fluorescencia (λ_{ex} 500nm) de ploverdina inmovilizada en CPG a diferentes pH

En ella se observa que existe un máximo a 445 nm a pH ácido que sufre un pequeño desplazamiento batocrómico y un efecto hiperacrómico con el incremento del pH, presentando un máximo a 550nm a valores mayores de pH.

La variación de la intensidad de fluorescencia a 550nm en función del pH se representa en la figura 95. De su observación se puede deducir que el pK del reactivo pioverdina inmovilizado en CPG se ve modificado hacia valores inferiores, si bien no ha podido ser calculado debido a que la intensidad de fluorescencia no se mantuvo constante para pH ácidos.

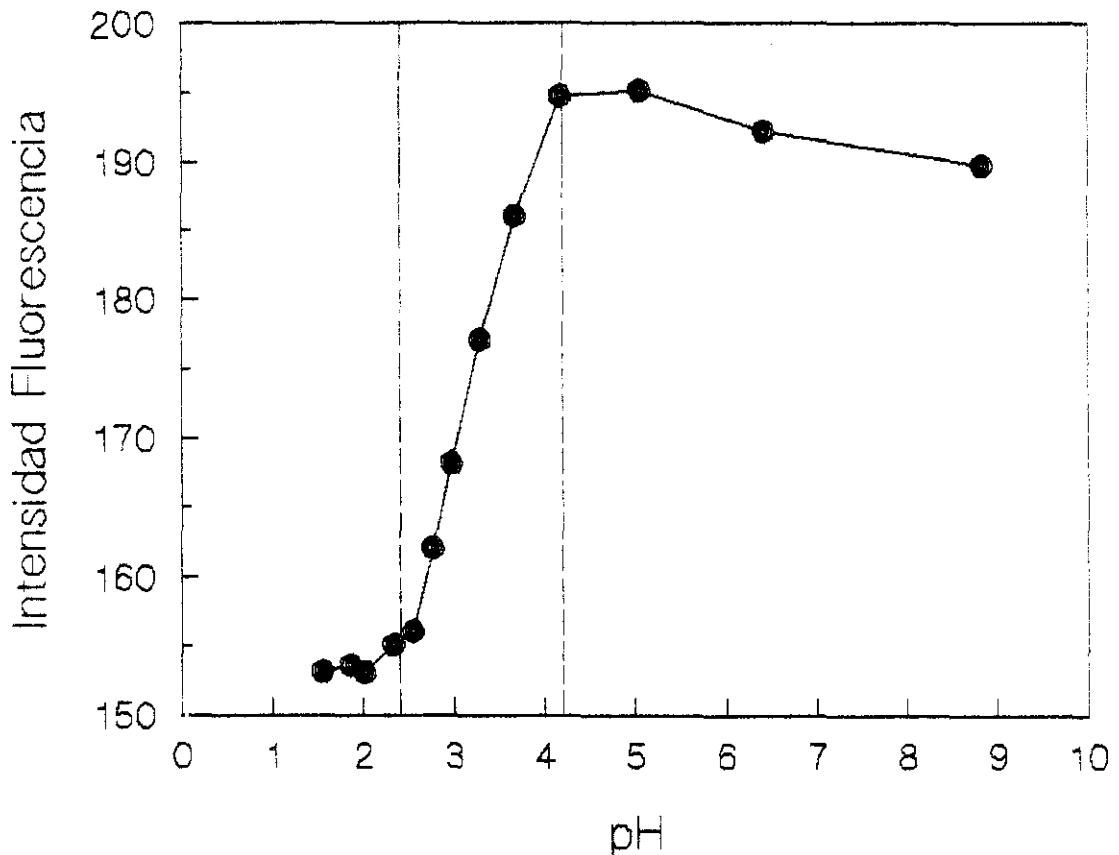


Figura 95. Intensidad de fluorescencia (552nm λ_{exc} 550nm) de pioverdina inmovilizada en CPG en función del pH.

5.2. POTENCIAL ANALÍTICO DE PIOVERDINA INMOVILIZADA COMO SENSOR DE pH

Las zonas de pH donde existe una variación lineal de la intensidad de fluorescencia con el pH se representan en las figuras 96, 97 y 98 obtenidas al poner en contacto las fases reactivas con disoluciones de los pH correspondientes.

Se observa que si el soporte sólido utilizado es el sol-gel se obtienen dos zonas de trabajo una en la zona ácida (2.2 - 4.2) y otra en zona básica (8.2-10.5). Si la pioverdina se encuentra inmovilizada en CPG se obtiene un único intervalo de trabajo (2.4 - 4.8) un intervalo de trabajo ligeramente más amplio.

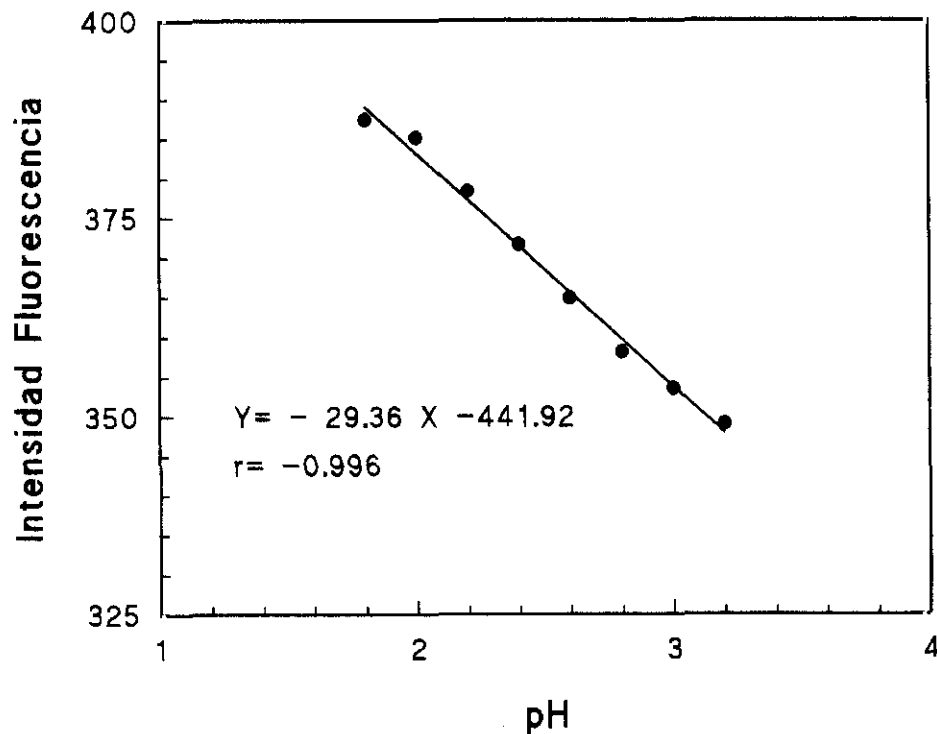


Figura 96 Intensidad de fluorescencia (405 nm exc 330 nm) de pioverdina atrapada en sol-gel en el intervalo de pH 1- 4

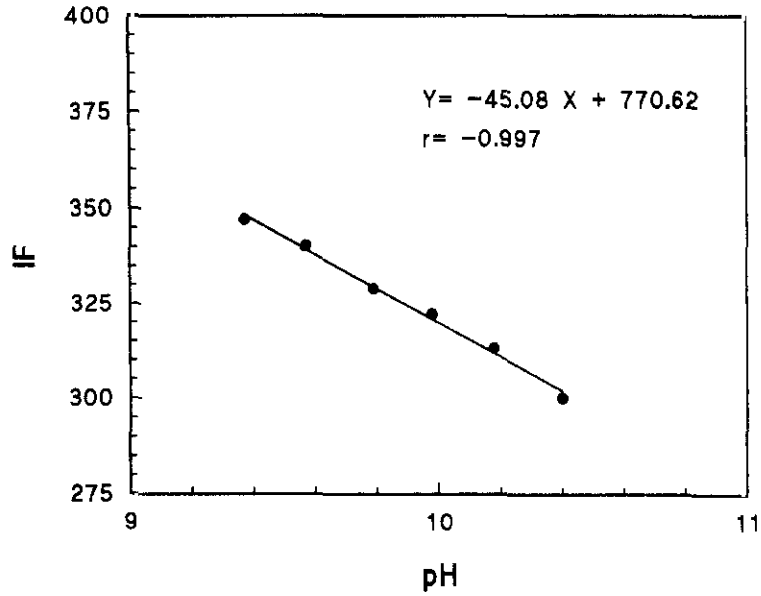


Figura 97 Intensidad de fluorescencia (405 nm exc 330 nm) de pioverdina atrapada en sol-gel en el intervalo de pH 9-11

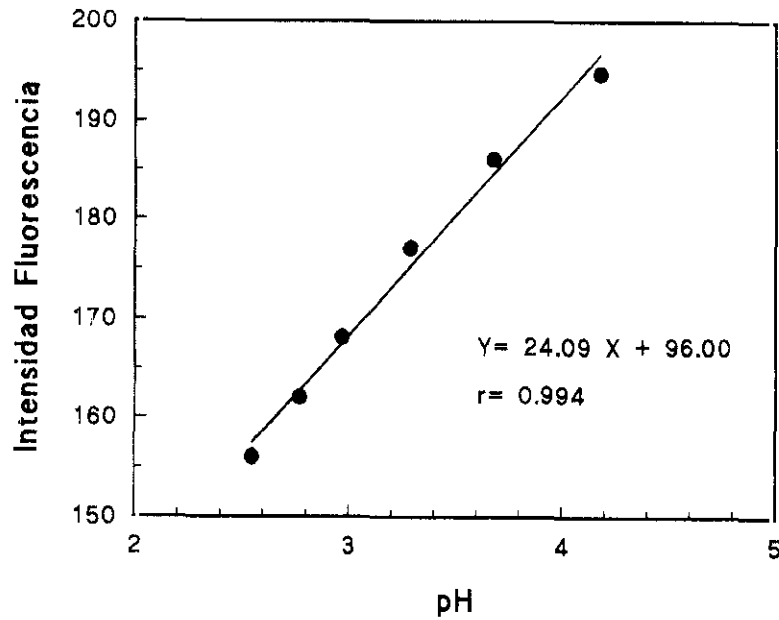


Figura 98 Intensidad de fluorescencia (550 nm λ exc 500nm) de pioverdina inmovilizada en CPG en el intervalo de pH 2-5

Estudio del tiempo de respuesta

El tiempo de respuesta de la mayoría de sensores de pH descritos en bibliografía varía según el sensor trabaje en sentido creciente de pH (ácidos a básicos en el intervalo de trabajo) o viceversa, siendo normalmente mayores cuando la variación de pH tiene lugar en sentido decreciente. El comportamiento de las fases sólidas estudiadas en este capítulo es similar. Siendo responsable de este tiempo de respuesta la cinética de difusión de los H^+ hacia el interior de los poros donde se encuentra atrapado el indicador. Además también influye la cinética del desalojo de H^+ del poro

Para comprobar si esto era cierto se hizo pasar una disolución básica por la célula de flujo y se registró la fluorescencia de la misma. A continuación se adicionó ácido hasta llegar a un pH determinado y ésta disolución se recirculó durante 30 minutos. Se registró a diferentes tiempos el espectro de fluorescencia de la fase sólida para ver si existía variación en la forma del espectro o en la intensidad de fluorescencia. En todo momento la disolución recirculada estaba en contacto con un pHmetro y se observó que se producía variación en este parámetro, ya que el pH de la disolución lentamente se hacía más básico debido a que los OH^- que estaban en el interior del sol-gel iban siendo liberados a la disolución. Se pensó entonces en tomar una disolución de pH determinado como referencia (HCl 1M) para conseguir la monitorización en continuo de pH en esta fase sólida. La estabilización de la respuesta a pH más ácidos fue a tiempo 5 minutos

También se estudió el efecto de la ***fuerza iónica*** sobre la respuesta. Los resultados obtenidos fueron que la influencia de la fuerza iónica (NaCl y $NaSO_4$ 0 - 0.5M) es mínima comparando las pendientes de los calibrados obtenidos en ausencia y en presencia de dichos electrolitos. si bien se ve desplazado hacia pH inferiores

El efecto que ejerce la ***temperatura*** sobre el calibrado es mínimo pues los valores de las pendientes obtenidas son similares en todas las temperaturas estudiadas ($25^{\circ}C$ - $60^{\circ}C$) aunque no así los valores de intensidad de fluorescencia.

Para obtener el ***calibrado*** entonces se procede de la siguiente manera, se introducen disoluciones de diferente pH pero siempre intercalando la disolución de referencia y se representa el incremento de IF frente al pH de las disoluciones portadoras. El calibrado así

obtenido son semejantes a los de las figuras 96, 97 y 98. Sin embargo la repetición de los mismos indica que las pendientes de ambos son similares aunque no así los valores de intensidad de fluorescencia por lo que se optó por medir frente a una disolución de referencia (HCl 1M) .

Se evaluó la **precisión** para la determinación de pH (en vidrio sol-gel) bombeando alternativamente una disolución de pH 2.5 y la disolución de referencia (HCl 1M) sobre la fase sólida en 10 ciclos sucesivos. El resultado obtenido fue que si bien los valores de intensidad de fluorescencia se modificaron ligeramente, no lo hizo la señal relativa entre la referencia y la disolución de pH 2.5 por lo que se calculó la precisión de la señal relativa. El valor calculado fue de 3.3% .

La **aplicación** de la fase sólida pioverdina atrapada en sol-gel se realizó en continuo haciendo primero el calibrado y después muestras de agua a diferentes pH. Si de nuevo representamos las muestras de agua como un nuevo calibrado la pendiente entre ambos es similar. Si referimos las muestras de agua respecto al primer calibrado obtenemos los siguientes errores:

Comparación de valores obtenidos para medidas de la misma disolución.

pH-metro	Sensor fluorescencia	Error
2.00	2.12	6%
1.97	2.06	4.6%
2.2	2.34	6.4%
2.5	2.64	5.6%
2.9	3.03	4.5%

Valoraciones, La fase reactiva obtenida (pioverdina en CPG) se ha utilizado para la determinación final del punto de equivalencia en volumetrías de neutralización. Las curvas de valoración se realizan midiendo la fluorescencia de una disolución ácida a la que se añade volúmenes crecientes de una base. En este caso el sistema en flujo empleado es un sistema cerrado donde la disolución que sale de la célula vuelve al contenedor inicial para así valorar todo el ácido inicial.(Figura 40 Apartado II.2.1.2). Los resultados obtenidos se comparan con los que proporciona una valoración potenciométrica convencional que se

realiza simultáneamente, colocando el electrodo de vidrio en la disolución que estamos valorando.

Las curvas correspondientes a estas valoraciones tienen el mismo hábito, antes del punto de equivalencia la intensidad de fluorescencia se incrementa continuamente, en el punto de equivalencia el pH cambia rápidamente de ácido a básico, lo que se traduce en una variación de la intensidad de fluorescencia (disminución). La adición de valorante se efectúa cuando se ha conseguido un señal constante de fluorescencia para cada pH, hecho que ocurre tras un tiempo aproximado de 5 minutos. El punto de equivalencia corresponde entonces al corte de las rectas obtenidas .

Valoración de HCl. Se efectuó la valoración de HCl (0.1M), previamente factorizado con carbonato sódico, con una disolución de NaOH de concentración conocida

La valoración de 40 ml de clorhídrico supuso los siguientes valores:

V(ml) potenciometría	40.875	40.925	41.025	40.475
M	0.1097	0.1098	0.1101	0.1087

Media: 0.1096. Desviación estándar $6.076 \cdot 10^{-4}$

V(ml) sensor fluorescente	40.904	40.299	40.910	40.9075
M	0.1098	0.1082	0.1098	0.1098

Media 0.1094. Desviación estándar $8 \cdot 10^{-4}$

De igual manera la realización de valoraciones de clorhídrico 0.01M fue satisfactoria.

Del estudio realizado en el punto anterior se deducen unas características que hicieron muy prometedor este reactivo para constituir la fase sensible al pH en cualquiera de los soportes estudiados.

Si bien no recomendamos la utilización de este sensor para la determinación de un valor de pH en la zona de calibrado debido a que aunque la pendiente del calibrado se mantiene no lo hace la señal absoluta de fluorescencia por lo que es necesario la evaluación de un determinado pH haciendo en cada caso una referencia, recomendamos su empleo

como sensor de alarma en procesos en los que el valor de pH exacto no sea tan importante como un intervalo.

En el caso de sol-gel como soporte sólido del reactivo pioverdina existe un amplio intervalo de estabilidad en el intervalo 4.5 - 8.5, en el que la intensidad de fluorescencia se mantiene constante, sin embargo valores menores o mayores de estos producen una variación de dicha intensidad. Esta variación puede servir como señal de alarma si esta fase reactiva se utiliza en el control de procesos que requieran un pH próximo a la zona neutra pueden ser tanto la fermentación láctea.

En otros campos como en hidrología es importante determinar la acidez o alcalinidad porque estos parámetros limitan las posibilidades de su uso, así la utilización de agua para riego está limitada por la alcalinidad. Se define la alcalinidad como la capacidad de una muestra natural de agua de reaccionar con H^+ , para alcanzar un pH de 4.5, mientras que la acidez de las aguas naturales se refiere al contenido total de ácido que puede titularse a pH 8.3 con NaOH.

Observando la figura 93 se puede deducir que es posible la utilización de la fase reactiva sol-gel dopado con pioverdina para la determinación de acidez o alcalinidad de las aguas naturales puesto que ambos puntos de pH 4.5 y 8.3 se encuentran la máxima variación de fluorescencia.

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se deducen de este trabajo quedan resumidas en los siguientes puntos:

A) Sensor de reflectancia para la determinación de Al(III) con cromazurol S.

- 1.- Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de Al(III), que emplea el reactivo CS inmovilizado en la resina de intercambio iónico Dowex 1-X2.
- 2.- El sistema se puede regenerar empleando HCl 1M.
- 3.- Las características analíticas exhibidas por el sensor cuando se bombea Al(III) durante 5 minutos son: intervalo de linealidad entre 0.1 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de Al(III), límite de detección 0.1 $\mu\text{g/ml}$ y precisión 3.6% para una determinación de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Al(III). La sensibilidad puede mejorarse, si bien disminuye el intervalo de linealidad, si se bombea la disolución del analito a través de la célula de flujo durante un tiempo superior a 5 minutos.
- 4.- Este sensor no resultó adecuado para las medidas en continuo de Al(III) debido al diferente grado de hinchamiento de la resina al variar el pH y fuerza iónica del medio, hecho que originaba poca reproducibilidad en la medida y una gran dificultad en la regeneración del sistema.
- 5.- El estudio de otros soportes alternativos a las resinas como son el vidrio de poro controlado, gel de sílice o vidrio sol-gel, si bien solucionan el problema de hinchamiento no resultaron adecuados para la determinación de Al(III) debido a que la sensibilidad obtenida empeora, para tiempos de respuesta cortos, la obtenida en los soportes poliméricos.

B) Sensor de reflectancia en flujo continuo para la determinación de hierro(III) con cromazurol S.

- 1- Se ha desarrollado un método para determinar Fe(III), en flujo empleando fibra óptica, que utiliza cromazurol S inmovilizado en gel de sílice como terminal sensible.
- 2- Se han ensayado tres soportes para inmovilizar el indicador cromazurol S mediante distintos mecanismos, vidrio de poro controlado, gel de sílice y vidrio sol-gel, seleccionándose el soporte gel de sílice activado por Aliquat 336, por su mayor reactividad, menor tiempo de respuesta y sencillez del proceso de inmovilización.
- 3- El sensor desarrollado, si bien no es reversible, se regenera fácilmente pasando HCl 1M a través del terminal sensible.
- 4- Las mejores condiciones de trabajo las proporciona el empleo de HAc/Ac⁻ 0.05 M a pH 4.2, alcanzándose la señal de equilibrio en 5 o 10 minutos, si bien 2 minutos son suficientes para obtener una respuesta satisfactoria lo que lo hace apropiado para las medidas en flujo.
- 5- El método desarrollado proporciona un intervalo lineal de respuesta entre 10 y 500 ng/ml, con una precisión del 4.8 % para una concentración de Fe(III) de 100 ng/ml, siendo el límite de detección de 10 ng/ml. Las principales interferencias del método se deben al Al(III), F⁻ y I⁻. El terminal sensible puede ser empleado al menos para 1000 determinaciones de Fe(III).
- 6- El sensor por reflectancia, en flujo, que se propone se ha aplicado con éxito a la determinación de Fe(III) en aguas naturales. La absorción atómica con llama se ha empleado para la validación del método.

C) Sensor de fluorescencia, en flujo, para la determinación de hierro(III) con pioverdina.

- 1- El sideróforo pioverdina, inmovilizado en CPG o vidrio sol-gel constituye el terminal sensible de un sensor fluorescente, desarrollado en flujo, para la determinación de hierro(III).
- 2- El complejo Fe(III)-pioverdina no es fluorescente lo que da lugar a una disminución drástica de la fluorescencia que es proporcional a la concentración de hierro.
- 3- La pioverdina en disolución acuosa presenta un máximo de emisión de fluorescencia a 465 nm. cuando se excita a 390 nm., mientras que inmovilizada muestra un máximo de emisión a 552 nm. ($\lambda_{ex}=500$ nm.) si se emplea como soporte vidrio de poro controlado o emisión a 405 nm ($\lambda_{ex}=390$ nm.) si se utiliza vidrio sol-gel. El desplazamiento en la longitud de onda observado es una consecuencia de la importante modificación que sufre el fluoróforo cuando el reactivo se inmoviliza covalentemente en CPG y por el contrario la menor variación que sufre cuando es atrapado en vidrio sol-gel.
- 4- Este mismo hecho dió lugar a una variación en las condiciones de trabajo, pH 6.5 en MES 0,05 M en disolución acuosa; pH 4.5 en biftalato /ftalato 0.01 M en CPG y pH 6.5 en MES 0.05 M en vidrio sol-gel .
- 5- Ambos terminales sensibles, pioverdina inmovilizado CPG y en vidrio sol-gel, presentan una rápida respuesta al analito y una fácil regeneración en HCl 1M, lo que los hace adecuado para su empleo en sensores en flujo.
- 6.- Las características analíticas del método en disolución acuosa son: intervalo de linealidad entre 10 y 180 ng/ml, precisión 4% para 50 ng/ml de Fe(III) y límite de detección 10 ng/ml.
- 7.- El sensor en flujo emplea como terminal sensible pioverdina inmovilizada en CPG se puede aplicar hasta una concentración de Fe(III) de 200 ng/ml siendo su límite de detección de 3.0 ng/ml y su precisión del 3% para una concentración de Fe(III) de 60 ng/ml.

8.- El sensor desarrollado con vidrio sol-gel como soporte inerte presenta las siguientes características: intervalo de linealidad entre 3.0 y 300 ng/ml, precisión 3% para 150 ng/ml de Fe(III) y un límite de detección de 3.0 ng/ml.

9.- El empleo del reactivo inmovilizado mejora las características analíticas del método en disolución, siendo mínimo el consumo de pioverdina, ya que ambos soportes permanecen operativos al menos para 1000 determinaciones de Fe(III).

10.- El sideróforo es muy selectivo para el Fe(III) tanto en disolución acuosa como inmovilizado, destacando que iones complejantes del Fe(III) como es el fluoruro no interfieren hasta concentraciones 50 o 100 veces superiores a las de hierro.

11.- Los sensores ópticos desarrollados empleando como soportes tanto CPG como sol-gel, se han aplicado a la determinación de Fe(III) en muestras de aguas naturales, no existiendo diferencias significativas al nivel de probabilidad del 95% entre los resultados obtenidos por los métodos propuestos y los obtenidos por el método alternativo espectroscopía de emisión por plasma acoplado inductivamente (ICP-AES).

D) Caracterización en un sistema de análisis por inyección en flujo del sistema pioverdina-Fe(III) atrapado en vidrio sol-gel.

1.- Se ha desarrollado un método mediante análisis por inyección en flujo (FIA) que emplea pioverdina inmovilizado en vidrio sol-gel como terminal sensible para la determinación de Fe(III) en pequeños volúmenes de muestra.

2.- Las características analíticas del método FIA cuando se inyecta un volumen de muestra de 1000 μ l han sido: intervalo de linealidad entre 30 y 900 ng/ml, límite de detección 30 ng/ml y precisión 4.5% para una determinación de 500 ng/ml.

3.- El método FIA propuesto se ha aplicado con éxito a la determinación de Fe(III) en muestras de suero humano. La validación se ha realizado comparando los resultados con los de un método espectrofotométrico de referencia (FerroZine).

E) El reactivo pioverdina como indicador fluorescente.

1.- Se han calculado los pKa del reactivo en disolución tanto por absorbancia y fluorescencia ($pK_a 6.05 \pm 0.05$)

2.- La inmovilización del reactivo en soportes sólidos, tanto vidrio de poro controlado (enlace covalente) o vidrio sol-gel (atrapamiento físico) modifica las características ácido-base del indicador, aumentando su carácter ácido en ambos soportes respecto a disolución acuosa.

V. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

- (1) "Química Analítica Cualitativa". Burriel, Lucena, Arribas, Hernández. Ed. Paraninfo. **1989**.
- (2) J.H. Martín, R.M. Gordon, *Deep. Sea Res.*, **1988**, 35, 177.
- (3) J.H. Martín, S.E. Fitzwater, *Nature* (London), **1988**, 331, 341.
- (4) J.H. Martín, M. Wihthfield, *Trace Metals in Seawater*. L.S. Wong, E. Boile, K.W. Bruland, J.D. Burton, E.D. Goldberg Eds Plenum Press New York, **1983**, pp 256-298.
- (5) K.L. Von Damm, J.M. Edmon, B. Grant, C.I. Measures, B. Walden, R.F. Weiss, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **1985**, 49, 2197.
- (6) H. Hong, D.R. Kesler, *Limmol. Oceanogr.*, **1986**, 31(3) 512.
- (7) R.M. Gordon, J.H. Martín, G.A. Knauer, *Nature* (London), **1982**, 299, 611.
- (8) W.M. Landing, K.W. Bruland, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **1987**, 51, 29-43.
- (9) W. Stumm, J.J. Morgan, *Aquatic Chemistry*; Wiley-Interscience; New York, **1981**, Capítulo 5.
- (10) R. H. Byrne, D.R. Kesler, *Mar. Chem.*, **1976**, 4, 255.
- (11) J.E. Roekens, R.E. Van Grieken, *Mar. Chem.*, **1983**, 13, 195.
- (12) T.D. Waite; F.M.M. Morel, *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 787.
- (13) F.J. Millero, S. Sotolongo, M. Izaguirre, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **1987**, 51, 793.
- (14) A. J. Giorgio, *Med. Clin. N. Am.*, **1970**, 54, 1399.
- (15) F. Hosain, C.A. Fineh, *J. Lab. Clin. Med.*, **1964**, 64, 905.
- (16) A.S. Prasad, D. Oberleas, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1971**, 138, 932.

-
- (17) A.E. Harvey Jr, J.A. Smart and E.S. Aims, *Anal. Chem.*, **1955**, 27, 26.
- (18) H. Tamura, K. Goto, T. Yostuyanagi and M. Nagayama, *Talanta*, **1974**, 21, 314.
- (19) S.I. Heaney and W. Davison, *Limmol. Oceanog.*, **1977**, 22, 753.
- (20) R.B. Willis and D. Sangster, *Anal. Chem.*, **1976**, 48, 59.
- (21) K.W. Bruland, R.P. Franks, G.A. Knauer, J.H. Martin, *Anal. Chim. Acta*, **1979**, 105, 233.
- (22) V.A. Elrod, K.J. Johnson, H.C. Cocle, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 893.
- (23) T.D. Yerian, T.P. Hadjiioannou and G.D. Christian, *Talanta*, **1986**, 33, 547.
- (24) A.J. Pesce y L.A. Kaplan. *Química Analítica: Métodos*, Ed Panamericana, **1990**
- (25) FerroChem Model 3050, Serum Iron and Total Iron Binding Capacity Analyzer, instruction manual, ed.2, Bedford, MA 1979, Environmental Sciences Associates , Inc., revisado **1981**.
- (26) P. Barrand, Gadean., *Enciclopedia del Aluminio*, Vol. 2. Ed. Urno.
- (27) A.C. Alfrey, J.M. Mishell, J. Burks et al. *Transations of the American Society of Artificial Internal Organs.*, **1972**, 18, 257.
- (28) A.C. Alfrey, G.R. Legendre and W.D. Kaehny, *New England Journal of Medicine* , **1976**, 294, 184.
- (29) European Economic Community Resolution. 86/C-184.04 Official J. Eur. Comm. C184 (16 July **1986**).
- (30) R. Cornelius; P. Schutzser. *Contr. Nephol.*, **1984**, 38, 1.
- (31) O.S. Wolfbeis, "Fiber optical fluorosensors in analytical and clinical chemistry" en "Molecular luminiscence spectroscopy: Methods and applications" S.G. Schulman (ed.), Wiley, New York **1988**.
- (32) M-A. Arnold, M.E. Meyerhoff, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **1989**, Vol 20.
- (33) A.L. Harmer y R. Narayanaswamy, "Spectroscopic and fibre-optic transducers" en "Chemical sensors", T.E. Edmons (ed.), Blackie&Son, London **1988**, pp275-294.

-
- (34) N. Opitz y D. W. Lübbers, *Eur. J. Physiol.*, **1975**, 335, R120.
- (35) D.W. Lübbers y N. Opitz, *Sensors and Actuators*, **1983**, 4,641.
- (36) R. Seitz, "Optical sensors based on immobilized reagents", en "Biosensors: Fundamentals and applications", A.P.T. Turner (ed.), Oxford University Press, New York **1987**.
- (37) C. Cámara, M.C. Moreno, y G. Orellana, "Chemical sensing with fiberoptic devices", en "Biosensors with fiberoptics", D.L. Wise y L.B. Wingard Jr. (ed.), The Humana Press, Clifton, Nj, **1991**, pp 29-84.
- (38) W.R. Seitz, "Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics", *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.* **1988**, 19, 135.
- (39) J. Janata, "Principles of chemical sensors", Plenum Press, New York **1989**.
- (40) O.S. Wolfbeis. *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*. CRC Press, Boca Raton, Florida **1991**.
- (41) G. Boisdé y J.J. Pérez, *La vie des Sciences, Compt. Rend. Acad. Sci.*, **1988**, 5, 303.
- (42) M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro, *Analyst*, **1990**, 115, 699.
- (43) M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Microchem. J.*, **1992**, 45, 189.
- (44) Z. Fang, M. Sperling, B. Welz, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **1990**, 5, 639.
- (45) I.G. Cook, C.W. McLeod, P.J. Worsfold, *Anal. Proc.*, **1986**, 23, 5.
- (46) M. Karlsson, J.A. Persson, J. Möller, *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 244, 109.
- (47) W. Lei, P.K. Dasgupta, J.L. Lopez, D.C. Olson, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 496.
- (48) J. Ruzicka, A. Arndal, *Anal. Chim. Acta* **1989**, 216, 243.
- (49) V. Carbonell, A. Salvador, y M. de la Guardia. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1992**, 342, 529.
- (50) J. Atienza, M.A. Herrero, A. Maquieira y R. Puchades, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **1991**, 22, 331.

-
- (51) J. Atienza, M.A. Herrero, A. Maquieira y R. Puchades, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **1992**, 23, 1.
- (52) M. Valcarcel, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* **1989**, 8, 34
- (53) V.Kuban, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1993, 346, 873.
- (54) J.F. Van Staden, A.E. Joubert y H.R. Vliet, *Z. Anal. Chem.*, **1986**, 325, 150.
- (55) B. Bermúdez, A. Ríos, M.D. Luque de Castro y M. Valcárcel, *Talanta*, **1988**, 35, 810.
- (56) J. Martínez Calatayud and S. Sagrado Vives, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1989**, 10, 1165.
- (57) P. van Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst and R.W. Frei, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 167, 249.
- (58) J. Ruz, Lázaro y M.D. Luque de Castro, *J. Autom. Chem.*, **1988**, 19, 15.
- (59) E.H. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 216, 257.
- (60) J.M. Fernández Romero, M.D. Luque de Castro, *Cjim Oggi*, **1988** November, 17.
- (61) M. Noufi, Ch. Yarnitzky and M. Ariel, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 228, 117.
- (62) I.M.A. Shakir and A.T. Faizullah, *Analyst* **1989**, 114, 951.
- (63) J. Szpunar-Lobinska and M. Trojanowicz, *Analyst*, **1990**, 115, 319.
- (64) S. G. Offley, N.J. Seare, J.F. Tyson and H.A.B. Kibble, *Anal. Proc.*, **1991**, 28, 18.
- (65) M.R. Straka, G. Gordon and G.E. Pacey, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1799.
- (66) D.A. Hollowell, J.R. Gord, G. Gordon and G.E. Pacey, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1524.
- (67) J.R. Gord, G. Gordon and G.E. Pacey, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 2.
- (68) S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí and E. Martínez-Fábregas, *Analyst*, **1989**, 114, 1443.
- (69) W.R. van der Linden, *Anal. Chim. Acta*, **1983**, 151, 359

-
- (70) W.Frenzel, Z. *Anal. Chem.*, **1990**, 336, 21.
- (71) U. Prinzing, I. Ogbomo, C. Lehn and H.L. Schmidt, *Sensors & Actuators*, **1990**, B1, 542.
- (72) W. Künnecke and R. D. Schmidt, *J. Biotechnol.*, **1990**, 14, 127.
- (73) J.F. van Staden, *Anal. Lett.*, **1986**, 19, 1407.
- (74) S. A. Rosario, G.S. Cha and M.E. Meyerhoff, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2418.
- (75) R.G. Melcher, *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 214, 299.
- (76) R.G. Melcher, and P.L. Morabito, *Anal. Chem.*, **1990**, 62, 2183.
- (77) F.T. Esmadi, M.A. Kharaof, and A.S. Attiyat, *Talanta*, **1990**, 37,1123.
- (78) M. Valcárcel, and M.D. Luque de Castro, *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, Amsterdam, **1988**.
- (79) A. Ríos, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 1540.
- (80) A. Ríos, M.D. Luque de Castro and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1803.
- (81) R.D. Schmid and W. Künnecke, *J. Biotechnol.*, **1990**, 14, 3.
- (82) F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 214, 217.
- (83) E. Urbano, H. Offenbacher, O. S. Wolfbeis, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 427
- (84) T. C. Werner, J.G. Cummings, W.R. Seitz, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 211.
- (85) G. Gubitz, P. van Zoonen, C. Gooyer, N.H. Velthorst, R.W. Frei, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 2071.
- (86) A. Nabi, P.J. Worsfold, *Analyst*, **1986**, 11, 1321.
- (87) P.J. Worsfold, A. Nabi, *Anal. Chim. Acta*, **1986**, 179, 307.
- (88) K. Hool, T.A. Nieman, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 834.
- (89) P. Linares, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 230, 199.

-
- (90) K. Yoshimura, H.Waki, *Talanta*, **1985**, 32, 345.
- (91) K. Yoshimura, *Anal. Chem.* **1987**, 59, 2922.
- (92) B.F. Band, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 229, 177.
- (93) K. Yoshimura, *Analyst*, **1988**, 113, 471.
- (94) F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 219, 231.
- (95) D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Talanta*, **1990**, 37, 1049.
- (96) D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 234, 345.
- (97) N. Lacy, G.D. Christian, J. Ruzicka, *Anal. Chem.* **1990**, 62, 1482.
- (98) L. L. Hench and J.K. West, *Chemical Reviews*, **1990** Vol 90, N° 1.
- (99) J. Livage and C. Sanchez. *Journal of Non Crystalline Solids* , **1992**, 145, 11.
- (100) D. Avnir, D. Levy y R. Reisfeld, *J. Phys. Chem.*, **1984**, 88, 5956.
- (101).- D. Levy and D. Avnir *J. Phys Chem* **1988**, 92: 4734
- (102).- A. Slama-Schwork, D. Avnir y M. Ottolenghi, *Photochem. and Photobiology*, **1991**, 54, 525.
- (103) P. Johnson and T.L. Whateley, *Journal of Colloid and Interface Science*, **1971**, 37, N° 3, 557.
- (104) S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, y M. Ottolenghi, *Mater. Lett.*, **1990**, 10, 1
- (105) Y. Tatsu, K. Yamashita, M. Yamaguchi, S. Yamamura, H. Yamamoto y S. Yoshikawa, *Chem. Lett.*, **1992**, 1615.
- (106) Zusman R, C. Rottman, M. Ottolenghi, y D. Avnir, *J. Non-Cryst. Solids*, **1990**, 122, 107
- (107) E.T. Knobbe, B. Dunn y M. Gold, *SPIE Optical Fibers in Medicine(III)*, **1988**, 906, 39.

-
- (108) I. Kuselman, O. Lev., *Talanta*, **1993**, 40, 749.
- (109) B. E. Yoldas, *J. Non Cryst. Solids*, **1980**, 38-39, 81.
- (110) C.J.R. Gonzalez-Oliver, P.F. James y H. Rawson, *J. Non- Cryst. Solids*, **1982**, 48, 129.
- (111) M. Bacci, F. Baldini, A.M. Scgeggi, *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 207, 343.
- (112) M. Bacci, F. Baldini y S. Bracci, *App. Spec.*, **1991**, 8, 1508.
- (113) D. Levy y D. Avnir, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1991**, 57, 41.
- (114) G. Boisdé, B. Biatry, B. Magny, B. Dureault, F. Blanc, B. Sebille, *Proc. SPIE*, **1989**, 1172, 239.
- (115) K. P. Dasgupta, H.S. Bellamy y H. Liu, *Talanta*, **1993**, 40, 341.
- (116) B. MacCraith y D. Maxwell, *Proc. SPIE*, 1510 xxx, **1991**
- (117) A.N. Chester, S. Martellucci y A.M. Scheggi, *Optical Fiber Sensors*, Martinus Nijhoff, Dordrecht, **1987**.
- (118) G. Körtüm en *Reflection Spectrometry*, Springer Verlag, Berlin, **1969**.
- (119) P. Kubelka and F. Munk *Z. Tech. Phys.*, **1931**, 12, 593.
- (120) L.M. Hamadeh, S.A. Yeboah, K.A. Trumbull y P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.*, **1984**, 38, 486.
- (121) L.M. Hamadeh, Ph.D., Dissertation, Ohio University, Athens, OH, **1982**.
- (122) W.E. Neely , *Anal. Chem.*, **1984**, 56, 742.
- (123) F. Williams y F.R. Clapper, *J. Opt. Soc. Am.*, **1953**, 43, 595.
- (124) H.G. Hecht, *Appl. Spectrosc.* **1984**, 34, 16.
- (125) H. G. Hecht, *Anal. Chem.*, **1976**, 48, 1775.
- (126) H.G. Hecht, *Appl. Spectrosc.*, **1983**, 37, 348.
- (127) A.J. Guthrie, R. Narayanaswamy y D.A. Russell, *Analyst*, **1988**, 113, 457.

-
- (128) J. D. Miller y H. Ishida, *Surf. Sci.* **1984**, 148, 601.
- (129) A. Roos y C.G. Ribbing, *Phys. Lett.*, **1985**, A108, 225.
- (130) A. Roos, M. Bergkvist, y C.G. Ribbing, *Thin Solid Films*, **1985**, 125, 221.
- (131) J.N. Miller, *Pure & Appl. Chem.*, **1985**, 57, 515.
- (132) R. J. Hurtubise, *Solid Surface Luminescence Analysis*, Marcel Dekker, New York, **1981**.
- (133) J. Goldman, *J. Chromatogr.*, **1973**, 78, 7
- (134) V. Pollak, *Optica Acta*, **1974**, 21, 51.
- (135) C.A. Parker, *Photoluminescence of Solutions*, Elsevier, Amsterdam, **1968**.
- (136) G.H. Vickers, R. Miller y G.M. Hieftje, *Anal. Chim. Acta*, **1987**, 192, 145.
- (137) L. Stryer y R.P. Haugland, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1967**, 58, 719.
- (138) J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York **1983**.
- (139) D. M. Jordan, D.R. Walt and F.P. Milanovich, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 437.
- (140) P. Yvan y D.R. Walt, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 2391.
- (141) T.B. Hirschfeld, European Patent Appl. 214,768, **1987**.
- (142) A. Sharma y O.S. Wolfbeis, *Appl. Spectrosc.*, **1988**, 42, 1009.
- (143) A. Sharma y O.S. Wolfbeis, *Proc. SPIE*, **1989**, 990, 116
- (144) D. Meadows y J.S. Schultz, *Talanta*, **1988**, 35, 145.
- (145) L.M. Christian y W.R. Seitz, *Talanta*, **1988**, 35, 119.
- (146) T. Vo-Dhin, *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York **1984**.
- (147) R.J. Hurtubise *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications-Part II* S. J. Schulman (Ed Wiley New York **1988**. Chapt 1.

-
- (148) E.M. Schulman, R.T. Parker, *J. Phys. Chem*, **1977**, 81, 1932.
- (149) R.T. Parker, R.S. Freedlender y R.B. Dunlap, *Anal. Chim. Acta*, **1980**, 120, 1.
- (150) G.R. Ramos, M.C.G. Alvarez-Coque, A.M. O'Reilly I.M. Khasawneh and J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* **1988**, 60, 416.
- (151) M.M. Andino, C.G. de Lima y J.D. Winefordner, *Spectrochim. Acta, Part A* **1987**, 43, 427.
- (152) R.P. Bateh y J.D. Winefordner, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **1983**, 1, 113.
- (153) E.B. Asafu-Adjaye y S.Y. Su, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 539.
- (154) J.J. Vanelli y E. M. Schulman, *Anal. Chem.* **1984**, 56, 1033.
- (155) V.P. Senthilnathan y R.J. Hurtubise, *Anal. Chem.* **1985**, 57, 1227.
- (156) A.M. Alak y T. Vo-Dhin, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 596.
- (157) J.M. Bello y R.J. Hurtubise, *Anal. Chem.*, **1988**, 60, 1291.
- (158) L.J. Cline Love, M.L. Grayeski y R. Noroski, *Anal. Chim. Acta.* **1985**, 170, 3.
- (159) L.M. Cabalín, J.J. Laserna y A. Rupérez, *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 270, 239.
- (160) T. Vo-Dhin, *Environ. Sci. Technol.*, **1985**, 19, 997.
- (161) B.E. Jones, *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **1985**, 18, 770.
- (162) A.L. Armer, *Proc-SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1985**, 21.1.
- (163) G.S. Philip, *Symp. Pap.-Inst. Chem. Eng.* **1987**, 214, 17.
- (164) R. Kist, *NTG-Fachber*, **1986**, 93, 206.
- (165) V.J. Maggioli, *IEE Trans. Ind. Appl.* **1985**, 6, 1491.
- (166) G.G. Vurek, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1984** 494, 2.
- (167) T.J. Giallorenzi, J.A. Bucaro, A. Dandri, G.H. Sigel, J.H. Cole, C. Rasleigh y R.G. Priest, *I.E.E.E. J. Quantum. Electron.* **1982** 18, 625.

-
- (168) J.R. Jordan, *J. Phys. E: Sci. Instrum.* **1985** 18, 729.
- (169) D.W. Lübbers y Opitz N. *Sensors and Actuators.* **1983** 4, 641.
- (170) J.I. Peterson y G.G. Vurek. *Science.* **1984** 224, 123.
- (171) C.J. Nylander. *Phys. E: Sci. Instrum.* **1985** 18, 736.
- (172) A.M. Scheggi. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1984**, 514, 93.
- (173) S. Harada. Japanese Patents 8640543; 6140543, (1986).
- (174) W. Gaebler y G. Sehring. *Radiat. Risk Prot. Int. Cong.* 6th, **1984**, 3 1235.
- (175) P.G. Hale, y R.E. Jones. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.* **1986**, 630, 239.
- (176) S. Stueflotten, Christensen, S. Iversen, J.O. Hellvik, K. Almas, T. Wien y A. Graar, *Proc. SPIE*, **1984**, 514, 87.
- (177) M.C. Alarcon, H. Ito y H. Inaba, *Appl. Phys.*, **1987**, B43, 79.
- (178) H. Tai. H. Tanaka y T. Yoshino, *Opt. Lett.*, **1987**, 12, 437.
- (179) H. Inaba, K. Chan y H. Ito, *Proc. SPIE*, **1984**, 514, 211.
- (180) T. Kobayasi, M. Hirama y H. Inaba, *Appl. Opt.*, **1981**, 20, 3279. NO2
- (181) G. Mazé, Carin y M. Poulain, *Proc. SPIE*, **1985**, 576, 10. CO2
- (182) P. Groll y J. Römer, *Anal. Chim. Acta*, **1986**, 190, 265.
- (183) C. Gomy, M. Jouan y N.Q. Dao, *Anal. Chim. Acta*, **1988**, 215, 211.
- (184) O.S. Wolfbeis, Fiber optic sensors y bioprocess control, in *Sensors in Bioprocess Control*, J.V. Tworok y A.M. Yacynych Eds., Marcel Dekker, New York, **1990**.
- (185) Q.D. Nguyen y P. Plaza, *Analisis*, **1986**, 14, 119.
- (186) R.L. Levy, *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **1986**, 54, 321.
- (187) R.E. Schirmer, *Adv. Instrum.*, **1988**, 43, 831.
- (188) A.F. Parisi, L. Nogueiras y H. prieto, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 238, 95.

-
- (189) W.A. Chudyk, M.M. Carrabba y J.E. Kenny, *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 1237.
- (190).- J.I. Peterson, S.R. Goldstein, R.V. Fitzgerald and D.K. Buckhold, *Anal. Chem.* **1980**, 52, 864-869.
- (191) D.R. Markle, D.A. McGuire, S.R. Goldstein, R.E. Patterson, and R.M. Watsonen 1981 Adv. Bioeng., D.C. Viano (Ed., Am. Soc. Mech. Eng., New York **1981**, 123.
- (192) G.A. Tait., R.B. Young, G.J. Wilson, D.J. Steward, and D. MacGregor, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, , **1984**, 15, H232
- (193) G.F. Kirkbright, R. Narayanaswamy and N.A. Welti, *Analyst*, **1984**, 109, 12.
- (194) G.F. Kirkbright, R. Narayanaswamy and N.A. Welti, *Analyst*, **1984**, 109, 1025.
- (195) M.C. Moreno, A. Martínez, P. Millan, and C. Cámara, *J. Mol. Struct.*, **1985**, 143, 553.
- (196) M.C. Moreno, M. Jiménez, C. Pérez Conde y C. Cámara, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 230, 35.
- (197) L.A. Saari y W.R. Seitz, *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 821.
- (198) C. Munkholm, D.R. Walt, F.P. Milanovich y S.M. Klainer, *Anal. Chem.*, **1986**, 58, 1427.
- (199) Z. Zhujun, W.R. Seitz, *Anal. Chim. Acta.* **1984**, 160, 47-55.
- (200) R.W. Seitz y Z. Zhujum, U.S. Patent 108.531, **1984**.
- (201) D.M. Jordan, D.R. Walt y F.P. Milanovich, *Anal. Chem.*, **1987**, 59, 437.
- (202) G. Serra, A. Schirone and R. Boniforti, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 232, 337-344.
- (203) J.R. Lakowick *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 2355.
- (204) R.B. Thompson and J.R. Lakowick. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 853-856. Fluorescence Lifetime.
- (205) Kostov *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 219, 280
- (206) Ge *Anal. Chim. Acta*, **1993**, 219, 272.
- (207) J. Ruzicka y E. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, 173,3.

-
- (208).- B.A. Woods, J. Ruzicka, G.D. Christian N.J. Rose and R.J. Charlson, *Analyst*, **1988**, Vol 113, 301-306.
- (209) T. Werner and O.S. Wolfbeis, *Fresenius J. Anal. Chem.* **1993**, 346. 564-568.
- (210) O.S. Wolfbeis, N.V. Rodriguez and T. Werner, *Mikrochim. Acta*, **1992**, 108, 133-141.
- (211) T.J. Cardwell, R.W. Cattral, L.W. Deady, M. Dorkos, G.R. O'Connell, *Talanta*, **1993**, Vol 40 N° 5, 765-768. pH en flujo.
- (212) S. Kar and M.A. Arnold., *Talanta* **1993**Vol 40, N° 5, 757-760
- (213) M.A. Arnold an T.J. Ostler, *Anal. Chem.* **1986**, 58, 1137-1140.
- (214) T.D. Rhines and M.A. Arnold *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 231, 231-235
- (215) S. Kar and M.A. Arnold, *Anal. Chem.* **1992**, 64, 2438-2443
- (216) H. He, H. Li, G. Uray and O.S. Wolfbeis, *Talanta* **1993**, Vol. 40 N° 3, 453-457.
- (217) M.R.S. Fuh, L.W. Burgess, and G.D. Christian *Anal. Chem.* **1988**,60 433-435.
- (218) D. Callahan and D.S. Ballantine, *Talanta*, **1993**, Vol. 40 N° 3, 431-444.
- (219) Faraldos M.,Moreno M.C., Cámara C. *Analisis* **1988**,16, 87
- (220) U. Hase, K. Yoshimura, *Analyst* (London), **1992**, 117, 1501.
- (221) V.A. Elrod, K.S. Jhonson y K.H. Coale, *Anal. Chem.*, **1991**, 63, 893.
- (222) D. King, J. Lin, D. Kester, *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 247, 125.
- (223) S. Nigo, K. Yoshimura y T. Tarutani, *Talanta*, **1981**, 28, 669.
- (224) M.M.A Shriadah y K. Ohzeki, *Analyst*, **1986**, 11, 555.
- (225) T. Saito, *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 268, 351.
- (226) E. Kanebo, H. Tanno, T. Yotsuyanagi, *Mikrochim. Acta*, **1991**, 1(1-2) 37.
- (227) O. Lev, B.I. Kuyavskaya, I. Gigozin, M. Ottolenghi y D. Avnir, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1992**, 343, 370.

-
- (228) Saari L.A., Seitz W.R. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 667.
- (229) Zhujun Z., Seitz W.R. *Anal. Chim. Acta.* **1985**, 171, 251.
- (230) Wolfbeis O.S., Offenbacher H. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1984** 319, 282.
- (231) S. Z. Yao, X.M. Chen, L.H. Nie, *Mikrochim. Acta* , **1990**, 1(5-6), 299.
- (232) M.R. Pereiro, M.E. Díaz García y A. Sanz-Medel, *Analyst*, **1990**, 115, 575.
- (233) M.R. Pereiro, Tesis Doctoral Universidad de Oviedo, **1991**,.
- (234) Ditzler M.A., Doherty G., Sieber S., Allston R. *Anal. Chim. Acta.***1982**, 142, 305.
- (235).- L. Ljunggren, I. Aitrell, L. Risinger and G. Johansson. *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 256, 75-80.
- (236) B. Mohammad, A. Ure, D. Littlejohn, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7(4) 695.
- (237) Wolfbeis O.S., Schaffar B.P.H. Chalmers, R.A. *Talanta* **1986**, 33, 867.
- (238) A. Molina-Díaz, J.M. Herrador-Mariscal y M.I: Pascual-Reguera, *Talanta*, **1993**, 40, 1059..
- (239) Malat M., *Anal. Chim. Acta.* **1961**, 25, 289.
- (240) Langmyhr F.J., *Anal. Chim. Acta.* **1963**, 29, 149.
- (241) Bishop E., Indicators. Pergamon Press **1972**.
- (242) Kashkovskaia E. A., Mustafin I.S. *Zavodsk. Lab.* **1958**, 24, 1319
- (243) Pakalns P. *Anal. Chim. Acta.* **1965**, 32, 57.
- (244) Kennedy J.A., Powell H.K.J. *Anal. Chim. Acta* **1986**, 184, 329
- (245) Ohzeki K., Uno T., Nukatsuka I., Ishida R. *Analyst* **1988**, 113, 1545
- (246) J.B. Neilands, Microbial iron transport compounds (siderochromes) en *Inorganic Biochemistry*, vol I pp 167, G.L. Eichhorn, Elsevier Amsterdam, **1973**.

-
- (247) J.B. Neilands, *Metodology of Siderophores in Siderophores from Microorganisms and Plants*, Springer Verlag, New York **1984**
- (248) M.M. Shemyakin, Y.A. Ovchinnikov, V.T. Ivanov, y V.K. Antonov, *J. Membrane Bio.*, **1969**, 1, 402.
- (249) L. Hedenberg, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **1969**, 4, 595.
- (250) K.B. Pugh y J.S. Waid, *Soil Biol Chem. Biochem.*, **1969**, 1, 195.
- (251) S.B. Philson y M. LLinas, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257 (14), 8081.
- (252) S.B. Philson y M. LLinas, *J. Biol. Chem.*, **1982**, 257 (14), 8086
- (253) P. Demange, A. Bateman, J.K. MacLeod, A. Dell y M.A. Abdallah, *Tetrahedron Letters*, **1990**, 31, 7611.
- (254) J.M. Meyer y M.A. Abdallah, *J. of General Microbiology*, **1978**, 107, 319.
- (255) M.C. Moreno Bondi, Tesis Doctoral, Univ. Complutense **1990**.
- (256) F. Baldini, M. Bacci y S. Bracci, *Proc. SPIE. Int. Soc. Opt. Eng.*, **1990**, 10, 1.
- (257) S. Przeszlakowski y R. Kocjan, *Chromatographia*, **1982**, 11,
- (258) M.E. León-González, A. Townshed, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 236, 267.
- (259) G.F. Kirkbright, *Talanta*, **1965**, 16, 7.
- (260) G.F. Yan, G.R. Shi y Y.M. Li, *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 264, 121.