



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DISEÑO, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN
ANALÍTICA DE (BIO)SENSORES DE FIBRA
ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂, O₂
Y METABOLITOS DE INTERÉS CLÍNICO**

Directora:
Dra. María Cruz Moreno Bondi
Profesor Titular de la U.C.M.

MARIA DOLORES MARAZUELA LAMATA
Madrid, 1997



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

M^a CRUZ MORENO BONDI, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO
DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CC. QUÍMICAS.

HACE CONSTAR: Que el presente trabajo titulado "*Diseño, caracterización y aplicación analítica de (bio)sensores de fibra óptica para la determinación de CO₂, O₂ y metabolitos de interés clínico*", ha sido realizado en este departamento por Dña. María Dolores Marazuela Lamata, bajo mi dirección, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 9 de Diciembre 1996

*A mi madre, por su infinita paciencia y
por estar siempre tan pendiente de mí.*

A través de estas líneas, quisiera expresar mi más sincero reconocimiento y agradecimiento a todas aquellas personas, Instituciones u Organismos que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral. En especial a:

Mi directora de Tesis, la Dra M^o Cruz Moreno Bondi, por su constante apoyo, dedicación e interés, demostrados en el transcurso de todo el trabajo. A su lado, he tenido la oportunidad no sólo de aprender, sino también de disfrutar con el trabajo que hacía. Gracias por todo ello, y muy especialmente, por haber sido ante todo, una estupenda amiga.

Igualmente quiero agradecer al Prof. Dr. Guillermo Orellana Moraleda, quien ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de esta Tesis, siguiendo muy de cerca mi trabajo desde sus comienzos. Gracias por estar abí siempre que he necesitado ayuda y por todos esos consejos y sugerencias que han permitido la consecución de esta Tesis Doctoral.

A todos los que han sido mis compañeros del grupo de Investigación de Sensores de Fibra Óptica, porque gracias a su amistad y colaboración han hecho que el trabajo fuese mucho más fácil y agradable. Especialmente a Francisco Javier Mingoarranz, Beatriz Cuesta y David García, quienes colaboraron conmigo en distintas partes de la Tesis, así como a Pepa Barrero, Paula Pulido, Ana García Martínez, M^o Paz Xavier, Ana Isabel Sánchez y Maxi Bedoya con quienes he compartido laboratorio y muchas horas de trabajo. Este agradecimiento lo hago extensivo a todos mis compañeros del Departamento de Química Analítica, donde he encontrado buenos amigos y en particular, a la Dra. María Pedrero, por la revisión y corrección de esta Memoria.

Mi agradecimiento a la Universidad Complutense de Madrid por la concesión de una Beca de Investigación, así como, al organismo CICYT-Secretaría del Plan Nacional I+D (Proyectos PTR91-0036, HA-014, AMB92-0092-C03 y AMB95-0689-C02) por la financiación aportada.

Quiero agradecer al Prof. Marco Mascini y a su grupo de investigación, de la Università degli Studi de Florencia (Italia), por la amable acogida en su laboratorio y por enseñarme los sensores desde el punto de vista electroquímico. Al Dr. Francesco Baldini y a la Dra. Susanna Bracci por su simpatía y por brindarme todos los medios a su alcance para la realización de parte del trabajo. Muy especialmente, a mi gran amiga Nuria Vila, quien tanto me ayudó y animó durante mi estancia en Florencia y junto a la que viví momentos inolvidables. Agradezco, asimismo, a la European Science Foundation por la concesión de una Beca para la estancia en la Universidad de Florencia y por su financiación para la asistencia a dos Congresos Internacionales.

Todo mi agradecimiento a mi amiga Lourdes Pineda, por animarme y escucharme en mis momentos bajos y por apoyarme a tomar una decisión de la que nunca me he arrepentido.

Por último, a mis padres que han tenido que "soportar" mi estrés y mis nervios de estos últimos meses, por su sacrificios y esfuerzos, gracias a los cuales debo parte de lo que soy.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. OBJETO DEL TRABAJO | 3 |
| 1.2. DEFINICIÓN DE (BIO)SENSOR. CLASIFICACIÓN | 5 |
| 1.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS (BIO)SENSORES | 11 |
| 1.4. (BIO)SENSORES DE FIBRA ÓPTICA | 14 |
| 1.4.1. Ventajas e inconvenientes de los (bio)sensores de fibra óptica..... | 15 |
| 1.4.2. Clasificación de los (bio)sensores de fibra óptica..... | 18 |
| 1.4.3. Instrumentación..... | 22 |
| 1.4.3.1. Fuente luminosa..... | 23 |
| 1.4.3.2. Dispositivos ópticos..... | 24 |
| 1.4.3.3. Fibras ópticas..... | 25 |
| 1.4.3.4. Detectores..... | 28 |
| 1.4.4. Componentes del terminal sensible..... | 29 |
| 1.4.4.1. Clasificación de los terminales sensibles..... | 30 |
| 1.4.4.2. Indicadores. Empleo de complejos metálicos luminiscentes..... | 31 |
| 1.4.4.3. Enzimas como elementos de reconocimiento molecular..... | 33 |
| 1.4.4.4. Soportes poliméricos..... | 37 |
| 1.4.5. Técnicas de inmovilización del reactivo y/o biomolécula..... | 41 |
| 1.4.6. Características de la interacción de la fase reactiva con el analito..... | 45 |
| 1.4.7. Técnicas ópticas de medida..... | 49 |
| 1.4.7.1. Luminiscencia..... | 49 |
| 1.4.8. Características analíticas de los optodos..... | 53 |
| 1.4.9. Campos de aplicación de los (bio)sensores de fibra óptica..... | 56 |
| 1.4.10. Futuras tendencias en la construcción de (bio)sensores..... | 59 |
| 1.5. BIBLIOGRAFÍA | 60 |
| 2. PARTE EXPERIMENTAL | 65 |
| 2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y APARATOS GENERALES | 67 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1.1. Reactivos y materiales. | 67 |
| 2.1.1.1. Soportes para la inmovilización de reactivos. | 67 |
| 2.1.1.2 Indicadores..... | 67 |
| 2.1.1.3. Reactivos bioquímicos. | 67 |
| 2.1.1.4. Reactivos para la inmovilización..... | 68 |
| 2.1.1.5. Reactivos para disoluciones patrón..... | 68 |
| 2.1.1.6. Reactivos para la preparación de disoluciones reguladoras..... | 69 |
| 2.1.1.7. Gases..... | 69 |
| 2.1.1.8. Otros reactivos..... | 69 |
| 2.1.1.9. Material de análisis por inyección en flujo. | 70 |
| 2.1.1.10. Otros materiales. | 70 |
| 2.1.2. Aparatos generales..... | 70 |
| 2.2. DISPOSITIVOS DE MEDIDA | 72 |
| 2.2.1. Dispositivo para medidas de CO ₂ | 72 |
| 2.2.1.1. Medidas de intensidad de luminiscencia..... | 72 |
| 2.2.1.2. Medidas de luminiscencia con resolución temporal..... | 73 |
| 2.2.2. Dispositivo para medidas de O ₂ y de los biosensores con transducción de O ₂ | 73 |
| 2.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS (BIO)SENSORES | 75 |
| 2.3.1. Sensor de CO ₂ | 75 |
| 2.3.2. Sensor de O ₂ | 75 |
| 2.3.3. Biosensor de Colesterol. | 76 |
| 2.3.4. Biosensor de Colina/Fosfatidilcolina..... | 76 |
| 2.3.4.1. Inmovilización sobre carbón activo..... | 76 |
| 2.3.4.2. Inmovilización en membranas de inmunofinidad..... | 77 |
| 2.3.4.3. Inmovilización en membranas de nylon..... | 77 |
| 2.4. PROCEDIMIENTO OPERATORIO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS MEDIDAS | 78 |
| 2.4.1. Sensor de CO ₂ | 78 |
| 2.4.1.1. Medidas en fase gaseosa..... | 78 |

| | |
|---|-----------|
| 2.4.1.2. Medidas en disolución acuosa..... | 79 |
| 2.4.2. Sensor de O ₂ | 80 |
| 2.4.3. Biosensor de Colesterol..... | 80 |
| 2.4.4. Biosensor de Colina/Fosfatidilcolina..... | 81 |
| 2.5. BIBLIOGRAFÍA..... | 82 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 83 |
| 3.1. SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CO ₂ | 87 |
| 3.1.1. Interés analítico de la determinación de CO ₂ | 87 |
| 3.1.1.1. Interés medioambiental..... | 87 |
| 3.1.1.2. Interés clínico..... | 90 |
| 3.1.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de CO ₂ | 92 |
| 3.1.2.1. Métodos analíticos utilizados para la determinación de CO ₂ | 92 |
| 3.1.2.2. Sensores de fibra óptica..... | 93 |
| 3.1.3. Estudios previos a la construcción del sensor..... | 107 |
| 3.1.3.1. Caracterización de las propiedades espectroscópicas del indicador..... | 107 |
| 3.1.3.2. Evaluación del pK _a del estado excitado (pK _a *)..... | 117 |
| 3.1.3.3. Fundamento de la medida..... | 118 |
| 3.1.3.4. Elección de la disolución reguladora..... | 120 |
| 3.1.3.5. Efecto del CO ₂ disuelto sobre la respuesta del indicador. Modelado teórico..... | 124 |
| 3.1.4. Determinación de CO ₂ mediante un sensor basado en medidas de intensidad de luminiscencia..... | 133 |
| 3.1.4.1. Preparación de la fase sensora..... | 133 |
| 3.1.4.2. Características analíticas del sensor..... | 139 |
| 3.1.4.3. Reducción del tiempo de respuesta del sensor. Empleo de la enzima anhidrasa carbónica..... | 146 |
| 3.1.5. Determinación de CO ₂ mediante un optosensor basado en medidas de luminiscencia con resolución temporal..... | 152 |
| 3.1.5.1. Efecto cantidad de indicador inmovilizado..... | 153 |
| 3.1.5.2. Efecto de la temperatura..... | 153 |

| | |
|---|------------|
| 3.1.5.3. <i>Características analíticas</i> | 156 |
| 3.1.6. Aplicación analítica del sensor de CO ₂ a medidas en fase gaseosa..... | 159 |
| 3.1.7. Aplicación analítica del sensor de CO ₂ a medidas en disolución acuosa..... | 159 |
| 3.1.8. Bibliografía..... | 161 |
| 3.2. SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE O₂ | 167 |
| 3.2.1. Interés analítico de la determinación de O ₂ | 169 |
| 3.2.1.1. <i>Interés medioambiental</i> | 169 |
| 3.2.1.2. <i>Interés clínico</i> | 170 |
| 3.2.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de O ₂ | 171 |
| 3.2.2.1. <i>Métodos eléctricos</i> | 171 |
| 3.2.2.2. <i>Métodos volumétricos</i> | 173 |
| 3.2.2.3. <i>Métodos ópticos</i> | 173 |
| 3.2.2.4. <i>Sensores de fibra óptica</i> | 174 |
| 3.2.3. Determinación de O ₂ mediante un sensor basado en medidas de luminiscencia..... | 184 |
| 3.2.3.1. <i>Preparación de la fase sensora</i> | 184 |
| 3.2.4. Optimización del procedimiento de inmovilización en gel de sílice..... | 191 |
| 3.2.4.1. <i>Efecto de la cantidad de indicador inmovilizado</i> | 191 |
| 3.2.4.2. <i>Efecto de la cantidad de gel de sílice presente en la membrana</i> | 191 |
| 3.2.5. Características analíticas..... | 194 |
| 3.2.5.1. <i>Calibrado. Ecuación de ajuste</i> | 194 |
| 3.2.5.2. <i>Precisión y límite de detección</i> | 195 |
| 3.2.6. Aplicación analítica..... | 195 |
| 3.2.6.1. <i>Determinación de O₂ en un proceso de fermentación aerobia</i> | 195 |
| 3.2.6.2. <i>Monitorización del nivel de O₂ disuelto en el proceso de tratamiento biológico de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR)</i> | 200 |
| 3.2.7. Bibliografía..... | 205 |

| | |
|--|-----|
| 3.3. BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE. | 209 |
| 3.3.1. Papel biológico e importancia clínica del colesterol. | 211 |
| 3.3.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de colesterol. | 214 |
| 3.3.2.1. <i>Métodos analíticos químicos y enzimáticos para la determinación de colesterol.</i> | 214 |
| 3.3.2.2. <i>Biosensores.</i> | 218 |
| 3.3.3. Preparación de la fase sensora. | 226 |
| 3.3.3.1. <i>Elemento biológico: colesterol oxidasa.</i> | 226 |
| 3.3.3.2. <i>Soporte enzimático. Acoplamiento al transductor de oxígeno</i> | 227 |
| 3.3.4. Optimización de las condiciones experimentales de medida del sistema de inyección en flujo. | 230 |
| 3.3.4.1. <i>Estudio del efecto del caudal y del volumen de inyección.</i> | 230 |
| 3.3.5. Estudio de la influencia de la disolución portadora en la respuesta del biosensor. | 231 |
| 3.3.5.1. <i>Estudios preliminares.</i> | 231 |
| 3.3.5.2. <i>Selección del medio idóneo para las determinaciones. Optimización mediante la aplicación del método SIMPLEX.</i> | 234 |
| 3.3.6. Características analíticas. | 237 |
| 3.3.6.1. <i>Calibrado e intervalo de linealidad.</i> | 234 |
| 3.3.6.2. <i>Precisión y límite de detección.</i> | 238 |
| 3.3.6.3. <i>Estudio de interferencias.</i> | 239 |
| 3.3.6.4. <i>Estabilidad operacional.</i> | 240 |
| 3.3.7. Aplicación analítica. | 241 |
| 3.3.8. Bibliografía. | 243 |
| | |
| 3.4. BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLINA y/o FOSFATIDILCOLINA. | 247 |
| 3.4.1. Interés analítico de la determinación de fosfolípidos que contienen colina. | 249 |
| 3.4.1.1. <i>Interés clínico.</i> | 249 |
| 3.4.1.2. <i>Interés alimentario.</i> | 251 |
| 3.4.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de fosfolípidos que contienen colina. | 251 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.2.1. Métodos analíticos químicos y enzimáticos..... | 251 |
| 3.4.2.2. Sensores de fibra óptica o sensores electroquímicos..... | 253 |
| 3.4.3. Preparación de la fase sensora. | 253 |
| 3.4.3.1. Elemento biológico: colina oxidasa y fosfolipasa-D. | 253 |
| 3.4.3.2. Inmovilización enzimática y acoplamiento al sensor de O ₂ | 254 |
| 3.4.3.3. Optimización de la cantidad de enzima inmovilizada..... | 259 |
| 3.4.4. Determinación de Colina mediante el empleo del biosensor. | 260 |
| 3.4.4.1. Estudio del efecto del caudal y del volumen de inyección..... | 260 |
| 3.4.4.2. Estudio de la influencia de la disolución portadora en la respuesta del biosensor..... | 261 |
| 3.4.4.3. Influencia de la temperatura..... | 263 |
| 3.4.4.4. Características analíticas..... | 263 |
| 3.4.4.5. Estabilidad operacional. | 267 |
| 3.4.5. Determinación de Fosfatidilcolina mediante el empleo del biosensor..... | 268 |
| 3.4.5.1. Influencia de la composición del medio de reacción..... | 268 |
| 3.4.5.2. Efecto del tiempo de incubación..... | 270 |
| 3.4.5.3. Características analíticas..... | 271 |
| 3.4.6. Aplicación analítica. | 273 |
| 3.4.7. Bibliografía..... | 275 |
| | |
| 4. CONCLUSIONES..... | 277 |
| | |
| 5. PUBLICACIONES..... | 283 |

I. INTRODUCCIÓN.

1.1. OBJETO DEL TRABAJO.

Uno de los objetivos principales de la Química Analítica actual, se centra en la resolución de problemas analíticos derivados de exigencias económicas y sociales. Todo ello supone obtener una información química de calidad, fiable y completa acerca de un sistema de interés, utilizando para ello, todos los medios materiales y humanos disponibles.

En la actualidad, una de las áreas prioritarias de investigación dentro de la Química Analítica se dirige al desarrollo de (bio)sensores capaces de monitorizar, de forma *continua*, *"in situ"* y/o *"in vivo"*, la concentración de diversos analitos de interés, a nivel industrial, clínico, medioambiental, etc. En este sentido, el empleo de la fibra óptica con sus peculiares características (posibilidad de medidas *"in situ"*, a *largas distancias* o en *ambientes peligrosos*, posibilidad de *miniaturización*, etc...) junto con elementos que aportan una elevada selectividad química, como es el caso de las biomoléculas, ha abierto un nuevo campo de investigación con un futuro muy prometedor.

El objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo, caracterización analítica y posterior aplicación de nuevos (bio)sensores químicos de fibra óptica, basados en el empleo de complejos metálicos luminiscentes de Ru(II) para la determinación de distintos analitos: CO₂, O₂, colesterol y colina/fosfatidilcolina. Estas especies presentan un gran interés en diversas áreas de la Química como la Química medioambiental, clínica, alimentaria y control de procesos industriales, entre otras.

La obtención de estos dispositivos requiere, sin embargo, la colaboración de expertos en distintas áreas de la Química: Química Analítica, Química Orgánica, Química Inorgánica y Química Física, entre otras, que aportan sus conocimientos para resolver los problemas que surgen en las distintas etapas del desarrollo de un (bio)sensor. Por todo ello, el trabajo presentado en esta Memoria tiene un carácter multidisciplinar y ha sido el resultado de la colaboración, durante los últimos años, de grupos de investigación pertenecientes a distintas ramas de la Química.

Los distintos aspectos tratados en el desarrollo de la presente Memoria pueden resumirse en los puntos indicados a continuación:

1. **Obtención de las fases sensibles** más adecuadas para cada analito. Incluye en primer lugar, la selección del indicador y/o biomolécula más apropiados; a continuación, la elección del soporte y/o membrana (en su caso) compatibles con el mismo, y por último la optimización del proceso de inmovilización.

2. **Caracterización analítica** de los sistemas desarrollados. Comprende los estudios sobre el comportamiento del reactivo inmovilizado, la reversibilidad del sistema, la optimización de todas aquellas variables experimentales que afectan a la respuesta del dispositivo y la evaluación de su potencial analítico.

3. Por último, la **aplicación** de los (bio)sensores, desarrollados y caracterizados en las etapas anteriores, a la cuantificación de los distintos analitos en muestras gaseosas, aguas minerales, procesos de fermentación aerobia y de depuración de aguas residuales o muestras biológicas.

1.2. DEFINICIÓN DE (BIO)SENSOR. CLASIFICACIÓN.

Durante la última década se han producido notables avances en lo que respecta a las tecnologías que soportan el desarrollo de nuevos procedimientos de análisis. En este sentido, la capacidad catalítica y de reconocimiento de los sistemas biológicos y químicos acoplada con transductores de tipo electroquímico u óptico ha dado lugar al desarrollo de una nueva rama de la Química Analítica: los (BIO)SENSORES.

Esta nueva tecnología atraviesa las fronteras de las disciplinas tradicionales y probablemente ejercerá una profunda influencia sobre la forma en la que los procedimientos analíticos se lleven a cabo en el futuro.

Definir el término (bio)sensor no es una tarea fácil y, por otra parte, no existe actualmente una definición aceptada por toda la comunidad científica para este concepto por lo que en muchas ocasiones, este término se utiliza de forma inadecuada.

Valcárcel y col. (Valcárcel et al., 1993; Valcárcel et al., 1994) proponen dos definiciones complementarias de (bio)sensor de acuerdo a su forma de *operación* y/o su *estructura*.

Así, en una primera acepción, se puede definir un (bio)sensor como un dispositivo analítico (no un instrumento ni un aparato) que responde de forma *directa, reversible, continua, rápida, exacta, en tiempo real, e "in situ"* a los cambios en la concentración (actividad) de especies químicas o biológicas (véase Figura 1).

En segundo lugar, basándose en su *estructura*, se puede definir un (bio)sensor como un dispositivo analítico que consta básicamente de dos partes:

a) Una "*fase sensible*" (elemento de reconocimiento) capaz de interactuar selectivamente con la especie de interés, con el resultado de un cambio físico o químico del sistema cuya intensidad estará relacionada con la concentración de la especie a analizar.

b) Un "*transductor*" de tipo *óptico, eléctrico, térmico, másico, acústico o magnético*, el cual transforma la interacción (bio)química en una señal analítica susceptible de ser medida.

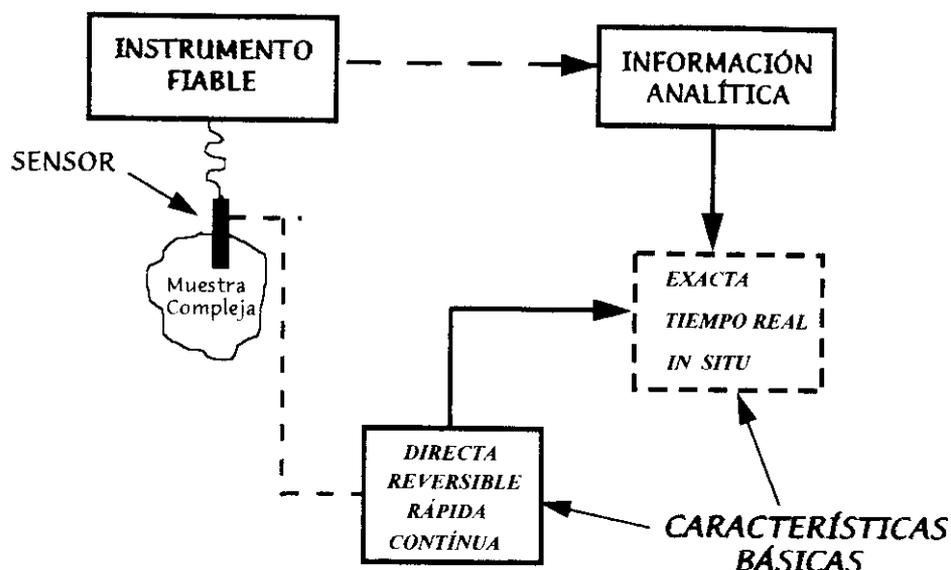


FIGURA 1. Características del (bio)sensor ideal (Valcárcel et al., 1994).

Las dos definiciones indicadas anteriormente pueden servir de base para establecer las características técnicas y operativas de un (bio)sensor ideal. Sin embargo, el término (bio)sensor se aplica en la práctica a dispositivos que no cumplen todos los requisitos mencionados anteriormente, aunque sí comparten ciertas características comunes:

- Se trata de dispositivos, más que de instrumentos.
- Son de pequeño tamaño e incluso pueden llegar a ser portátiles.
- Integran la separación y/o reacción (bio)química, con la detección.
- Se encuentran en contacto directo con la muestra.

Así, algunos dispositivos que no operan de forma completamente reversible o continua son considerados como (bio)sensores. De igual forma, muchos de los (bio)sensores descritos en la bibliografía carecen de la sensibilidad, selectividad y precisión requerida para asegurar buenos resultados, por lo que, en este caso, la respuesta en tiempo real y/o "in situ" carece de valor. Por ello, las dos definiciones de (bio)sensor citadas anteriormente han de ser consideradas en términos ideales.

El gran número y variedad de (bio)sensores desarrollados hasta la fecha, hace necesario establecer clasificaciones de acuerdo a diferentes criterios que en muchos

casos son complementarios y flexibles. En nuestro caso, nos limitaremos a describir los (bio)sensores químicos.

Valcárcel y col. (Valcárcel et al., 1994) clasifican los (bio)sensores químicos según el *parámetro de medida* (químico o bioquímico); la *existencia o no de un proceso (bio)químico* (activo o pasivo); la *inclusión o no de un proceso de separación* adicional; el *tipo de transductor* empleado (óptico, eléctrico, térmico, másico u otros); la *relación entre la "fase sensible" y el transductor* (conectado o integrado); el *tipo de interacción con el analito* (reversible, irreversible, desechable, regenerable); su *forma externa o configuración* (planar, sonda o células de flujo); el *modo de operación* (discontinuo o continuo); y finalmente, según el *número de especies detectadas* (uniparamétrico o multiparamétrico; individual o integrado), (véase Figura 2).

Una primera clasificación general de los (bio)sensores químicos puede hacerse atendiendo a la *naturaleza química o bioquímica* del analito (y ocasionalmente de la muestra). Esto estaría en aparente contradicción con otra clasificación basada en la naturaleza del elemento de reconocimiento. Así, un sensor que emplea una enzima inmovilizada para determinar un analito de interés biológico (e.g. glucosa) puede ser considerado un biosensor. Por otra parte, si se utiliza un ligando cromogénico para determinar un ión metálico hablaríamos de sensor químico. Sin embargo, se puede utilizar el término sensor químico o biosensor indistintamente para referirnos a aquél dispositivo que incorpora materiales biológicos para analizar un sustrato químico (o un inhibidor en una muestra biológica).

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

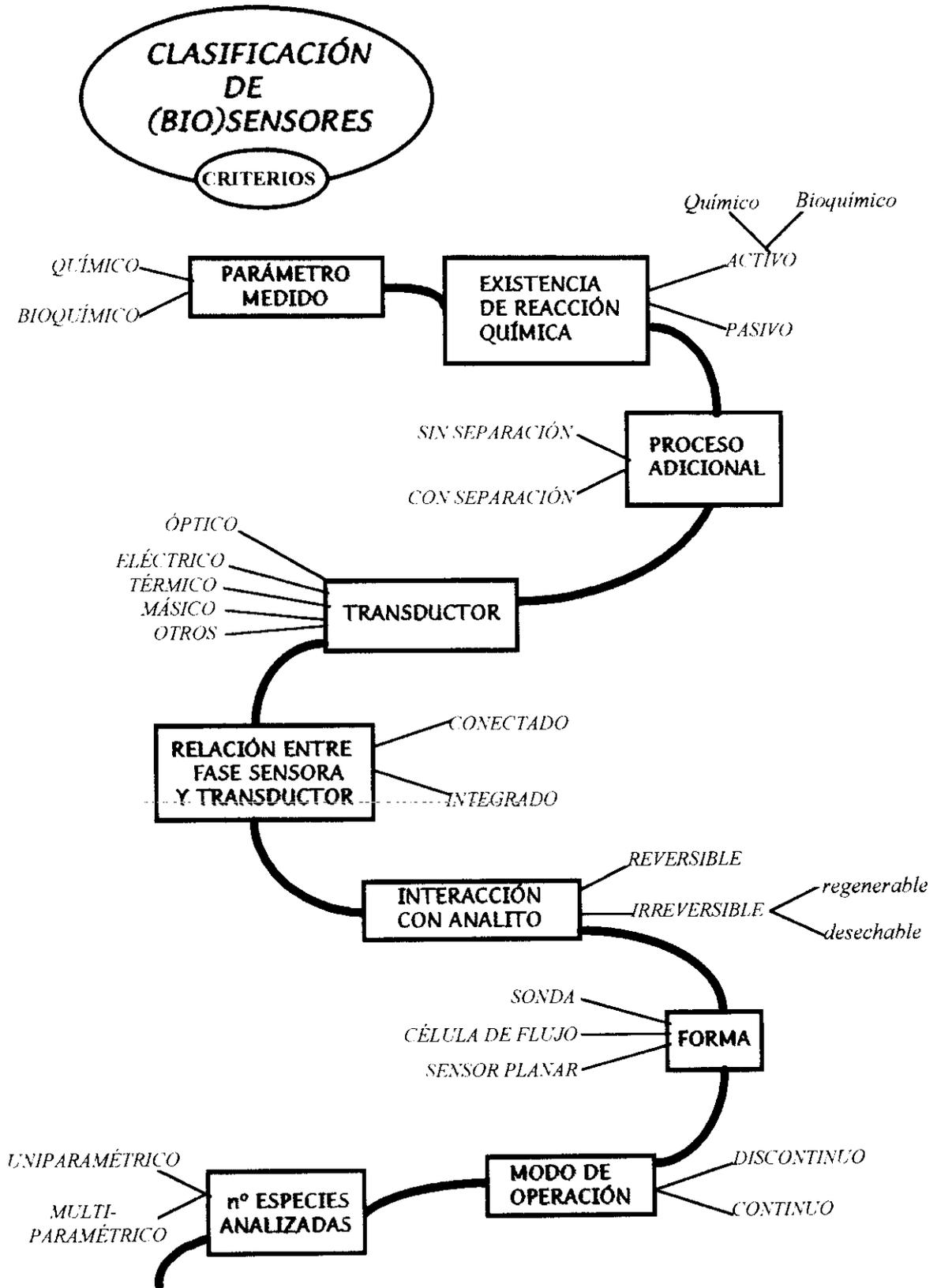


FIGURA 2. Clasificación, basada en distintos criterios de los (bio)sensores químicos. (Valcárcel et al., 1994).

Algunos (bio)sensores incluyen un proceso de separación previo a la reacción (bio)química y la detección. Habitualmente, se trata de un proceso de adsorción y detección simultánea o, alternativamente, procesos de difusión de gases, diálisis o extracción líquido-líquido en presencia o ausencia de una reacción (bio)química.

Una de las clasificaciones de (bio)sensores más intuitivas es la que se hace de acuerdo al tipo de transductor empleado para detectar los cambios físico-químicos que tienen lugar en presencia del analito. La Figura 3 muestra los tipos principales de sistemas de transducción empleados en la construcción de (bio)sensores.

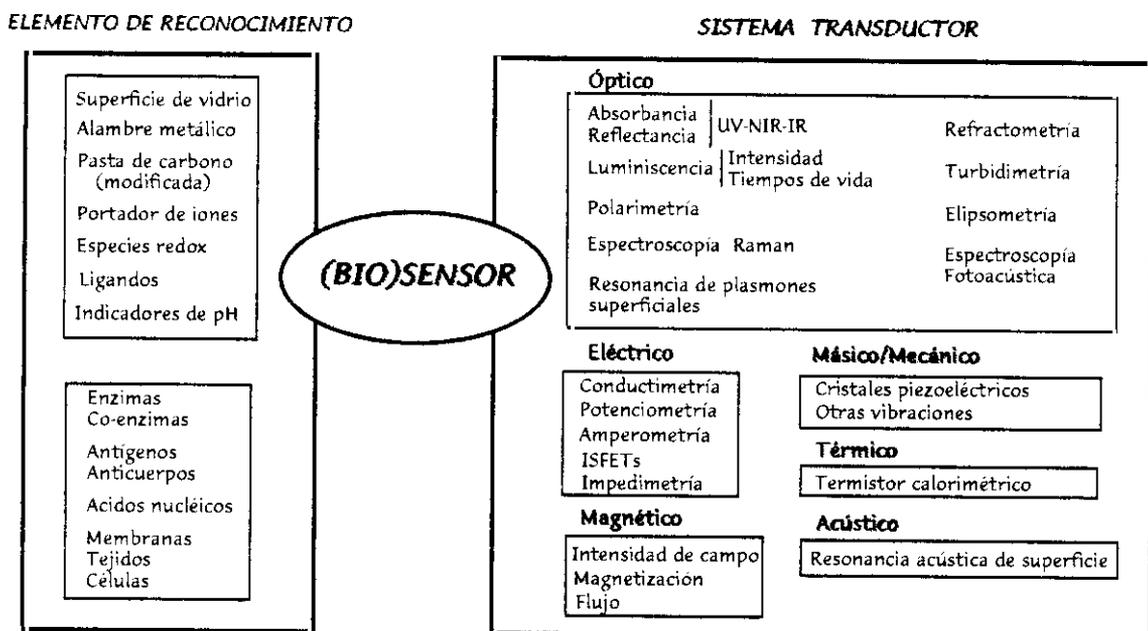


FIGURA 3. Elementos de un (bio)sensor (Valcárcel et al., 1994).

Otra clasificación de los (bio)sensores establece dos categorías en función de la forma de acoplamiento del elemento de reconocimiento y el transductor. Estos dos elementos esenciales pueden estar *conectados ópticamente* (e.g. mediante el empleo de una fibra óptica) o *eléctricamente*; o bien el transductor (detector) y la “fase sensible” pueden estar *integrados* en un único elemento.

En función del tipo de interacción con el analito, los (bio)sensores se pueden clasificar en:

- reversibles, cuando la fase reactiva no se consume durante su interacción con el analito. Este tipo de (bio)sensores responden tanto a altas como a bajas concentraciones de analito y proporcionan una respuesta nula en ausencia del mismo;

- irreversibles, cuando existe consumo de la fase reactiva. A su vez, se pueden subdividir en regenerables y no regenerables. Los primeros son aquéllos que dan lugar a una respuesta similar a la de un sensor reversible, pero con la diferencia de que no operan de forma continua, ya que requieren una etapa de regeneración para poder ser utilizados de nuevo. En el caso de los (bio)sensores irreversibles no regenerables, también denominados “*sondas*” por algunos autores (Wolfbeis, 1990) para diferenciarlos de los auténticos sensores, sólo responden a incrementos en la concentración del analito saturándose con facilidad, por lo que se suelen emplear para una única medida.

De acuerdo a la apariencia externa o configuración del (bio)sensor y a la forma como la fase sensible entra en contacto con la muestra podemos distinguir entre: (bio)sensores tipo sonda, (bio)sensores planares y (bio)sensores tipo “*célula de flujo*” (véase Figura 4). En el primer caso, la fase reactiva está localizada en el extremo del terminal sensible (electrodo o fibra óptica), que a su vez se encuentra en contacto directo con la muestra. En el caso de los (bio)sensores planares, el elemento sensor está localizado sobre una superficie plana sobre la que se depositan unas gotas de la muestra. Se trata en realidad de (bio)sensores desechables y un ejemplo típico es el biosensor comercial Medisense Exactech® utilizado por pacientes diabéticos para la monitorización del nivel de glucosa en sangre. Finalmente, en los (bio)sensores tipo *célula de flujo*, la muestra es aspirada (o inyectada) y transferida a una célula de flujo donde se sitúa la fase sensible. Su principal característica es que la fase sensora se dispone en el sistema de detección, es decir, los procesos de reacción y detección son simultáneos.

En cuanto al modo de operación, los (bio)sensores químicos pueden trabajar en modo discontinuo o discreto y en modo continuo. Mientras que los (bio)sensores tipo sonda pueden ser utilizados tanto en modo continuo como en modo discontinuo, los (bio)sensores tipo célula de flujo sólo pueden operar en régimen continuo.

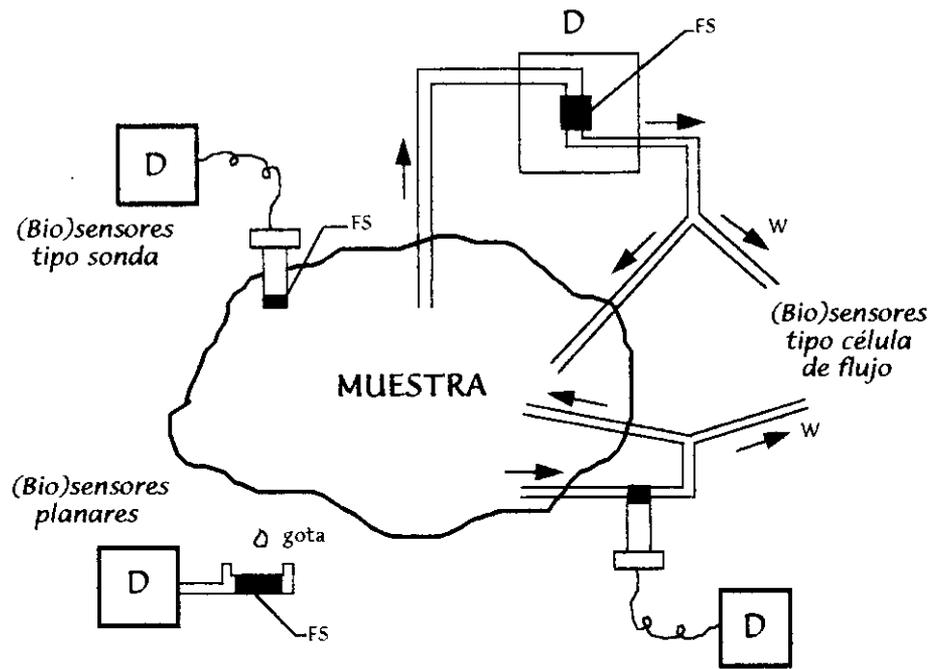


FIGURA 4. Clasificación de los (bio)sensores de acuerdo a su forma. FS, fase sensible; D, detector; W, desecho, (Valcárcel et al., 1994).

Finalmente, los (bio)sensores químicos pueden clasificarse de acuerdo al número de analitos que son capaces de determinar en una misma muestra. Así, la mayoría de los (bio)sensores responden a la concentración de una única especie (uniparamétricos), mientras que existen algunos capaces de determinar simultáneamente varios analitos (multiparamétricos). Entre éstos últimos podemos distinguir dos tipos: (a) aquéllos que incorporan un elemento de reconocimiento por cada analito en la misma “fase sensible”; (b) aquéllos que hacen uso de un único elemento de reconocimiento conectado o integrado a un transductor capaz de realizar análisis multielemental.

1.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS (BIO)SENSORES.

Los (bio)sensores han de reunir una serie de características o propiedades, esenciales unas y “deseables” otras, con objeto de asegurar las exigencias actuales en cuanto a la calidad de los resultados analíticos obtenidos (Valcárcel et al., 1994).

Algunas de ellas coinciden con *características analíticas básicas* (exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad), mientras que otras están relacionadas con la naturaleza de la *interacción con el analito* (reversibilidad), o con la posibilidad de resolver *problemas analíticos reales* (robustez, bajo coste, compatibilidad con sistemas automáticos y automatizados, entre otras) (Wolfbeis, 1990) (Figura 5).

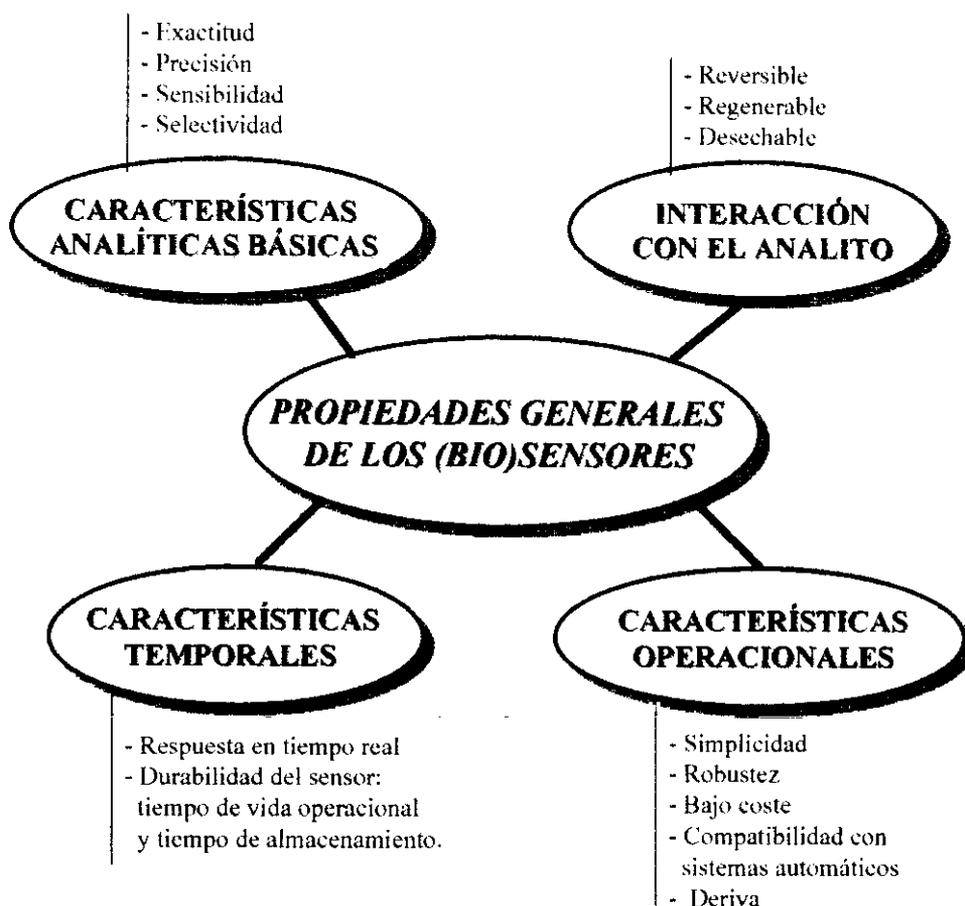


FIGURA 5. Propiedades esenciales y deseables de un (bio)sensor.

A continuación, se describe con más detalle alguna de ellas:

1. **Sensibilidad aceptable y bajos límites de detección** son requisitos fundamentales de cualquier procedimiento analítico, si bien debería tenerse en cuenta el contexto del problema analítico concreto.

2. **Selectividad para el analito**, es otro de los requisitos tradicionales. La mayoría de los (bio) sensores descritos en la bibliografía e incluso aquéllos que ya han sido comercializados, son instrumentos destinados a su aplicación en el análisis de una

matriz concreta. En estas circunstancias, las exigencias de selectividad no son tan estrictas como en el caso de otros procedimientos analíticos cuya aplicación es más general.

3. El intervalo dinámico del (bio)sensor debería incluir los valores de interés para el analito, con la suficiente sensibilidad y precisión incluso en los extremos del calibrado.

4. La reversibilidad del (bio)sensor es esencial para la monitorización en continuo del analito, sin necesidad de recalibrar el instrumento. Idealmente, un sensor debería ser completamente reversible o, en su defecto, fácilmente regenerable con el fin de poder ser reutilizado. En el caso de no ser regenerable, sólo tendría interés si sus características (precio, portatibilidad, capacidad para resolver un problema analítico complejo) compensan los gastos derivados de usar un nuevo (bio)sensor tras cada medida.

5. Otra característica “deseable” de los (bio)sensores es su capacidad para trabajar en ambientes hostiles o “peligrosos”, como es el caso de las plantas nucleares, donde existen elevados niveles de radiactividad.

6. Respuesta rápida significa menos de 1 minuto, idealmente unos pocos segundos, lo cual no siempre es factible. Sin embargo, es aquí donde los (bio)sensores superan a otras técnicas analíticas, ya que son capaces de realizar *análisis en tiempo real* de muestras complejas con el mínimo pretratamiento de la misma.

7. La durabilidad del sensor puede expresarse en función del *tiempo de vida operacional*, es decir, el intervalo de tiempo que funciona el sensor en una matriz determinada sin perder ninguna de sus prestaciones; o bien, del *tiempo de almacenamiento*, que será el tiempo máximo que puede transcurrir entre la fabricación del sensor y el momento de su utilización, pasado el cual el sensor no trabaja correctamente.

8. Su pequeño tamaño, ofrece la posibilidad de desarrollar dispositivos portátiles para medidas en campo, utilizando una simple batería como fuente de alimentación.

9. El sensor no debe presentar deriva, entendiendo por tal la desviación de la señal a partir de un valor inicial, aunque el analito que origina dicha variación se

mantenga a concentración constante. Este factor introduce *errores sistemáticos* que pueden ser propios del método o bien causados por artefactos del terminal sensible. Generalmente, las derivas quedan comprendidas dentro de un cierto intervalo aunque si tienen su origen en el *envejecimiento* del sensor suelen ser irreversibles y tardan en descubrirse.

10. Estos dispositivos analíticos deben ser sencillos, en cuanto a su construcción y forma de operación y robustos, entendiendo por “robustez” el hecho de que pequeñas variaciones de las condiciones experimentales (pH, temperatura, fuerza iónica, presión) no alteren la respuesta del (bio)sensor. La robustez condiciona en parte la durabilidad del sensor.

11. El bajo coste de los (bio)sensores es un requisito impuesto por consideraciones de mercado, particularmente en el caso de los (bio)sensores desechables.

12. Otra característica deseable es la compatibilidad de los (bio)sensores con sistemas analíticos automáticos o automatizados que permitan reducir la manipulación de la muestra, aumentar la frecuencia del análisis, reducir el coste del mismo y que permitan su manipulación por personal no especializado.

1.4. (BIO)SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.

La revolución experimentada por las fibras ópticas en el campo de las Telecomunicaciones, así como las ventajas que aporta el empleo de las mismas, ha dado lugar a un notable auge en el desarrollo de los (bio)sensores de fibra óptica. Éstos pueden considerarse una subclase dentro de los sensores químicos.

Un (bio)sensor de fibra óptica es un dispositivo formado básicamente por una “fase sensible” situada en el terminal sensible (que puede ser la propia fibra y estar provisto o no de un indicador óptico). La interacción de dicha capa sensible con el analito origina una variación de las propiedades ópticas (*absorbancia, reflectancia, luminiscencia...*) del reactivo inmovilizado y la *guía de luz* se encarga de transmitir la radiación electromagnética modificada hasta un detector.

Los sensores de fibra óptica han recibido la denominación de “optodos” (Boisdé, 1990) del griego “οπτιχος”: óptico y “οδος”: camino u “optrodos” de “optical

electrode”; sin embargo el término optodo es más correcto desde el punto de vista lingüístico, por ello es el que se utilizará a lo largo de esta memoria. Otra abreviatura que también se utiliza FOCS (“*fiber optic chemical sensor*”). Obviamente, en lo que se refiere a su principio de operación, son bastante diferentes de los electrodos, puesto que la señal es óptica y no eléctrica, ofreciendo nuevas posibilidades sobre éstos últimos.

1.4.1. VENTAJAS E INCONVENIENTES DE LOS (BIO)SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.

Las principales ventajas que presentan los (bio)sensores de fibra óptica frente a otro tipo de sensores son las siguientes (Seitz, 1984; Norris, 1989; Wolfbeis, 1991; Cámara et al., 1991):

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

2. Se trata de dispositivos pasivos formados por materiales dieléctricos, inertes químicamente en su mayoría, lo cual les confiere pasividad eléctrica y química. Se pueden emplear por tanto en ambientes hostiles, corrosivos, radiactivos, con riesgo de explosión, etc...

3. Al ser la fibra óptica un *medio dieléctrico*, los (bio)sensores de fibra óptica no se ven afectados por interferencias electromagnéticas, pudiendo utilizarse en medios altamente contaminados desde el punto de vista electromagnético, al contrario que los sensores eléctricos convencionales, muy sensibles a las mismas. En aplicaciones clínicas no representan un riesgo para el paciente ya que no se requiere una conexión eléctrica con el cuerpo, siendo especialmente útiles en radioterapia debido a su inmunidad a los campos electromagnéticos.

4. La biocompatibilidad de la fibra óptica, la facilidad de realizar interfaces sencillas entre el sensor y la zona de medida facilita su empleo para la detección, medida y, a veces, actuación de/sobre variables biomédicas .

5. Las pequeñas dimensiones de las fibras ópticas (con diámetros típicos comprendidos entre 50 - 200 μm) y la disponibilidad de componentes de pequeño tamaño y bajo coste permiten la miniaturización de estos dispositivos, lo cual resulta

de gran utilidad si se pretende diseñar *catéteres* con fines clínicos. El empleo masivo en un futuro próximo de conceptos y *tecnología óptica integrada* permitirá un indudable avance a este respecto.

6. Las fibras ópticas de bajas pérdidas permiten la transmisión de señales a largas distancias típicamente 10-1000 m, e incluso kilómetros si se utilizan amplificadores. Esto permite realizar análisis "in situ" en ambientes peligrosos como *áreas radiactivas, entornos muy fríos o calientes y salas limpias*, entre otros. Además, su empleo permite mayor flexibilidad espacial a la hora de utilizar otros instrumentos.

7. Se pueden llevar a cabo análisis en tiempo real, ya que la primera etapa del proceso analítico, el muestreo, no es necesaria.

8. Existe la posibilidad de realizar análisis **multielementales**, bien utilizando distintos sensores de fibra óptica conectados a una única unidad central, o bien, efectuando un **sensado distribuido** de un analito en distintas zonas (e.g. en edificios, aeronaves, etc).

9. Permiten realizar análisis **no destructivos** (ya que en la mayoría de los casos no se produce un consumo del analito), lo cuál resulta crucial si se dispone de pequeñas cantidades de muestra.

10. Se puede disponer de sensores ópticos que responden a ciertos analitos para los que se carece de electrodos.

11. Las fibras ópticas son capaces de transmitir **mayor densidad de información** que los cables eléctricos, al poseer un ancho de banda más grande. Esto es debido a que las señales ópticas pueden diferir en cuanto a longitud de onda, fase, modulación de intensidad o polarización. Como resultado, una única fibra óptica puede, en principio, transmitir simultáneamente varias señales, permitiendo por ello el análisis de varios analitos a la vez.

12. Sus prestaciones de **sensibilidad, intervalo dinámico, resolución...**, son en general superiores a las de los sensores convencionales, especialmente los interferométricos. Las prestaciones actuales están más limitadas por la ingeniería que por el fundamento de medida, siendo en principio comparables a los sensores convencionales.

13. La dependencia frente a la temperatura de las fibras ópticas es mucho menor que la de los electrodos. En algunos casos es incluso irrelevante; si se emplean fibras de elevado punto de fusión, se puede aumentar el intervalo de temperaturas sin modificar prácticamente las prestaciones del sensor.

No obstante, los (bio)sensores de fibra óptica también presentan ciertas limitaciones (Seitz, 1984; Norris, 1989; Wolfbeis, 1991; Cámara et al., 1991):

1. La posibilidad de capturar y reflejar, enmascaradamente, variables ajenas a la deseada, objeto de medida, aunque este inconveniente también puede presentarse en los sensores tradicionales.

2. La estabilidad limitada de los reactivos o biomoléculas inmovilizados a largo plazo. Este problema se puede compensar, en cierta manera, realizando la *detección a distintas longitudes de onda*, utilizando sensores basados en *tiempos de vida*, o bien simplemente reemplazando la fase reactiva. En el caso de las enzimas el problema de la pérdida de actividad es más difícil de resolver, pero una alternativa puede ser la búsqueda de *procedimientos de inmovilización* que permitan aumentar el tiempo de vida útil de la misma.

3. Los tiempos de respuesta elevados en algunos casos ya que, al encontrarse indicador y analito en diferentes fases, es necesaria una etapa de *transferencia de masa* antes de alcanzar el equilibrio y, en consecuencia, hasta que se obtiene una respuesta constante. Este problema se *minimiza* si se emplean pequeñas fases reactivas. Por otra parte, en algunos casos, la transferencia de masa puede resultar en un incremento de la *sensibilidad y la selectividad*.

4. Los sensores ópticos de pH o que utilizan reactivos quelatantes, exhiben generalmente *intervalos dinámicos limitados* en comparación con los de los electrodos.

5. Se precisan *indicadores más selectivos y procesos de inmovilización más reproducibles* que permitan aumentar la *sensibilidad y estabilidad* a largo plazo de las sondas.

6. Las fibras ópticas disponibles en la actualidad, contienen *impurezas de naturaleza espectral* que pueden originar una absorción, fluorescencia o dispersión

Raman de fondo. El material de la fibra óptica determina el intervalo útil de longitudes de onda. Así, por ejemplo, las fibras ópticas de plástico son útiles en la región comprendida entre 420 - 800 nm, mientras que las fibras ópticas de cuarzo son adecuadas para transmitir radiación UV y las de vidrio para medidas en el visible.

7. La escasez de accesorios ópticos comerciales es otro inconveniente. Se precisan fuentes luminosas estables y de larga vida, mejores conectores, fibras ópticas, láseres baratos y, sobre todo LEDs ("light emitting diodes") y láseres semiconductores para la región del visible. Sin embargo, en el aspecto económico, se están haciendo grandes avances en el terreno de la rentabilidad de la fibra óptica, revelándose como el sistema más rentable por su relación calidad-precio, en muchas ocasiones, y perfilándose como la opción obligada en un futuro cercano.

1.4.2. CLASIFICACIÓN DE LOS (BIO)SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.

- De acuerdo con la *naturaleza del analito* podemos dividirlos en:

a) Físicos, aquellos que contienen un transductor en el extremo de la fibra que modifica la señal luminosa en respuesta a variaciones de parámetros físicos tales como temperatura, presión, velocidad o tamaño de partícula.

b) Químicos, cuando responden a especies químicas o compuestos particulares (pH, iones, gases, compuestos orgánicos, compuestos bioquímicos, etc...).

- Además, dependiendo de la *estructura del terminal sensible*, los (bio)sensores químicos, que es el grupo de mayor interés para nosotros, se pueden clasificar en (Culshaw, 1986; Seitz, 1988; Wolfbeis, 1991):

a) (Bio)sensores extrínsecos, formados por un elemento sensor (fase reactiva) externo a la propia fibra, cuyas propiedades ópticas se modifican tras su interacción con el analito. En este caso, la fibra óptica actúa transmitiendo la radiación a/desde la fase reactiva. Los parámetros significativos de la fibra en este caso son: la eficiencia de la transmisión de la luz (transmitancia) y el ángulo de aceptación.

Estos (bio)sensores pueden subdividirse en tres grupos (Wolfbeis, 1991):

a.1) Sensores de 1ª Generación, en los que la fibra tan sólo se utiliza como guía de luz. Se han utilizado para realizar análisis espectrofotométricos a grandes distancias o, por ejemplo, para aquellas aplicaciones en las que no es posible el contacto físico con la muestra (e.g. análisis de muestras a elevada presión).

Entre las ventajas de su empleo podríamos destacar su *resistencia, simplicidad, estabilidad, durabilidad* y que *no necesitan ser calibrados*. Sin embargo, pueden ser *poco selectivos* y el número de analitos para los que pueden utilizarse es limitado. Para su aplicación es necesario considerar parámetros tales como el índice de refracción del medio o la apertura numérica de la fibra que determina su cono de luz. También se denominan sensores de “*terminal desnudo*”, *optodos pasivos* o *sensores directos* (Boisdé et al., 1988; Valcárcel et al., 1994).

a.2) Sensores de 2ª Generación, en ellos la información analítica se genera a través de una reacción indicadora, ya que el analito no tiene un método inmediato de detección sensible. Un subgrupo de estos sensores son los llamados “*sensores con depósito*” en los cuales el reactivo se sitúa en un depósito y se alimenta de forma continua para su reacción con el analito en el extremo sensible.

a.3) Sensores de 3ª Generación, formados por una biomolécula acoplada a un sensor de segunda generación, por ejemplo un sensor de oxígeno o de pH. Tras la reacción con la biomolécula, el analito a cuantificar se transforma/correlaciona con la especie monitorizada por el sensor de segunda generación.

Los sensores de 2ª y 3ª generación también se denominan *sensores indirectos* o *activos*. Podemos destacar de ellos que son *más selectivos* que los pasivos y no se van a ver afectados por el índice de refracción del medio. Las desventajas incluyen el posible *lavado* o *fotodescomposición* del indicador en contacto con la muestra, *mayores tiempos de respuesta*, la *mayor complejidad de construcción* y en algunos casos la presencia de artefactos originados por el hinchamiento de la membrana o resinas utilizadas en su construcción.

En la Figura 6 se representan distintas configuraciones correspondientes a (bio)sensores extrínsecos.

En (a), el indicador se encuentra inmovilizado directamente sobre una membrana situada en el extremo de la fibra óptica. Ejemplos típicos incluyen

indicadores inmovilizados covalentemente sobre membranas de celulosa o unidos electrostáticamente a membranas de intercambio iónico. Alternativamente, el indicador puede presentarse en forma de sólido fijado mecánicamente a una membrana situada en el extremo de la fibra óptica, como se muestra en (b). La Figura 6(c) representa otro tipo de configuración, en la que una disolución homogénea del indicador es retenida por medio de una membrana que envuelve el extremo de la fibra óptica. En este caso, la membrana puede servir para otros propósitos, como es la exclusión de sustancias interferentes o el aislamiento óptico del indicador. En la Figura 6(d), el reactivo indicador es encapsulado en el interior de una membrana tubular permeable al analito; o bien en el interior de un tubo capilar (cuando la fase reactiva se prepara directamente por polimerización) que a su vez se sujeta en el extremo de la fibra óptica (e).

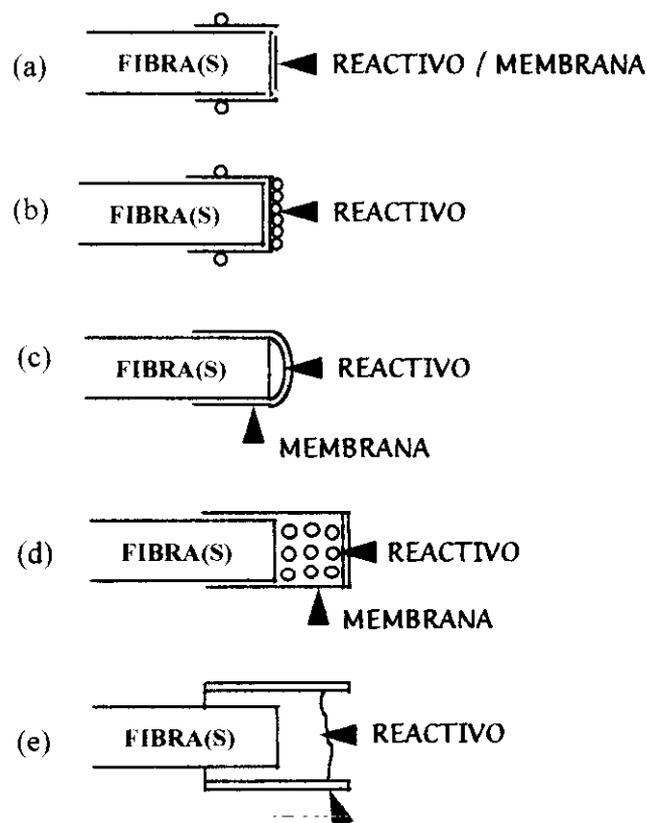


FIGURA 6. Configuraciones típicas de (bio)sensores extrínsecos.

- En algunos casos, también es posible fijar directamente el indicador sobre la propia fibra óptica tras someterla a un tratamiento de silanización previo. Sin

embargo, la cantidad de reactivo inmovilizado por este procedimiento es relativamente baja y el procedimiento de inmovilización suele ser menos reproducible que en el caso de que se inmovilice el indicador sobre otro soporte sólido.

(b) (Bio)sensores intrínsecos, también denominados *activos* (Boisdé et al., 1988; Valcárcel et al., 1994) en los que la propia fibra óptica actúa como sensor al modificarse alguna de sus propiedades por el analito. Por tanto, a diferencia de los (bio)sensores extrínsecos, no se mide una propiedad óptica del analito o de una fase reactiva, sino el cambio en las propiedades ópticas de la fibra provocado por la reacción química con el analito, que tiene lugar sobre la propia fibra óptica, bien sea en su núcleo o en su superficie.

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

Dentro de este grupo, los efectos que han tenido mayor aplicación en el desarrollo de los (bio)sensores ópticos han sido los siguientes:

b.1) Sensores refractométricos, en ellos se produce la interacción de la onda evanescente, transmitida hacia el exterior del núcleo de la fibra, con el medio a analizar (generalmente un líquido), modificándose las constantes de propagación de la fibra en función del índice de refracción del medio exterior.

b.2) Sensores de onda evanescente, en este caso se produce la absorción de luz por parte de las moléculas localizadas en el campo evanescente de la fibra óptica superponiéndose las características espectrales del analito con las correspondientes a la propia fibra.

b.3) Modificaciones del recubrimiento y de la interfase núcleo-recubrimiento. Las propiedades ópticas del recubrimiento de la fibra varían debido a la presencia o a la concentración del analito modificándose su interacción con la onda evanescente. Se incluirían en este grupo aquellos optodos en los que se inmovilizan covalentemente a la fibra fluoróforos, ionóforos e incluso anticuerpos.

b.4) Sensores basados en una modificación del núcleo de la fibra, en ellos el analito origina una variación de las características ópticas del propio núcleo. En

comparación con las técnicas de onda evanescente, los niveles de señal son mayores, ya que se trata de la zona de mayor densidad de energía luminosa pero, el factor limitante en los mismos es que la respuesta suele ser lenta, ya que está condicionada por la “entrada” (por difusión o bombeo) del analito al núcleo.

- Otro tipo de clasificación de los (bio)sensores químicos de fibra óptica es la que considera la *forma* según la cuál el sistema *transductor modula la señal* :

- a) Sensores de amplitud o modulados en intensidad: la interacción con el analito modifica la **amplitud (intensidad)** de la radiación transmitida por la fibra. Emplean fuentes de luz incoherentes y elementos ópticos más sencillos; por ello son más utilizados. Presentan unas prestaciones comparables a los sensores tradicionales.

- b) Sensores de fase o interferométricos: la interacción con el analito produce un **cambio en la fase** de la señal óptica. Requieren fuentes de luz coherentes, fibras monomodo y dispositivos complejos para controlar la polarización, resultando por ello más caros, si bien son muy sensibles.

- c) Sensores de tiempo de vida: el tiempo de vida de emisión de la señal se modifica en función de la propiedad medida del analito.

- d) Sensores de modulación modal: el transductor modula los rayos que viajan a distintos ángulos en la fibra.

- e) Sensores polarimétricos: el transductor modula la polarización de la luz.

- Finalmente, según la naturaleza de las moléculas involucradas en el terminal sensible, los optodos pueden clasificarse de forma genérica en:

- a) Químicos, cuando en la reacción de detección de un parámetro de dicha naturaleza no interviene material biológico alguno.

- b) Bioquímicos, cuando utilizan un material de origen biológico (enzimas, anticuerpos, células, etc).

1.4.3. INSTRUMENTACIÓN.

La instrumentación requerida para la construcción de (bio)sensores de fibra óptica puede ser simple o compleja dependiendo de la aplicación concreta y del

principio de medida utilizado. En general, los instrumentos diseñados para trabajar con sensores de fibra óptica constan de cinco elementos básicos:

1) Una fuente de radiación pulsada o continua, en forma de lámparas incandescentes, diodos emisores de luz (LEDs) o fuentes colimadas, como es el caso de los láseres.

2) Acopladores ópticos y selectores de longitud de onda (filtros y/o monocromadores).

3) Fibras ópticas, que constituyen el elemento diferenciador entre un instrumento clásico y un optodo.

4) Un detector; normalmente se trata de fotodiodos o tubos fotomultiplicadores.

5) Un sistema de registro y tratamiento de los resultados obtenidos.

En este capítulo nos limitaremos a dar una descripción general de los distintos componentes detallados anteriormente; sin embargo, se puede encontrar información más detallada en varias publicaciones especializadas (*Klainer et al., 1991; Modlin et al., 1991*).

1.4.3.1. Fuente luminosa.

La fuente luminosa debe ser capaz de proporcionar una radiación intensa y estable. Actualmente se dispone de una amplia variedad de fuentes entre las que podemos citar: lámparas de wolframio-halógeno, de xenon, de hidrógeno, de deuterio, de mercurio, láseres (en sus diferentes versiones) y LEDs (diodos emisores de radiación).

La elección de la fuente luminosa depende en gran medida de las características espectroscópicas de la fase sensible y de cada uso concreto. Así por ejemplo, las lámparas de wolframio-halógeno proporcionan radiación en el intervalo comprendido entre 340-2500 nm, siendo útiles por tanto para medidas en el visible o en IR cercano (NIR). Se emplean generalmente para medidas de reflectancia y absorbancia que no requieren grandes intensidades luminosas.

Los láseres se utilizan para conseguir una radiación monocromática intensa y su uso está especialmente indicado para realizar medidas "remotas" o en el caso de

sensores constituidos por una única fibra óptica, en los cuales la cantidad de luz que alcanza la región sensible es limitada. Sin embargo, su elevado coste y la posibilidad de dañar la fibra debido a la elevada intensidad que proporcionan hace que su uso no se encuentre muy extendido.

El empleo de los LEDs en el análisis con dispositivos de fibra óptica se ha incrementado notablemente durante los últimos años debido a su bajo costo, facilidad de uso y a que proporcionan una emisión relativamente monocromática en el intervalo de longitudes de onda que va desde 480 nm (LEDs azules) hasta 4 μm (diodos emisores de radiación IR). No obstante, la intensidad de la radiación que suministran es, por lo general, bastante baja. Para medidas de fluorescencia, por ejemplo, se requieren intensidades de radiación muy superiores. En este caso, se emplean las lámparas de xenon pulsadas o continuas, o las lámparas de Hg.

1.4.3.2. Dispositivos ópticos.

Una parte importante en el diseño y construcción de espectrofotómetros de fibra óptica es el acoplamiento de la fuente, fibra óptica y detector para lograr reducir al máximo las posibles pérdidas de radiación luminosa. Esto se consigue mediante el empleo de acopladores ópticos (en general *lentes de vidrio o cuarzo*) que enfocan el haz luminoso procedente de la fuente hacia la fibra óptica, así como la radiación que vuelve a través de la misma hacia el detector.

En el caso de los láseres, esta operación de enfoque, se puede llevar a cabo de forma eficaz, ya que la sección transversal del haz de luz suministrado por el láser es prácticamente igual a la sección transversal de la fibra óptica. Por el contrario, los LEDs y las lámparas en general, generan haces luminosos divergentes, por lo que, en este caso, es imprescindible el empleo de lentes para realizar dicho enfoque. El acoplamiento del fotodetector a la fibra óptica es más sencillo puesto que los detectores presentan áreas superficiales y ángulos de aceptación relativamente grandes.

Otros componentes incluidos en el sistema óptico son los selectores de longitud de onda (*filtros y monocromadores*). Su empleo sirve para aislar una banda de excitación perteneciente a una fuente luminosa que tenga un intervalo de emisión muy ancho y además para discriminar la señal con interés analítico generada en los

sensores ópticos de la luz interferente que normalmente la acompaña (emisión Raman y dispersión Rayleigh principalmente). La necesidad del empleo de monocromadores depende del tipo de medida en la que se fundamenta el sensor de fibra óptica. Así, éste puede no requerir monocromador alguno (medidas de *quimioluminiscencia*); emplear uno, situado generalmente antes del detector (medidas de *absorbancia y reflectancia*), o bien, necesitar dos sistemas de selección de la longitud de onda, uno en el canal de excitación y otro en emisión (medidas de *luminiscencia*). A la hora de elegir el selector de onda más adecuado, han de tenerse en cuenta aspectos como el coste, la resolución espectral y el propósito del análisis. Los componentes más usados son los filtros ópticos y las redes de difracción. Los primeros dejan pasar un intervalo más o menos ancho de longitudes de onda y son relativamente económicos. Pueden ser de tres tipos: **banda ancha**, **de corte** o **interferenciales**.

Las redes de difracción dispersan geoméricamente la luz separándola en las frecuencias que la componen. Actualmente, cada vez se emplean con mayor frecuencia las *redes holográficas* que permiten rechazar entre 10 y 100 veces más la luz difusa que las redes convencionales.

1.4.3.3. Fibras ópticas.

Básicamente, una fibra óptica está compuesta por un núcleo central, con un índice de refracción n_1 , rodeado por un recubrimiento cuyo índice de refracción n_2 es siempre inferior al del núcleo. Finalmente, el revestimiento puede ir forrado de una envoltura protectora, generalmente plástica, que junto con la fibra en sí forma el llamado "*cable óptico*".

La luz que penetra en la fibra desde un medio externo, con índice de refracción n_0 , sigue la *ley de Snell* ($n_0 \text{ sen } \alpha = n_1 \text{ sen } \beta$), siendo α y β los ángulos incidente y refractado, respectivamente, y se transmite a su través siempre que incida en el recubrimiento, desde el núcleo, con un ángulo mayor que el ángulo crítico θ_c , de modo que la radiación se refleje en la interfase núcleo/recubrimiento totalmente hacia el interior. De todas las radiaciones que entren en el extremo de la fibra, sólo se propagarán aquéllas que incidan con un ángulo inferior a un determinado ángulo crítico (Figura 7). Las que incidan con ángulos mayores no sufrirán reflexión total,

sino que atravesarán la interfase, hacia el recubrimiento y eventualmente serán absorbidas por la cubierta protectora. Asimismo, cuando la luz se propaga a través de la fibra óptica, hay una pequeña fracción de la misma que atraviesa la interfase y penetra en el recubrimiento (del orden de nm), dando lugar al fenómeno conocido como “onda evanescente”.

El ángulo mitad del cono de aceptación, α , depende de los índices de refracción del núcleo y del recubrimiento, así como del índice de refracción del medio externo, n_0 . La ecuación 1 muestra la relación entre el ángulo mitad del cono de aceptación y los índices de refracción:

$$\text{sen } \alpha = \frac{(n_1^2 - n_2^2)^{1/2}}{n_0} \quad (1)$$

En lugar de por el ángulo crítico, las fibras vienen caracterizadas por el valor de su *apertura numérica* (A.N) que será igual a:

$$A.N = n_0 \text{ sen } \alpha \quad (2)$$

donde n_0 es el índice de refracción del medio exterior. Cuando éste es aire $n_0=1$ y entonces,

$$A.N = \text{sen } \alpha = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2} \quad (3)$$

La apertura numérica típica varía entre 0.16 y 0.66.

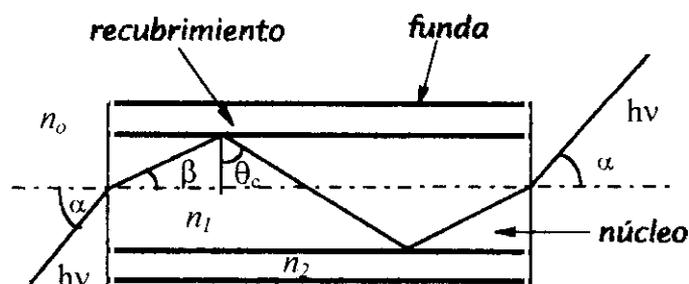


FIGURA 7. Transmisión de la radiación a través de la fibra óptica.

La pérdida de potencia óptica de un haz de luz al viajar por la fibra se conoce como “*atenuación*”. Se define como la relación entre la intensidad luminosa obtenida a la salida y la suministrada a la entrada, expresada en decibelios. Se calcula como

$10 \log (I/I_0)$ y se expresa en dB Km^{-1} . Los materiales usados en la fabricación de la fibra óptica se seleccionan con objeto de obtener el menor índice de atenuación posible.

El parámetro que define la cantidad de información que puede transmitir una determinada fibra es el “*ancho de banda*”. Un rayo de luz se ensancha al viajar por la fibra y esta dispersión limita la capacidad de información que se puede transmitir.

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

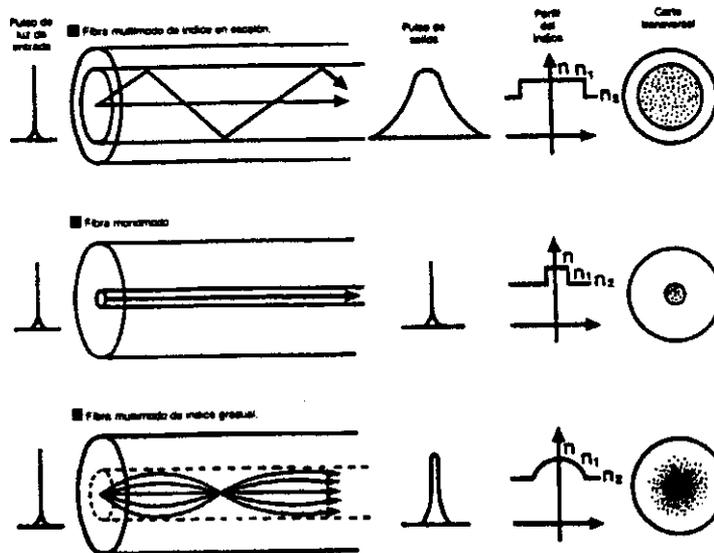


FIGURA 8. Tipos de fibras ópticas.

a) Fibra multimodo de índice en escalón. Consta de un núcleo homogéneo con índice de refracción n_1 , rodeado de un revestimiento con índice de refracción ligeramente menor n_2 . Tienen una gran distorsión modal y un ancho de banda muy limitado. Es la que posee la menor capacidad de transmitir información y, hoy en día, su principal campo de aplicación son las redes de datos y las aplicaciones industriales de ancho de banda pequeño y longitud corta.

b) Fibra multimodo de índice gradual. Con esta fibra se logra una reducción de la distorsión modal, disminuyendo radialmente el índice de refracción del núcleo del centro hacia el exterior. Para reducir la distorsión modal al mínimo, el perfil del índice debe ser casi parabólico. Se aplica, sobre todo, en las comunicaciones de banda ancha a gran distancia.

c) Fibra monomodo. Con esta fibra se evita la distorsión modal, escogiendo un diámetro de núcleo tan pequeño ($\sim 10 \mu\text{m}$), que únicamente pueda propagar un solo modo. Se aplica, especialmente en las redes troncales de gran ancho de banda y longitudes largas.

Las fibras ópticas pueden ser *cilíndricas o planas*; en éste último caso, su utilización puede ser ventajosa, ya que son más fáciles de recubrir con una fase reactiva. Por otra parte, se controla mejor el ángulo de incidencia de la radiación al construir el terminal sensible, resultando así sensores de mayor reproducibilidad de fabricación y calidad.

La mayoría de los núcleos de las fibras ópticas están constituidos por sílice fundida, vidrio, poli(metacrilato de metilo), poliestireno o un líquido adecuado. Las fibras ópticas de cuarzo transmiten en el intervalo de 190-1300 nm pero son 4 veces más caras que las de vidrio, que transmiten en el intervalo de 380-1300. Las fibras ópticas de plástico son las más baratas pero, por contra, presentan grandes pérdidas, una pobre estabilidad frente a la radiación prolongada y un intervalo útil limitado (450 - 700 nm).

Por otra parte, las fibras ópticas de cuarzo son resistentes a los medios fuertemente ácidos o moderadamente alcalinos, si bien sufren el ataque del ácido fluorhídrico y de las bases fuertes ($\text{pH} > 13$). La máxima temperatura a la que se puede trabajar con la mayoría de las fibras ópticas está limitada por la resistencia del material que constituye la "envoltura protectora" y suele ser de unos $125 \text{ }^\circ\text{C}$. Para trabajar en el IR, exceptuando el NIR, se utilizan fibras de sílice fundida especial (de fluoruro de zirconio o vidrios de calcogenuro).

Las fibras líquidas funcionan de forma similar a las fibras ópticas sólidas pero están formadas por tubos rellenos con un fluido transparente en cuyos extremos se sitúan sendas placas pulidas de gel de sílice. En general, estas fibras transmiten en el intervalo de 270 - 720 nm.

1.4.3.4. Detectores.

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

- **Detectores fotoemisivos.** En este tipo se incluyen los tubos fotomultiplicadores (PMTs) y fototubos. El tipo concreto se selecciona en función del intervalo de longitudes de onda de interés. Se basan en la emisión de electrones desde un fotocátodo y permiten una ganancia en la señal del orden de 10^6 en algunas ocasiones.

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

- **Detectores fotovoltaicos.** Basados en la generación de una corriente en la unión de materiales semiconductores de tipo p y tipo n. Un representante típico es el **fotodiodo de silicio**. Estos poseen bajo precio y pequeño tamaño, así como gran estabilidad, aunque son mucho menos sensibles que los fotomultiplicadores. La respuesta espectral de los mismos aumenta a partir de 400 nm hasta alcanzar un máximo a 900 nm. Actualmente existe una gran tendencia a utilizar CCDs (del inglés "*coupled charged device*"). Estos detectores están formados por un fotodiodo de silicio, divisible en un número determinado de elementos que permiten el procesado rápido de imágenes con alta sensibilidad, poco ruido y amplio intervalo dinámico. Por otra parte, consumen poca energía y permiten hacer calibrados en tiempo real, adquiriendo espectros completos, lo cual permite tomar una referencia interna.

- **Detectores fotoconductivos.** Un semiconductor varía su resistencia al exponerlo a la luz de ciertas longitudes de onda, por generación de transportadores de carga. Pueden ser de distintos tipos: a) de **unión fotoconductor**: incluye los *fototransistores* y los *fotodiodos "positivo-intrínseco-negativo"*; b) *células fotoconductoras de sulfuro de cadmio y seleniuro de cadmio*.

1.4.4. COMPONENTES DEL TERMINAL SENSIBLE.

Como ya se ha indicado, el elemento fundamental en un (bio)sensor químico es la fase reactiva situada en el terminal sensible. En los (bio)sensores mediados por un indicador contiene un reactivo o biomolécula, generalmente inmovilizado sobre un

soporte sólido o sobre la propia fibra, siendo la zona de interacción entre la luz y el analito.

La preparación de la fase sensible es una de las etapas clave en la construcción de los sensores ópticos. Durante este proceso se han de elegir cuidadosamente el *indicador, soporte y método de inmovilización* más adecuados, con el fin de conseguir la máxima *reproducibilidad, sensibilidad y selectividad* de los dispositivos resultantes.

1.4.4.1. Clasificación de los terminales sensibles.

Dependiendo de la configuración de la fibra o haces de fibra óptica empleada, podemos clasificar dichos terminales en (Cámara et al., 1991) (véase Figura 9):

a) Terminales de fibra única. Hacen uso de una sola fibra, la cual transmite la radiación procedente de la lámpara y la radiación modificada como consecuencia de la interacción entre indicador y analito. Dentro de este grupo podemos distinguir a su vez:

- Terminales de sentido único, formados por una fibra en la que se ha eliminado parte del recubrimiento externo sustituyéndolo por una capa del indicador. Los cambios originados en el color, la fluorescencia, la dispersión Raman o el índice de refracción de dicho recubrimiento provocados por el analito, pueden medirse siguiendo las pérdidas por transmisión o radiación producidas en la zona sensible.

- Terminales de doble sentido. En este caso, hay que recurrir a algún método de separación óptica que permita evitar la interferencia a que puede dar lugar el hecho de que ambos haces de luz viajen por la misma fibra.

b) Terminales de fibra doble. En ellos, la radiación incidente se conduce hasta la fase reactiva por una fibra, mientras que la de retorno se recoge y conduce por una fibra óptica adyacente hasta el detector. Alternativamente, la segunda fibra óptica puede disponerse enfrentada a la primera situándose el terminal sensible en una posición intermedia entre ambas.

c) Terminales de haz de fibras bifurcado. Se trata de un haz de fibras ópticas dividido en dos paquetes, cada uno de los cuales transmitirá la radiación incidente y la

de retorno, respectivamente, a/desde el extremo sensible. La fase reactiva se dispone en el extremo común.

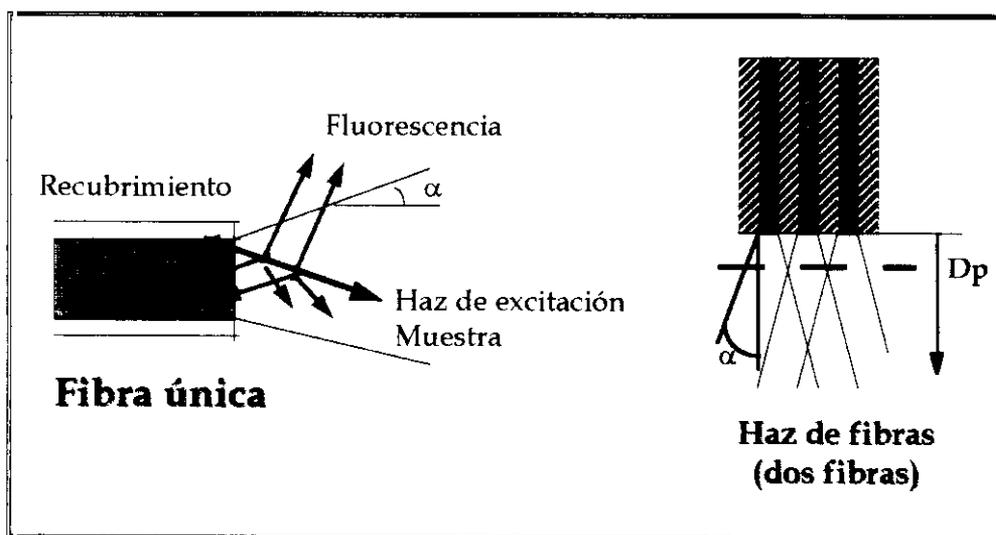


FIGURA 9. Distintas configuraciones del terminal sensible.

Los sensores de fibra única, presentan la ventaja frente a los sensores de fibra doble o haz de fibras bifurcado de que el solapamiento entre el cono de muestra excitada y el cono de aceptación de la señal analítica es máximo. Por otra parte, pueden miniaturizarse fácilmente y, por ello, son muy útiles en medicina. Sin embargo, la absorción, fluorescencia intrínseca y/o la dispersión Raman de la fibra pueden suponer una seria interferencia en la señal medida. El empleo de sensores de fibra doble o haz de fibras bifurcado evita este inconveniente. El empleo de una única fibra puede también suponer una mayor complejidad instrumental al tener que separar las radiaciones de prueba y analítica. Por contra, el empleo de varias fibras puede también encarecer el producto final y a su vez, dificultar la optimización del ángulo entre las fibras de excitación y emisión originando una menor eficacia en la recolección de la radiación.

1.4.4.2. Indicadores. Empleo de complejos metálicos luminiscentes.

Todos los sensores ópticos extrínsecos de 2ª y 3ª generación y algunos intrínsecos (ver apartado 1.4.2) contienen un indicador en la fase reactiva del terminal sensible. Como se mencionó anteriormente, el indicador actúa como un transductor convirtiendo la concentración (actividad) del analito en una señal óptica

medible. La elección del indicador dependerá principalmente de la propiedad óptica medida y del analito para el cual se pretende construir dicho sensor.

Así, podemos clasificar los indicadores más comúnmente utilizados en la construcción de (bio)sensores de fibra óptica en dos grandes grupos: indicadores colorimétricos e indicadores fluorescentes .

En el caso de sensores ópticos basados en medidas de absorbancia o de reflectancia difusa se han utilizado, por ejemplo, indicadores colorimétricos en el desarrollo de sensores para la determinación de pH y de diversos cationes (*Peterson et al., 1984; Kirkbright et al., 1984*).

Para sensores basados en medidas de fluorescencia se han empleado, tanto reactivos luminiscentes, como moléculas que, aunque no sean intrínsecamente luminiscentes, puedan convertirse en tales mediante procesos de derivatización. Los indicadores fluorescentes presentan algunas ventajas sobre los colorimétricos, como por ejemplo, su *mayor sensibilidad, selectividad* y la *mayor versatilidad* de las técnicas luminiscentes.

Un buen indicador para medidas de luminiscencia ha de reunir las siguientes características: **elevado rendimiento cuántico**, **alta selectividad** para el analito de interés, **longitudes de onda analíticas favorables**, un **desplazamiento de Stokes** apreciable que permita la utilización de filtros en lugar de monocromadores, abaratando así el equipo de medida y una **elevada fotoestabilidad**, ya que, una vez en el extremo de la fibra, van a ser iluminados durante largos períodos de tiempo.

Algunas de estas características son las que poseen los *tris-quelato complejos de Ru(II)* que contienen ligandos polipiridílicos, utilizados como indicadores en los diferentes (bio)sensores desarrollados en la presente Tesis Doctoral. Estos compuestos exhiben características únicas muy deseables en la construcción y desarrollo de sensores químicos de fibra óptica entre las cuales, podemos citar:

- Una intensa absorción en la región visible del espectro electromagnético (típicamente entre 400 y 600 nm, $\epsilon = 7000-30000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) que corresponde a una transición electrónica de transferencia de carga metal-ligando (MLCT), además de otras bandas también intensas en la región ultravioleta del espectro. Esta

característica incrementa la sensibilidad, simplifica el diseño del sensor y permite la utilización de fuentes de excitación baratas.

- Un gran desplazamiento de Stokes entre la absorción y la emisión (ca. 200 nm o incluso más).
- Estados excitados de vida bastante larga (0.1 a 2 μ s en disolución acuosa a temperatura ambiente), comparados con la mayoría de los fluoróforos orgánicos, por lo que se pueden emplear tanto para medidas de intensidad de emisión como de tiempos de vida.
- Elevados rendimientos cuánticos con valores típicos entre 0.04 y 0.2 (Demas, 1983; Juris et al., 1988).
- Apreciable fotoestabilidad (Juris et al., 1988).

Además, mediante ingeniería molecular se puede conseguir un ajuste fino de las propiedades del estado fundamental y del estado excitado de los mismos, mediante una cuidadosa selección de los ligandos quelatos heterocíclicos que se utilizan en su preparación. Asimismo, esta flexibilidad química permite la obtención de sondas moleculares que respondan a un determinado analito o que puedan anclarse iónica o covalentemente al soporte.

1.4.4.3. Enzimas como elementos de reconocimiento molecular.

Las enzimas han sido tradicionalmente las biomoléculas más ampliamente utilizadas en la construcción de biosensores (Carr et al., 1980). Se trata de proteínas de elevado peso molecular (con valores típicos entre 12.000-1.000.000 Da) que catalizan reacciones químicas específicas gracias a la existencia en su estructura tridimensional de determinados grupos activos, que interaccionan con el sustrato.

Comparadas con otros catalizadores de naturaleza química, las enzimas muestran un *alto grado de especificidad* hacia el sustrato o sustratos con un grupo funcional común, que se debe fundamentalmente a la complementariedad estereoquímica del principio "llave-cerradura" existente entre el sustrato y el centro activo. Esta característica ha hecho posible su empleo con fines analíticos en distintas áreas como la química clínica, la industria farmacéutica, el control de procesos

industriales y, más recientemente, dentro del campo de los biosensores (Guilbault, 1984).

Un parámetro que caracteriza a las enzimas es su "actividad enzimática", que hace referencia a la velocidad de conversión del sustrato. Así, en condiciones estándar (25 °C, pH óptimo), la actividad enzimática se suele expresar como la cantidad de enzima (en unidades) necesaria para transformar 1 μmol de sustrato en 1 minuto (Hawcroft, 1987). Asimismo, un parámetro similar es el denominado "turn-over number", definido como el número de moléculas de sustrato transformadas por molécula de enzima y por segundo.

Podemos clasificar las enzimas en seis grandes grupos, de acuerdo a la naturaleza de la reacción química que catalizan (Hall, 1991):

a) Grupo I: OXIDORREDUCTASAS.

Catalizan reacciones de oxidación-reducción de los siguientes grupos funcionales: $>\text{CH-OH}$; $>\text{C=O}$; $-\text{CH=CH-}$; $>\text{CH-NH}_2$; $>\text{CH-NH-}$.

b) Grupo II: TRANSFERASAS.

Catalizan la transferencia de grupos funcionales tales como aldehído, cetona, acilo, glicosilo, fosfato y grupos que contienen sulfuro.

.....c) Grupo III: HIDROLASAS.

Hidrolizan ésteres, anhídridos, enlaces peptídicos, glicósidos y otros enlaces C-N.

d) Grupo IV: LIASAS.

Eliminación de grupos por formación de dobles enlaces: $>\text{C=C}<$; $>\text{C=O}$ y $>\text{C=N}$.

e) Grupo V: ISOMERASAS.

Racemización y epimerización, cambio de configuración geométrica de dobles enlaces, oxidaciones y reducciones intramoleculares, transferencia de grupos intramolecular.

f) Grupo VI: LIGASAS.

Unión de dos moléculas con liberación de ATP.

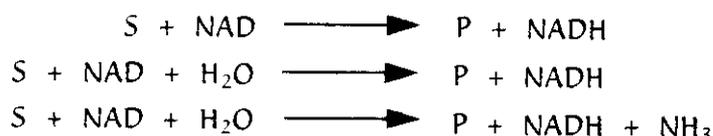
En la TABLA I, se muestra una relación de algunas enzimas empleadas en la construcción de biosensores ópticos. De todas ellas, el grupo más utilizado con fines analíticos es el de las *oxidorreductasas e hidrolasas*, debido a su alta disponibilidad

comercial en formas altamente activas y purificadas (Marko-Varga et al., 1991; Alvarez-Icaza et al., 1993).

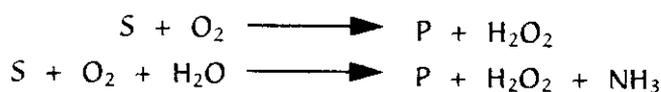
TABLA I. ENZIMAS EMPLEADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE OPTODOS.

| ENZIMA | ANALITO | ESPECIE MEDIDA | REFERENCIA |
|---------------------------|-------------|--|---|
| Decarboxilasas | | | |
| glutamato decarboxilasa | glutamato | CO ₂ | Dremel et al., 1991 |
| oxalato decarboxilasa | oxalato | CO ₂ | Schaffar y Wolfbeis, 1991 |
| Dehidrogenasas | | | |
| alcohol dehidrogenasa | alcoholes | NADH | Walters et al., 1988. |
| glucosa dehidrogenasa | glucosa | NADH | Narayanaswamy y Sevilla, 1988. |
| lactato dehidrogenasa | lactato | NADH | Wangsa y Arnold, 1988. |
| Hidrolasas | | | |
| creatinina iminohidrolasa | creatinina | NH ₄ ⁺ | Wolfbeis y Li, 1991. |
| esterasa | ésteres | pH | Luo y Walt, 1989. |
| ureasa | urea | NH ₃ , NH ₄ ⁺ | Rhines y Arnold, 1989; Wolfbeis y Li, 1991. |
| penicilinasas | penicilina | pH | Goldfinch y Lowe, 1984; Luo y Walt, 1989. |
| Oxidasas | | | |
| alcohol oxidasa | alcoholes | O ₂ | Völkl et al., 1980; Wolfbeis y Posch, 1988. |
| ascorbato oxidasa | ascorbato | O ₂ | Schaffar, 1988. |
| bilirrubina oxidasa | bilirrubina | O ₂ | Schaffar, 1988; Trettnak, 1989. |
| colesterol oxidasa | colesterol | O ₂ | Trettnak y Wolfbeis, 1990. |
| glucosa oxidasa | glucosa | pH | Trettnak et al., 1989; Kulp et al., 1988. |
| | | O ₂ | Dremel et al., 1989a; Moreno Bondi et al., 1990. |
| glutamato oxidasa | glutamato | O ₂ | Dremel et al., 1991. |
| lactato oxigenasa | lactato | O ₂ | Dremel et al., 1989b. |
| lactato mono-oxigenasa | lactato | O ₂ , CO ₂ | Lübbers et al., 1981; Trettnak y Wolfbeis, 1989a. |
| fenolasa | fenoles | O ₂ | Schaffar y Wolfbeis, 1991. |
| sulfito oxidasa | sulfito | O ₂ | Schaffar y Wolfbeis, 1991. |
| uricasa | ácido úrico | O ₂ | Schaffar y Wolfbeis, 1991. |

Las oxidorreductasas, a su vez, se pueden clasificar atendiendo al tipo de oxidante y reductor involucrados en la reacción enzimática. Así tendríamos las enzimas *dehidrogenasas* que catalizan las siguientes reacciones:



En segundo lugar las *oxidases* que catalizan reacciones del tipo:



y finalmente las *oxigenasas*:



El mecanismo de funcionamiento de un biosensor enzimático se muestra en la Figura 10. El analito, o sustrato en general, difunde desde la solución hacia la membrana que contiene la enzima inmovilizada, donde se convierte en un producto medible por el transductor.

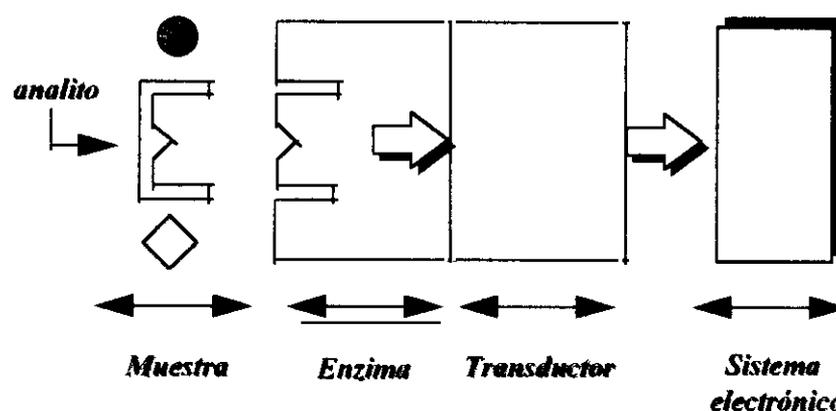


FIGURA 10. Mecanismo de funcionamiento de un biosensor enzimático.

Existen varias posibilidades para seguir el curso de estas reacciones (Byfield et al., 1994) (véase TABLA II). La más utilizada consiste en el seguimiento de la evolución (consumo o generación) por métodos electroquímicos u ópticos (por ejemplo, intensidad de corriente, absorbancia o fluorescencia) de alguna de las especies de bajo peso molecular (O_2 , H^+ , H_2O_2 , NH_3 , NAD , NADH) que intervienen en la reacción enzimática. Alternativamente, la señal óptica puede proceder de la propia enzima (o de una biomolécula asociada, como un *cofactor*). Asimismo, puesto que las

enzimas no sólo reconocen a sus sustratos naturales, sino también a sus inhibidores (metales pesados, pesticidas), es posible la determinación de estos últimos (Tran-Minh, 1985; Wolfbeis, 1993). En este caso, el analito inhibe la reacción enzimática específica, alterando la señal electroquímica u óptica. Por último, existe otra posibilidad, aunque no ha sido muy explotada en el desarrollo de biosensores, que consiste en la determinación del calor generado durante la reacción enzimática, el cual se puede relacionar con la concentración de analito.

TABLA II. PRINCIPALES TIPOS DE BIODENSORES ENZIMÁTICOS.

| TRANSDUCCIÓN | PRINCIPIO DE LA DETERMINACIÓN | EJEMPLO | |
|----------------|--|------------------------------|---------------------|
| | | Analito | Enzima |
| ELECTROQUÍMICA | (a) Analito convertido en un producto con propiedades electroquímicas. | Glucosa | Glucosa Oxidasa |
| | (b) El analito inhibe una reacción enzimática en la que se genera un producto con propiedades electroquímicas. | CN ⁻ | Citocromo Oxidasa |
| ÓPTICA | (a) Analito convertido en un producto con propiedades ópticas (o que induce propiedades ópticas). | Colesterol (O ₂) | Colesterol Oxidasa |
| | (b) Las propiedades ópticas de la enzima se modifican tras la reacción con el analito. | Lactato | Lactato monoox. |
| | (c) El analito inhibe una reacción enzimática en la que se genera un producto con propiedades ópticas. | Pesticidas | Acetilcolinesterasa |
| CALORIMÉTRICA | Calor generado durante la reacción enzimática | Glucosa | Glucosa Oxidasa |

1.4.4.4. Soportes poliméricos.

El soporte polimérico es un componente esencial en numerosos (bio)sensores y de su elección dependerá en gran medida el buen funcionamiento de los mismos. Los polímeros utilizados en la construcción de optodos pueden tener una o más de las siguientes funciones: (a) actuar como soporte rígido sobre el cual se inmoviliza el indicador o biomolécula correspondiente; (b) proporcionar selectividad hacia ciertas

especies en virtud de la permeabilidad selectiva de la mayoría de los polímeros; (c) servir de "cubierta protectora" para evitar el arrastre o contaminación de la fase sensible y, por último, (d) proporcionar un aislamiento óptico para reducir la interferencia de la luz ambiental.

La elección del soporte polimérico vendrá determinada por la estabilidad, permeabilidad y disponibilidad del mismo, por el tipo de interacción indicador-analito, así como por la compatibilidad con la muestra y con el resto de los componentes utilizados en la fabricación del (bio)sensor.

Por ejemplo, para analitos gaseosos, la respuesta depende fundamentalmente de los coeficientes de difusión de los gases, su solubilidad en el material elegido y la permeabilidad del mismo, por lo que la elección del polímero tiene un efecto importante sobre el tiempo de respuesta del sensor y sobre la función de respuesta del mismo. En este sentido, las siliconas son materiales de propiedades ópticas y mecánicas excepcionales, que poseen una elevada permeabilidad a gases como O_2 y CO_2 (Robb, 1968; Yasuda et al., 1975; Stern et al., 1987). Actualmente existen disponibles en el mercado, numerosos prepolímeros de silicona que permiten la fabricación de membranas, emulsiones, suspensiones, etc. Además, las siliconas son el único material polimérico que no incorpora plastificantes en su composición, algunos de los cuales, como los ésteres del ácido ftálico, son fluorescentes y se añaden con el fin de disminuir la dureza y aumentar la permeabilidad de los polímeros orgánicos. Sin embargo, las siliconas presentan el inconveniente de que su superficie no puede ser modificada, por lo que la inmovilización covalente de los indicadores es prácticamente imposible. De ahí que generalmente se utilicen como disolventes para los indicadores o como membranas permeables a los gases.

Los polímeros, en general, no son buenos disolventes para la mayoría de los indicadores de interés ya que, transcurrido cierto tiempo, estos últimos cristalizan o se disponen en la superficie polimérica formando finas láminas. Además, los indicadores iónicos no se disuelven fácilmente en la mayoría de los polímeros usuales y los analitos cargados no penetran en los polímeros lipofílicos. Ante tal situación se hace necesario inmovilizarlos en la interfase entre el soporte y la disolución de la muestra.

Los soportes que se utilizan en las inmobilizaciones superficiales covalentes son el vidrio (en varias formas), la celulosa y las poliacrilamidas.

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

Los recientes avances en la tecnología de la fabricación de la cerámica han hecho posible modelar vidrios porosos de sílice a temperatura ambiente según el llamado proceso "sol-gel" que poseen un gran potencial para la obtención de fases reactivas de sensores químicos sin más que seleccionar los reactivos adecuados (*Dave et al., 1994; Lev et al., 1995*). La técnica de fabricación del "sol-gel" consiste en la hidrólisis y posterior condensación de tetraalcoxisilanos en disoluciones hidroalcohólicas. De esta forma, se consigue "dopar" los vidrios de sílice con compuestos de diversa naturaleza, introduciéndolos junto a los reactivos de polimerización y quedando así atrapados en las cavidades del futuro vidrio; al mismo tiempo es posible su interacción con especies solubles que acceden a ellos a través de los poros del vidrio. El proceso sol-gel es un método atractivo para la inmobilización de (bio)moléculas en matrices de sílice por su preparación a temperatura ambiente, posibilidad de atrapar gran cantidad de reactivo y sencillez. Sin embargo, es preciso que el soporte obtenido sea funcional, es decir, 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.).

Algunos soportes hidrófilos, como la celulosa, se han aplicado mucho en la inmobilización de indicadores (*Saari et al., 1982*), agentes quelatantes (*Wegscheider et al., 1981*) y proteínas (*Carr et al., 1980; Sharma et al., 1982; Woodward, 1982*). La facilidad de penetración del agua a través de las membranas de celulosa, hace que su empleo presente la ventaja de acortar los tiempos de respuesta en medios acuosos. Se encuentran disponibles en el mercado membranas de espesores mínimos (6µm)

como el "cuprophane", si bien resultan difíciles de manejar debido a su fragilidad y a la facilidad de contaminación bacteriana. Además de la celulosa, los dextranos y la agarosa se han utilizado como soportes en procesos de inmovilización de enzimas (Wolfbeis, 1991).

Existen otros soportes de tipo poli(acrilamida) y poli(metacrilamida) que tienen gran estabilidad química pero, a su vez, gran tendencia al hinchamiento, observándose una deriva de la señal cuando se hidratan.

Un grupo de polímeros hidrófilos frecuentemente utilizados son los hidrogeles (Ratner, 1981; Peppas, 1986). Químicamente, están constituidos por un grupo heterogéneo de polímeros que comprenden entre otros, poli(hidroxietil acrilato) (PHEMA), poli(acrilamidas), polivinilpirrolidonas, poli(vinilalcoholes) y poliuretanos. Los hidrogeles ofrecen una excelente biocompatibilidad, probablemente debida a su elevado contenido en agua y a sus particulares propiedades superficiales.

Otro tipo de materiales poliméricos empleados como soportes en la construcción de optodos son los intercambiadores iónicos. En general, se trata de materiales sólidos insolubles que contienen cationes o aniones reemplazables por una cantidad estequiométricamente equivalente de iones del mismo signo en contacto con la disolución del electrolito (Helfferich, 1962). Su matriz está formada por una red tridimensional de cadenas hidrocarbonadas de carácter hidrófobo a las que se enlazan ciertos grupos iónicos de distinta fuerza ácida, siendo los más comunes en el caso de los intercambiadores catiónicos, los grupos sulfonato ($-\text{SO}_3^-$) y los grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$). Generalmente, los intercambiadores iónicos utilizados con mayor frecuencia han sido las resinas de intercambio iónico, verdaderos polielectrolitos entrecruzados con un aspecto típico de gel. Tanto la selectividad como el equilibrio de intercambio de la resina se ven afectados por la naturaleza química de estos grupos iónicos. Así por ejemplo, los grupos R-COO^- se protonan a valores bajos de pH y de esta forma pierden su capacidad de intercambio. Por el contrario, los grupos R-SO_3^- permanecen ionizados incluso a bajos valores de pH. En resumen, la capacidad operativa de la resina muestra una dependencia con el pH de la disolución. Asimismo, la capacidad de intercambio de la resina depende del número de grupos iónicos enlazados.

Los intercambiadores catiónicos existen disponibles en el mercado en multitud de formas (bolas, membranas, etc). Las membranas de intercambio iónico ofrecen la ventaja de soportar el reactivo en posiciones concretas y ser accesibles al analito. Además, tanto las moléculas del indicador como las del analito pueden difundir fácilmente hasta las regiones interiores de las partículas, mientras que moléculas de mayor tamaño como proteínas o polisacáridos no pueden alcanzarlas, por lo que se evita la posible interferencia de estos compuestos. El principal inconveniente que presentan los intercambiadores iónicos es que su matriz es elástica y se comportan como “células higroscópicas” que se hinchan y se deshinchán de modo reversible con absorción o desorción de humedad.

Aparte del poliestireno, disponible en el mercado en varias formas (bolas, membranas, etc) y con distintos grupos catiónicos o aniónicos en su superficie, existen otros polímeros hidrófobos como el Nafión® (un polietileno parcialmente fluorado con grupos HSO_3^- en su superficie) que permite la inmovilización de indicadores catiónicos. Su excelente estabilidad química y mecánica, hace que sea uno de los materiales más populares para este tipo de aplicaciones. Otro tipo de polímeros incluyen la celulosa modificada, copolímeros de estireno/acrilamida y partículas de Latex® modificada con grupos carboxilo.

1.4.5. TÉCNICAS DE INMOVILIZACIÓN DEL REACTIVO Y/O BIOMOLÉCULA.

Una vez seleccionados el indicador y/o biomolécula y el soporte polimérico, el siguiente paso en la fabricación del (bio)sensor consiste en la preparación de la fase sensible que se lleva a cabo, normalmente, mediante la inmovilización de la (bio)molécula indicadora sobre el soporte elegido. En el caso de los biosensores enzimáticos, la inmovilización es un requisito prácticamente indispensable, debido a la estabilidad limitada que presentan muchas enzimas en disolución y al elevado coste de las mismas.

Entre las ventajas que aporta la inmovilización podemos incluir: un estricto control del medio y las condiciones de reacción; una mayor estabilidad de las biomoléculas, en su caso, y la posibilidad de trabajar en modo continuo (Guilbault, 1984; Hansen, 1992).

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

El proceso de inmovilización puede dar lugar, en algunos casos, a pequeñas modificaciones de las características espectrales del indicador, que se traducen en variaciones de los valores de las constantes ácido-base, de afinidad y, en particular, de las constantes de desactivación dinámica de la luminiscencia (Wolfbeis, 1991). Del mismo modo, otros factores tales como el pH óptimo de funcionamiento, la actividad en el caso de las enzimas, el efecto de la fuerza iónica o las especies interferentes, pueden verse notablemente modificados tras el proceso de inmovilización (Jones et al., 1988; Trettnak et al., 1988). Es por ello que todos estos parámetros se han de controlar cuidadosamente y optimizar en cada caso.

En la bibliografía se han descrito una gran variedad de procedimientos de inmovilización de indicadores y/o biomoléculas (Guilbault, 1977; Carr et al., 1980). En la Figura 11 se muestra una representación esquemática de los mismos.

En general, podemos distinguir entre métodos *físicos* y métodos *químicos*.

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

a) Adsorción.

Se trata del procedimiento de inmovilización más simple. El indicador o biomolécula se encuentra retenido en el soporte por simples fuerzas de van der Waals, interacciones dipolo-dipolo o por enlaces de hidrógeno (Geckeler et al., 1993). La ventaja de esta técnica reside en el hecho de que no requiere el empleo de ningún reactivo adicional por lo que se reduce el peligro de contaminación de la muestra. Sin embargo, uno de los mayores problemas de este tipo de inmovilización es la naturaleza *reversible* de la unión entre el reactivo y el soporte, por lo que cualquier variación de las condiciones experimentales (pH, temperatura, fuerza iónica, etc)

pueden provocar la *desorción* del indicador. Algunos de los soportes empleados para este tipo de inmovilización son las resinas de intercambio iónico, el poliestireno, la gel de sílice, la alúmina y el carbón activado.

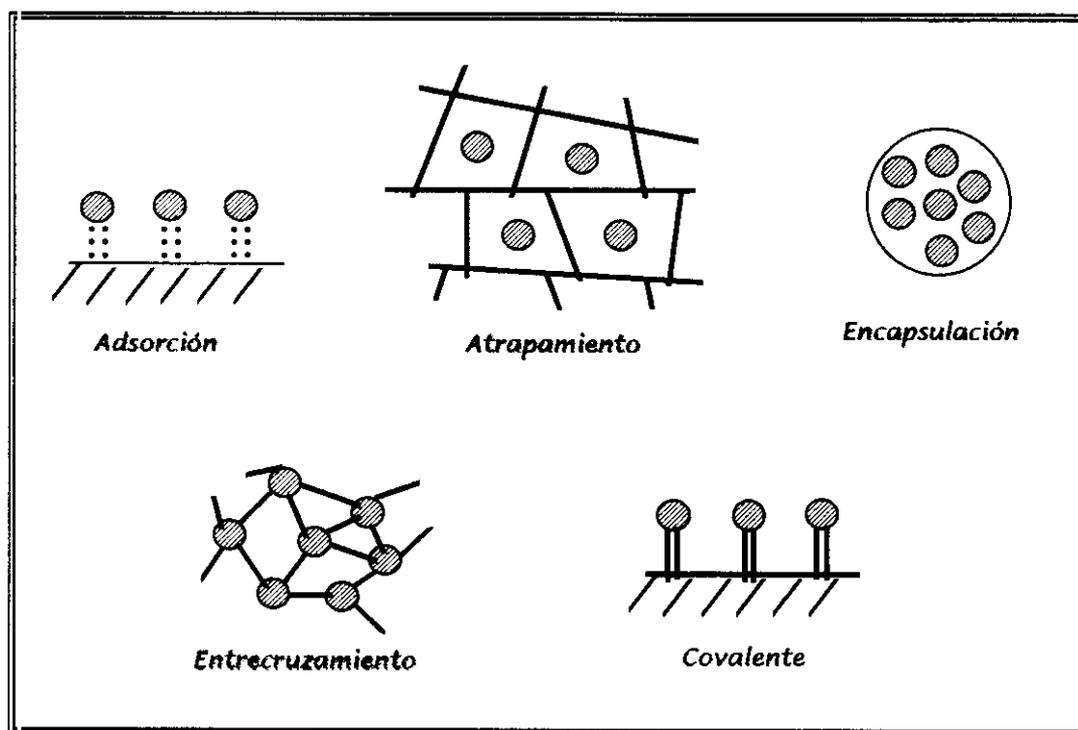


FIGURA 11. Métodos de inmovilización de (bio)moléculas.

b) Atrapamiento.

La inclusión de biomoléculas dentro de la matriz tridimensional de un polímero fuertemente entrecruzado constituye uno de los métodos de inmovilización más utilizados. La estructura del polímero entrecruzado está constituida por pequeñas cavidades producidas durante el entrecruzamiento, quedando la enzima retenida en éstas. Con esta estructura, las moléculas de sustrato pueden difundir hacia la enzima pero ésta no puede salir. Entre los polímeros más empleados para el atrapamiento de compuestos biológicos destacan la poli(acrilamida), poli(vinil alcohol) (PVA), cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PU), colágeno, agar-agar, alginato, pasta de carbono, entre otros.

c) Encapsulación.

Permite la inclusión de moléculas en una cavidad esférica o microcápsula porosa que permite el paso a su través de analitos de pequeño tamaño pero que

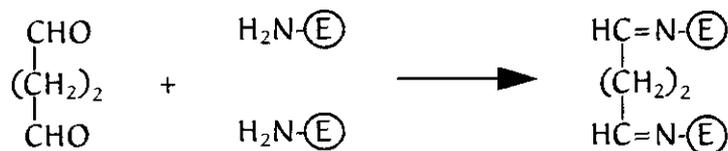
impiden escapar al reactivo que contienen en su interior. Los materiales empleados para la microencapsulación suelen ser nylon, poliuretano, etc.

- La inmovilización por métodos *químicos*, dada su naturaleza irreversible, da lugar a una mayor estabilidad del producto inmovilizado, ya que supone la unión covalente entre el indicador y el soporte funcionalizado. Existen dos tipos de inmovilización química: (a) **entrecruzamiento** y (b) **unión covalente**.

a) Entrecruzamiento.

Se trata de un tipo de inmovilización química que requiere el uso de agentes bifuncionales. Estos reactivos son completamente insolubles en agua y se adsorben fácilmente sobre superficies sólidas. El *glutaraldehido*, en particular, es uno de los más utilizados (*Tsuji et al., 1990*), aunque también se han ensayado otros muchos reactivos bi o multifuncionales (*Malmros et al., 1987*).

Los dos grupos aldehído presentes en la molécula de glutaraldehído reaccionan con los grupos amino de las enzimas (reactivo) formando un gel viscoso que solidifica cuando se evapora el disolvente.



En la práctica, se suele realizar la inmovilización en presencia de una proteína inerte como la albúmina de suero bovino (BSA), con el fin de evitar una sobrecarga de la superficie del soporte con moléculas del compuesto biológico que puedan originar problemas de accesibilidad del sustrato o efectos inhibidores debido a la presencia de elevadas concentraciones de enzima.

b) Unión Covalente.

Generalmente, se trata de la más irreversible de las técnicas de inmovilización. Su aplicación requiere la presencia de grupos funcionales adecuados, tanto en el soporte, como en el indicador y/o biomolécula (*Mann-Buxbaum et al., 1990*). Los pasos a seguir generalmente implican tres etapas: (1) **activación** del soporte polimérico y/o indicador, para crear una función suficientemente reactiva; (2) **reacción** de

acoplamiento, normalmente se trata de métodos sintéticos clásicos (Hall, 1991) y (3) eliminación del exceso de reactivo.

Las desventajas de este método son la dificultad y laboriosidad de su preparación. Además la unión puede tener lugar a través del grupo reactivo del indicador o los grupos funcionales de los centros activos de la enzima con la consiguiente desactivación de la misma; o bien pueden sufrir cambios conformacionales que modifiquen su afinidad por el analito. Por ello, es muy importante un cuidadoso control de las condiciones de reacción, tales como la relación proteína/agente entrecruzante, pH, temperatura, tiempo de reacción, entre otros.

Por último, existen disponibles en el mercado polímeros preactivados que poseen en su superficie grupos funcionales y que en condiciones suaves de reacción pueden unirse a aminas u otros nucleófilos. Así, la compañía Millipore (Bedford, ME) fabrica distintos tipos de nylon y membranas de nitrocelulosa que permiten la inmovilización de proteínas sin más que introducir la membrana en la disolución correspondiente durante un tiempo determinado. La cantidad de enzima inmovilizada depende, entre otros factores, del tiempo de inmovilización, pH, fuerza iónica y concentración de enzima en la disolución. Otro tipo de membranas preactivadas son las membranas de inmutioafinidad tipo Byodine® (Pall Company, Glen Glove, NY) con grupos COOH activados en su superficie.

1.4.6. CARACTERÍSTICAS DE LA INTERACCIÓN DE LA FASE REACTIVA CON EL ANALITO.

La función de la fase sensible en un optodo es interaccionar con el analito, dando lugar a una variación de las propiedades ópticas del reactivo inmovilizado que puede ser detectada a través de la fibra óptica. Esta interacción puede tener lugar siguiendo diferentes esquemas de reacción, en cada uno de los cuales la fase reactiva desempeña un papel específico. Así, la fase reactiva en un (bio)sensor de fibra óptica puede comportarse como (a) reactivo, (b) absorbente/extractante, (c) catalizador o (d) sustrato.

a) Reactivo.

Las reacciones analíticas en las que la fase sensible interviene como reactivo se pueden clasificar en: reacciones estequiométricas y reacciones indicadoras.

* **Reacciones estequiométricas.** En la práctica, la gran mayoría de los métodos espectrofotométricos y fluorimétricos están basados en reacciones estequiométricas en las que el analito reacciona con un exceso de reactivo dando lugar a un producto con propiedades ópticas. Estas reacciones pueden y, de hecho, son utilizadas en la construcción de (bio)sensores ópticos.

La fase reactiva contiene todos los componentes necesarios para la formación del producto. Sin embargo, este tipo de reacciones presentan serios inconvenientes para su aplicación en la fabricación de optodos. Uno de ellos es la propia naturaleza *irreversible* de la reacción. Puesto que todo el analito que entra en contacto con la fase reactiva reacciona para formar el producto, la cantidad de éste se incrementa continuamente hasta que el reactivo es consumido por completo. Esto limita el tiempo de vida del sensor y complica la calibración, especialmente cuando el parámetro óptico medido no varía de forma lineal con la cantidad de producto formado. Además, los (bio)sensores basados en reacciones estequiométricas precisan de un cuidadoso control de las condiciones experimentales en lo que se refiere a la eficacia de la *transferencia de masa* del analito y la mayoría de ellos sólo sirven para un único análisis. Se han descrito sensores para H₂S (Narayanaswamy et al., 1988) y Cl₂ (Momim et al., 1991) basados en este tipo de reacciones.

* **Reacciones indicadoras.** En el contexto de los (bio)sensores químicos, las reacciones indicadoras se prefieren a las estequiométricas porque proporcionan una respuesta *reversible* que no depende de la eficacia de la transferencia de masa del analito (aunque otras variables como el tiempo de respuesta sí dependen de la transferencia de masa).

Habitualmente, las reacciones en las que la fase reactiva participa como indicador suponen la formación de un producto acompañado de un cambio en las propiedades ópticas de la fase reactiva. Es posible determinar, midiendo el cociente de las señales a dos longitudes de onda diferentes, las cantidades relativas de indicador “libre” y “asociado”, que a su vez están relacionadas con la concentración de analito a través de la siguiente expresión:

$$[A] = K_{in} [InA]/[In] \quad (4)$$

donde A representa el analito; In, el indicador y K_{in} la constante de equilibrio de la reacción.

TABLA III. EJEMPLOS DE REACCIONES INDICADORAS UTILIZADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE BIOSENSORES.

| TIPO DE REACCIÓN | ANALITO | REFERENCIA |
|--|-----------------|--------------------------|
| <i>Ácido-base</i> | pH | Kirkbright et al., 1984. |
| | CO ₂ | Vurek et al., 1983. |
| | NH ₃ | Caglar et al., 1987. |
| <i>Formación de complejos</i> | Al(III) | Saari et al., 1983. |
| | Pb(II) | De Oliveira et al., 1992 |
| <i>Intercambio de ligandos</i> | Vapor de agua | Russell et al., 1985. |
| | O ₂ | Zhujun et al., 1984. |
| <i>Desactivación de la luminiscencia</i> | O ₂ | Gehrich et al., 1986. |
| | SO ₂ | Wolfbeis et al., 1988. |
| | Haluros | Urbano et al., 1984. |

Una de las ventajas del empleo de reacciones indicadoras en la construcción de (bio)sensores ópticos es que los dispositivos resultantes presentan una mayor estabilidad y fiabilidad en cuanto a la calibración, ya que la posibilidad de efectuar medidas de intensidades relativas elimina ciertos errores debidos, por ejemplo, a fluctuaciones instrumentales o a la fotodescomposición del indicador. Sin embargo, la respuesta y, sobre todo, el intervalo dinámico útil del dispositivo va a depender de la constante de equilibrio de la reacción, de forma que cualquier factor incontrolado que influya sobre la constante de equilibrio (e.g. la temperatura o la fuerza iónica) puede ser fuente potencial de error.

La mayoría de los (bio)sensores químicos desarrollados hasta la fecha están basados en el empleo de reacciones indicadoras. En casi todos los casos, esta reacción tiene lugar en el estado fundamental; pero hay algunas excepciones como es el caso de la desactivación dinámica de la luminiscencia por el oxígeno molecular, donde dicha interacción tiene lugar en el estado excitado (véase TABLA III).

b) Adsorbente/extractante.

En este caso la fase reactiva *preconcentra* selectivamente un analito cuyas propiedades ópticas son medidas a través de la fibra o bien cuya presencia modifica alguna propiedad óptica de la fase reactiva, como puede ser su índice de refracción. De igual forma, la adsorción/extracción puede servir para *separar* al analito de una matriz que puede interferir en su detección.

Entre los ejemplos descritos en la bibliografía se incluyen un sensor para alcanos en fase gaseosa basado en la extracción mediante el uso de una membrana polimérica (Kawahara et al., 1983) y un sensor para la determinación de gasolinas en agua basado en la adsorción de los hidrocarburos sobre la superficie de una fibra óptica modificada (Giuliani et al., 1984).

c) Catalizador.

La fase reactiva *cataliza* la *transformación del analito* a un producto que difiere en sus propiedades ópticas.

Generalmente, los (bio)sensores ópticos basados en este principio incorporan enzimas como catalizadores en la composición de la fase reactiva. Los biosensores enzimáticos requieren un cuidadoso control de las condiciones experimentales, ya que cualquier factor que afecte a la velocidad de la reacción catalizada o a la eficacia del proceso de transferencia de masa hacia/desde la superficie del sensor, pueden influir sobre la respuesta.

(d) Sustrato.

La *actividad enzimática* se puede medir a través de una fibra óptica en cuyo extremo se encuentra inmovilizado un sustrato adecuado formando parte de la fase reactiva. Sin embargo, estos dispositivos cuentan con los mismos inconvenientes de los (bio)sensores basados en reacciones estequiométricas. Debido a que el procedimiento analítico se basa en el consumo del sustrato inmovilizado, estos (bio)sensores presentan tiempos de vida limitados, son difíciles de calibrar y requieren un control de la velocidad de transferencia de masa.

1.4.7. TÉCNICAS ÓPTICAS DE MEDIDA.

Todos los métodos ópticos de análisis químico y los (bio)sensores de fibra óptica no son una excepción, se basan en la interacción de la radiación electromagnética con la materia.

En el caso de los (bio)sensores ópticos, las técnicas espectroscópicas más utilizadas son la *absorción, reflectancia difusa y luminiscencia*. Considerando que los dispositivos descritos en el presente trabajo se basan en medidas de luminiscencia, concretamente de desactivación dinámica de la luminiscencia, mencionaremos brevemente cuales son los principios básicos de esta técnica.

1.4.7.1. Luminiscencia.

La emisión de luminiscencia se produce cuando se libera en forma de luz la energía de un estado electrónicamente excitado. Dependiendo de si el estado excitado es un estado singlete o triplete, la emisión recibe el nombre de *fluorescencia* o *fosforescencia*, respectivamente. Para la aplicación en la construcción de optodos, se ha recurrido con mayor frecuencia a la fluorescencia que a la fosforescencia, dado el mayor número de reacciones indicadoras fluorescentes conocidas que pueden ser utilizadas para la determinación continua y reversible de analitos.

Por otra parte, si se compara con la fotometría convencional, las técnicas luminiscentes son generalmente más sensibles y selectivas, ofrecen mayor versatilidad y son compatibles con la medida utilizando una única fibra ya que la excitación y la emisión poseen distinta frecuencia. Por todo ello, el número de optodos basados en medidas de luminiscencia se ha incrementado considerablemente en los últimos años (*Lübbbers, 1992*).

A la hora de desarrollar un optodo basado en medidas de luminiscencia es posible diferenciar tres casos: 1) el analito es un luminóforo, 2) el reactivo indicador presenta propiedades luminiscentes que varían como resultado de la interacción del mismo en el estado fundamental con el analito, y 3) la emisión luminiscente del reactivo disminuye debido a la interacción del mismo en el estado excitado con el analito (*desactivación dinámica* de la emisión, aumento de la misma o un efecto de

transferencia de energía entre dos indicadores que pueden ser ambos luminiscentes o bien uno sólo).

Los (bio)sensores de fibra óptica basados en medidas de luminiscencia pueden detectar variaciones en la *intensidad de emisión*, en el *tiempo de vida de emisión* del estado excitado o bien en la *polarización* de la radiación (si bien este último parámetro no ha sido explotado).

a) Intensidad de emisión de luminiscencia. La relación entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de analito viene expresada por la siguiente ecuación:

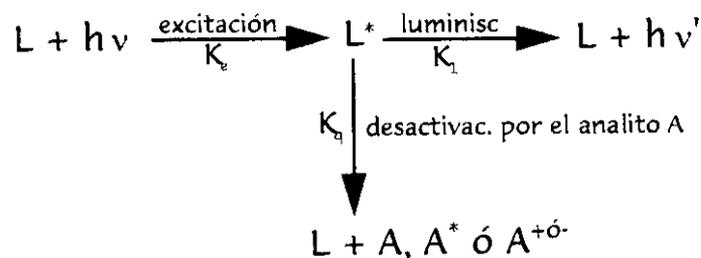
$$I = 2.3 I_0 \Phi \epsilon C l K \left[1 - \frac{2.3 \epsilon C l}{2!} + \frac{(2.3 \epsilon C l)^2}{3!} + \dots \right] \quad (5)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz de excitación, ϵ es el coeficiente de absorción molar a la longitud de onda de excitación del luminóforo, Φ es el rendimiento cuántico de emisión de luminiscencia de la sustancia luminiscente, l es el paso óptico, y 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 detectada realmente.

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

$$I = 2.3 I_0 \Phi \epsilon C l K \quad (6)$$

Por otro lado, existen analitos que desactivan la fluorescencia y/o fosforescencia de muchos indicadores, como es el caso del oxígeno que puede considerarse como uno de los más eficaces desactivadores dinámicos de la luminiscencia. El mecanismo general de desactivación de la luminiscencia es el que aparece representado en el siguiente esquema:



La desactivación del estado excitado del indicador es un proceso dinámico que implica un choque entre la molécula del indicador y el analito, de ahí que en algunas ocasiones también se denomine “desactivación colisional”. La teoría establece que el proceso de desactivación de la luminiscencia obedece a la ecuación de Stern-Volmer (Stern et al., 1919).

$$I_0/I = 1 + K_{sv} [Q] \quad (7)$$

en donde, I_0 e I son las intensidades de emisión en ausencia y en presencia del desactivador, respectivamente, $[Q]$ es la concentración del desactivador y K_{sv} es la denominada constante de Stern-Volmer que es igual al producto de la constante 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, de K_{sv} depende la naturaleza y viscosidad del disolvente, de la temperatura y, por supuesto, de la naturaleza del luminóforo. Aunque la ecuación (6) predice una relación lineal entre I_0/I y $[Q]$, cuando el indicador se encuentra soportado en una fase heterogénea, se pueden obtener desviaciones de la linealidad, debidas sin duda a la diferente accesibilidad para el analito de las moléculas de luminóforo inmovilizado, habiendo sido desactivadas la mayoría de ellas al aumentar la concentración del desactivador.

Las ventajas de utilizar medidas de intensidad de emisión de luminiscencia en (bio)sensores de fibra óptica son, entre otras, la gran sensibilidad, selectividad, versatilidad y flexibilidad espacial que la técnica ofrece. No obstante, pueden aparecer interferencias provocadas por desactivadores distintos al analito, producirse efecto de filtro interno, o bien ser necesario el empleo de fuentes de luz UV para la excitación o fuentes muy intensas que puedan originar la fotodescomposición del indicador. Finalmente, la medida de la intensidad absoluta de emisión se va a ver afectada por las fluctuaciones de la intensidad de la lámpara y la respuesta del detector, así como por las características de transmisión de la fibra.

Las medidas de *fosforescencia* son más sensibles que las de fluorescencia ya que los tiempos de vida de emisión fosforescente son mayores y la concentración de

desactivador necesaria para alcanzar la misma eficiencia de desactivación que la fluorescencia es unas $10^3 - 10^5$ veces inferior.

Los *sensores quimioluminiscentes* (aquellos en los que el estado excitado se ha generado a partir de una reacción química) tienen la ventaja de utilizar una instrumentación más sencilla que los anteriores, al no requerir una fuente de luz y, además, permiten alcanzar muy bajos límites de detección e intervalos dinámicos de medida grandes. Sin embargo, presentan el inconveniente de que la fase reactiva debe ser transparente a la luz y que los productos de la reacción química pueden actuar como desactivadores de la emisión.

b) Tiempo de vida de emisión. Se define como la inversa de la suma de todas las constantes cinéticas de los procesos que desactivan el estado excitado. En el caso de decaimientos monoexponenciales, el tiempo de vida se define como el tiempo en el que sólo $1/e$ de la población inicial, aún se encuentra en el estado excitado (Suppan, 1994). Los tiempos de vida típicos de fluoróforos varían entre 2 - 20 ns, mientras que los tiempos de vida de fosforescencia son mayores, del orden de $1 \mu\text{s} - 10 \text{s}$. El tiempo de vida se obtiene como valor medio de un número de moléculas estadísticamente significativo.

Los sensores ópticos basados en medidas de tiempos de vida son útiles, siempre y cuando el analito afecte al tiempo de vida de emisión del indicador o bien al tiempo de vida de alguna de las moléculas que intervienen en un sistema de transferencia de energía. En el caso de optodos basados en la desactivación dinámica de la luminiscencia, es posible determinar la concentración del analito mediante medidas de intensidad y/o tiempos de vida, ya que el proceso va acompañado de una disminución del tiempo de vida de emisión.

De acuerdo con la ecuación de Stern-Volmer, la relación entre el tiempo de vida en ausencia (τ_0) y en presencia de un desactivador (τ) viene dada por:

$$\tau_0 / \tau = 1 + k_o \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad (8)$$

en la que existe una relación lineal entre la concentración del desactivador Q y τ_0 / τ .

El tiempo de vida de moléculas luminiscentes se puede cuantificar por dos métodos distintos. Ambos pueden aplicarse a la construcción de optodos:

1. *Método de detección con resolución temporal.* La muestra se excita con un pulso de luz corto midiéndose la desaparición de la luminiscencia en función del tiempo.

2. *Método de detección sensible a la fase.* La muestra se excita con luz modulada sinusoidalmente midiéndose el desfase provocado por el tiempo de vida finito del estado excitado, entre la función de excitación y la de emisión.

Las medidas de tiempos de vida no se han explotado mucho hasta la fecha de cara a la construcción de sensores debido, fundamentalmente, a que la instrumentación es compleja y costosa; sin embargo las técnicas basadas en medidas de tiempos de vida presentan ventajas sobre las medidas de intensidad (*Schulman, 1988; Wolfbeis, 1991; Lippitsch et al., 1993*). Entre ellas podemos citar las siguientes: 1) el tiempo de vida es independiente de la concentración del luminóforo, por lo que la variación de su concentración (por fotodescomposición o “lavado” de la fase reactiva) no afecta a la señal analítica; 2) el tiempo de vida no se ve afectado por las posibles fluctuaciones instrumentales debidas a la fuente o al detector; 3) pueden emplearse fibras de gran longitud (hasta 1 Km) sin que varíe la exactitud ni la precisión en la medida del tiempo de vida (éste debe ser superior a 1 ns). Por todo ello, hay un considerable interés en los últimos años por la búsqueda de indicadores con tiempos de vida relativamente largos (e.g. del orden de microsegundos o mayores) de forma que se pueda reducir el costo de los dispositivos experimentales empleados.

1.4.8. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DE LOS OPTODOS.

Los principales factores que definen la calidad de un optodo son la *sensibilidad, selectividad, estabilidad, reversibilidad y tiempo de respuesta*. En el caso de los sensores *extrínsecos* en los que la fibra óptica actúa como simple “guía de luz”, sin participar de forma activa en el proceso de reconocimiento, las características analíticas del dispositivo serán, en general, las propias de cada una de las técnicas en que se basan.

Sin embargo, en aquellos sensores que implican la existencia de fases heterogéneas (reactivo, soporte, membrana...), además de los elementos que

componen el sensor óptico, éstas tendrán una importancia grande en su respuesta y habrá que tener en cuenta el principio de medida en que se basan (fluorescencia, reflectancia...).

Sensibilidad. En general, los sensores basados en medidas de fluorescencia, son más sensibles que aquellos que emplean la técnica de reflectancia, si bien no siempre es posible encontrar un indicador o una reacción que nos permita determinar analitos mediante técnicas fluorescentes.

Otros factores determinantes a la hora de estudiar las características analíticas de estos dispositivos son el tipo de soporte polimérico y el método de inmovilización seleccionado. Cuando se emplea un soporte sólido es necesario considerar que tanto las características intrínsecas del reactivo (e.g. pK de los indicadores, efecto de la fuerza iónica, actividad y pH óptimo de funcionamiento en el caso de las enzimas) como las reacciones que van a transcurrir en él pueden verse modificadas respecto a lo que ocurre en disolución. En muchas ocasiones, la inmovilización del reactivo conduce a un aumento de sensibilidad, debido a las posibilidades de preconcentración de la muestra en fase sólida. En otras, por el contrario, se observa que el proceso de inmovilización puede dar lugar a una disminución de la sensibilidad. Así, por ejemplo, la eficacia del proceso de desactivación dinámica de la fluorescencia de un reactivo soportado puede verse reducida drásticamente al limitarse la accesibilidad del analito al indicador.

Selectividad. Depende, al igual que en el caso anterior, de la combinación de dos factores: la química involucrada en el proceso de reconocimiento y la técnica de detección. Normalmente, las biomoléculas proporcionan mayor selectividad que los reactivos de tipo químico. De igual modo, las técnicas *luminiscentes* en sus diferentes versiones son más selectivas que los métodos espectrofotométricos. Por último, en algunos casos el empleo de membranas que permiten el paso selectivo del analito a la fase reactiva contribuyen de forma importante a la selectividad del optodo.

Reversibilidad. Idealmente todos los (bio)sensores de fibra óptica deberían ser completamente reversibles, lo que permitiría el uso indefinido del sensor y la monitorización en continuo del analito. Sin embargo, es el *tipo de interacción* entre el analito y la fase reactiva lo que determina la reversibilidad del optodo. Un ejemplo

típico de optodos reversibles son los sensores de pH y aquellos basados en procesos de desactivación dinámica de fluorescencia.

Tiempo de respuesta. Una situación muy común en el caso de los (bio)sensores de fibra óptica es que analito e indicador se encuentren en distintas fases. En este caso, el factor limitante del tiempo de respuesta del sensor es la necesaria etapa de *transferencia de masa* entre ambas fases. Además, en aquellos sensores constituidos por dos fases separadas por una membrana, la *difusión* a través de la misma, también afecta al tiempo de respuesta. Un tamaño grande de poro proporciona una rápida respuesta, pero va acompañado de una menor selectividad, por lo que a la hora de seleccionar la membrana permeable al analito debe optarse por un compromiso entre selectividad y tiempo de respuesta. Asimismo, en algunos sensores el tiempo de respuesta es función de la *concentración de analito*. Esto es bastante frecuente en el caso de sensores de pH, en los que el tiempo de respuesta a pH neutro puede ser mayor que a pH ácido o básico. En estos casos, los métodos alternativos propuestos para la calibración de los sensores incluyen la medida a un tiempo fijo antes de que se alcance el equilibrio, o bien medir la variación de la pendiente (cambio de la señal analítica con el tiempo) en función de la concentración.

Estabilidad y tiempo de vida útil del sensor. Va a depender fundamentalmente de las características del reactivo indicador y del método de inmovilización seleccionado. En algunos casos, los reactivos inmovilizados sufren una *degradación* debido a la acción de la luz, la temperatura o a las soluciones empleadas para su regeneración.

Un problema que afecta drásticamente a la estabilidad de los sensores luminiscentes es la *fotodegradación* del fluoróforo. En el caso de optodos enzimáticos o de sensores irreversibles, el tiempo de vida útil de los mismos dependerá de la velocidad a la que se desactive la enzima, o bien de la velocidad a la que se consuma el reactivo.

Como conclusión, podemos decir que en la actualidad los sensores químicos de fibra óptica constituyen un nuevo pilar de la Química Analítica, que complementa a otras técnicas analíticas existentes como son la Espectrofotometría, Cromatografía, Electroquímica y Quimiometría. Además, se trata de un campo de investigación

multidisciplinar que requiere la cooperación de expertos en distintos áreas científicas tales como la Química, Ingeniería, Ciencias de los Materiales, Medicina, Biotecnología, entre otras.

1.4.9. CAMPOS DE APLICACIÓN DE LOS (BIO)SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.

Las áreas en las que han encontrado mayor aplicación los (bio)sensores de fibra óptica (véase TABLA IV) son generalmente aquéllas en las 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 final (Wolfbeis, 1991; Hall, 1991; Sethi, 1994).

TABLA IV. APLICACIONES POTENCIALES DE LOS (BIO)SENSORES DE FIBRA ÓPTICA.

| |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">• Diagnóstico Clínico y Biomedicina. Análisis de drogas terapéuticas, gases anestésicos, gases respiratorios, metabolitos, electrolitos.• Control de la Contaminación Medioambiental. Detección de especies tóxicas en aire, agua y suelos; control de efluentes industriales.• Control de Procesos Industriales. Monitorización durante procesos de fermentación, producción de alimentos y bebidas, control de calidad, detección de residuos tóxicos y peligrosos, gases inflamables.• Análisis Agrícola y Veterinario. Diagnóstico de enfermedades de plantas y animales, detección de compuestos tóxicos en aguas y zonas de cultivo, medida de la demanda bioquímica (DBO), control de calidad de productos hortofrutícolas y productos cárnicos.• Seguridad/ Defensa. Detección y/o diagnóstico de especies nocivas y agentes biológicos tales como explosivos, gases nerviosos, micotoxinas, virus, bacterias patógenas y toxinas biológicas.• Robótica. Desarrollo de dispositivos automatizados para aplicaciones en ambientes hostiles, aplicaciones domésticas, vehículos, etc. |
|--|

Aplicaciones Biomédicas. Es, sin duda, uno de los mayores campos de aplicación de los (bio)sensores de fibra óptica. Esto es debido, en gran parte, a la posibilidad de los optodos para realizar medidas *on line* y en *tiempo real*, lo cual juega un papel muy importante en ciertas situaciones de riesgo (enfermos en unidades de vigilancia intensiva o pacientes sometidos a una intervención quirúrgica).

Las tendencias de la Medicina actual se orientan hacia el diagnóstico preventivo. En este sentido, la determinación de analitos de interés clínico tales como glucosa, creatinina, urea, colesterol, triglicéridos y otros, es objeto de una intensa investigación con objeto de producir dispositivos capaces de monitorizar en continuo y de forma automática estas especies. Aparte de sensores para estos analitos que están presentes en concentraciones elevadas, hay una considerable demanda de bio e inmunosensores para sustratos minoritarios como es el caso de hormonas y esteroides, entre otros.

Existen disponibles en el mercado algunos optodos para aplicaciones clínicas como es el caso del CDI-3M Healthcare System 300 diseñado para la monitorización en continuo del pH y gases en sangre. Asimismo, también existen catéteres de fibra óptica para la detección del nivel de saturación de oxígeno en sangre, basados en la medida de la relación de hemoglobina/oxihemoglobina.

Aplicaciones Medioambientales. El control de los niveles de especies contaminantes en aguas, aire y suelos se ha convertido en uno de los objetivos prioritarios de todos los programas de protección medioambiental.

La capacidad de las fibras ópticas para realizar medidas "*in situ*", en ambientes *inaccesibles* o "*peligrosos*" (ambientes explosivos o centrales nucleares), así como su capacidad para transmitir señales a largas distancias, hacen de los optodos instrumentos ideales para la monitorización en continuo de la contaminación medioambiental.

Las especies de interés incluyen desde la determinación de la demanda bioquímica (DBO) y el pH del agua de los ríos, hasta analitos más específicos, tales como detergentes, fertilizantes, herbicidas, etc..

Control de procesos. El control de (bio)procesos industriales se está convirtiendo, poco a poco, en una de las áreas de mayor aplicación de los (bio)sensores de fibra óptica (Scheper et al., 1996). La eficacia de la producción y la calidad del producto final dependen, en gran medida, del control del proceso de producción. Cada vez con mayor frecuencia, los optodos están reemplazando a las técnicas de muestreo clásico y la Química Analítica está evolucionando de forma que se lleva el laboratorio a la muestra, en este caso, a la planta industrial.

Las especificaciones que deben cumplir los (bio)sensores de fibra óptica para su utilización industrial dependen, en gran parte, del área de aplicación concreta, aunque generalmente se requiere en todas ellas tiempos de respuesta mínimos, sensibilidad y selectividad adecuadas, miniaturización, bajo coste y fiabilidad.

Bioteología. Uno de los más recientes campos de aplicación de los (bio)sensores de fibra óptica es la Bioteología, donde los procesos involucrados requieren condiciones estrictas de *esterilización y estabilidad a largo plazo*. Se han hecho esfuerzos para la monitorización de analitos tales como O₂, pH, CO₂, glucosa y glutamato en procesos de fermentación, mediante el empleo de optodos. Sin embargo, los problemas asociados con la adsorción de proteínas sobre el terminal sensible, así como la necesaria esterilización de la fase sensible en contacto con el medio de cultivo, aún no se han resuelto satisfactoriamente.

TABLA V. EVOLUCIÓN DEL MERCADO MUNDIAL DE BIOSENSORES (\$M).

| ÁREA | 1990 | 1995 | 2000* |
|--------------------------------|-----------|------------|------------|
| <i>Diagnóstico Clínico</i> | 20 | 85 | 450 |
| <i>Análisis Industrial</i> | 3 | 30 | 145 |
| <i>Agricultura/Veterinaria</i> | 2 | 50 | 100 |
| <i>Defensa</i> | 2 | 15 | 85 |
| <i>Medio Ambiente</i> | 2 | 20 | 35 |
| <i>Robótica</i> | 1 | 5 | 10 |
| <i>Otras</i> | — | 10 | 20 |
| Total | 35 | 240 | 895 |

* Valores estimados.

Hay que mencionar que, a pesar del enorme potencial de estos dispositivos, hasta la fecha se han comercializado muy pocos (bio)sensores de fibra óptica. La razón es muy simple: la mayoría de los optodos disponibles actualmente no cumplen muchos de los requisitos mencionados en el capítulo 1.3. para su aplicación en análisis rutinarios. Además, las compañías fabricantes de instrumentación analítica, a menudo, han ignorado los (bio)sensores de fibra óptica entre sus objetivos. Sin embargo y a pesar de todo, en la presente década el mercado mundial de (bio)sensores está experimentando una notable progresión al alza, particularmente en el campo de las aplicaciones clínicas (veáse TABLA V).

1.4.10. FUTURAS TENDENCIAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE (BIO)SENSORES.

Las tendencias actuales apuntan que en el futuro la investigación en el campo de los (bio)sensores se centrará en los siguientes puntos:

- a) Desarrollo de *nuevos esquemas* de reacción.
- b) Síntesis de nuevos indicadores.
- c) Mejora de los dispositivos existentes, en cuanto a materiales y componentes.
- d) Acoplamiento de los sensores existentes a otras técnicas analíticas como, por ejemplo, la cromatografía (*técnicas "acopladas"*).
- e) Desarrollo de *sensores o "sondas" desechables* de bajo coste, preferibles en algunos casos a los sensores regenerables.
- f) Desarrollo de *sensores no-invasivos*.
- g) Desarrollo de sensores para *análisis multielemental* con una única fase reactiva.
- h) Desarrollo de sensores distribuidos a lo largo de una única fibra óptica para un mismo o varios analitos.

1.5. BIBLIOGRAFÍA.

- Alvárez-Icaza, M y Bilitewski, U . *Anal. Chem.*, 1993, 65, 11, 525A.
- Boisdé, G. “*Les capteurs chimiques a fibres optiques. Realités et perspectives*”.
Entropía., 1990, 155, 28.
- Boisdé, G y Perez, J.J . *La vie des Sciences, Compt. Rend. Acad. Sci.*, 1988, 5, 303.
- Byfield, M.P y Abuknesha, R.A . *Biosens. and Bioelectronics.*, 1994, 9, 373.
- Caglar, P y Narayanaswamy, R . *Analyst*, 1987, 112, 1285.
- Cámara, C; Moreno-Bondi, M.C y Orellana, G. “Chemical sensing with fiber-optic devices” en “*Biosensors with fiber-optics*”. L.B. Windgard Jr. y D.L. Wise (eds.). The Humana Press, Clifton, New Jersey, 1991.
- Carr, P.W y Bowers, L.D (eds.). “*Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry, Fundamentals and Applications*”, vol.56, Wiley & Sons, New York, 1980.
- Culshaw, B. *J. Optical. Sensors*, 1986, 1, 327.
- Dakin, J.P. *Proc. SPIE- Int. Soc. Opt. Eng.*, 1983, 374, 172.
- Dave, B.C; Dunn, B; Valentine, J.S y Zink, J.I . *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1120A.
- De Oliveira, W.A y Narayanaswamy, R . *Talanta.*, 1992, 39, 1499.
- Demas, J.D. *J. Chem. Educ.*, Oct. 1983, 60, 803.
- Demas, J.D y DeGraff, B.A . *Anal. Chem.*, 1991, 63, 829A.
- Dremel B.A.A; Schaffar, B.P.H y Schmid, R.D . *Anal. Chim. Acta*, 1989a, 225, 293.
- Dremel B.A.A; Trou-Kriegeskorte, G; Schaffar, B.P.H y Schmid, R.D. “*Biosensors, Application in Medicine, Environmental Protection and Process Control*”, GBF Monographs, vol. 13, Schmid, R.D, Scheller, F (eds.). VCH Verlag, Weinheim, 1989b.
- Dremel B.A.A; Schmid, R.D; Wolfbeis, O.S . *Anal. Chim. Acta*, 1991, 248, 351.
- Geckeler, K.E y Müller, B . *Naturwissenschaften*, 1993, 80, 18.

- Gehrich, J.L; Lübbers, D.W; Opitz, N; Hansmann, D.R; Miller, W.W; Tusa, J.K y Yafuso, M. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 1986, BME-33, 117.
- Giuliani, J.F y Jarvis , N.L . *Sens. and Actuators*, 1984, 6, 107.
- Goldfinch, M.J y Lowe, C.R . *Anal. Biochem.*, 1984, 138, 430.
- Guilbault, G.G. "*Handbook of Enzymatic Analysis*". Marcel Dekker, New York, 1977.
- Guilbault, G.G. "*Analytical Uses of Immobilized Enzymes*". Marcel Dekker, New York-Basel, 1984.
- Hall, E.A.H. "The Biomolecule Reviewed" en "*Biosensors*". Prentice Hall Advanced Reference Series. Englewood, New Jersey, 1991.
- Hansen, E.H. *Anal. Chim. Acta*, 1992, 261, 125.
- Hawcroft, D. "*Diagnostic Enzymology*". Analytical Chemistry by Open Learning. John Wiley and Sons. London, 1987.
- Hirschfeld, T; Deaton, T; Milanovich, F y Klainer, S.M. *EPA Report 600/7-84-067*, Environmental Protection Agency, 1984.
- Jones, T.P y Porter, M.D . *Anal. Chem.*, 1988, 60, 404.
- Juris, A; Balzani, V; Barigelletti, F; Campagna, S; Belser, P y von Zelewski, A. *Coord. Chem. Rev.*, 1988, 84.
- Kawahara, F.K; Fiutem, R.A; Silvus, H.S; Newman, F.M y Frazar, J.H. *Anal. Chim. Acta*, 1983, 151, 315.
- Kirkbright, G.F; Narayanawasmy, R y Welti, N.A . *Analyst*, 1984, 109, 12.
- Klainer, S.M; Goswami, K; Dandge, D.K.; Simon, S.J, Herron, N.R; Eastwood, D.L y Eccles, L.A. "*Environmental Monitoring Applications of Fiber Optic Chemical Sensors*" en "*Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors*", vol. 2, Wolfbeis, O.S (ed.), CRC Press, Florida, 1991.
- Kulp, T.J; Camins, I; Angel, S.M; Munkholm, C y Walt, D.R. *Anal. Chem.*, 1987, 59, 2849.
- Kulp, T.J; Camins, I y Angel, S.M . *Proc. SPIE.*, 1988, 906, 134.

- Lev, O. Tsionsky, M; Rabinovich, L; Glezer, V; Sampath, S; Pankratov, I y Gun, J. *Anal. Chem.*, 1995, 67, 22A.
- Lippitsch, M.E y Draxler, S. *Sens. and Actuators B*, 1993, 11, 97.
- Lübbbers, D.W. "Fluorescence Based Chemical Sensors" en "Advances in Biosensors", vol 2, 1992, JAI Press Ltd.
- Lübbbers, D.W; Völkl, K.P; Grossmann, U y Opitz, N. *Progress in Enzyme and Ion Selective Electrodes*, Springer Verlag, Berlin, 1981.
- Luo, S y Walt, D.R. *Anal. Chem.*, 1989, 61, 1069.
- Marko-Varga, G y Domínguez, E. *Trends in Anal. Chem.*, 1991, 10, 159.
- Malmros, M.K; Gulbinski, J y Gibbs, N.B. *Biosensors*, 1987, 3, 71.
- Mann-Buxbaum, E; Pittner, F; Schalkhammer, T; Jachimowicz, A; Jobst, G; Olcaytug, F y Urban, G. *Sens. and Actuators B*, 1990, 518.
- Modlin, D.N y Milanovich, F.P. "Instrumentation for Fiber Optic Chemical Sensors" en "Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors", vol. 1, Wolfbeis, O.S. (ed.), CRC Press, Florida, 1991.
- Momin, S.A y Narayanaswamy, R. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 244, 71.
- Moreno-Bondi, M.C; Wolfbeis, O.S; Leiner, M.J.P y Schaffar, B.P.H. *Anal. Chem.*, 1990, 62, 2377.
- Narayanaswamy, R y Sevilla, F. *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, 1988, 329, 789.
- Narayanaswamy, R y Sevilla, F. *Anal. Lett.*, 1988, 21, 1165.
- Norris, J.O.W. *Analyst*, 1989, 114.
- Peppas, N.A (ed.). "Preparation, Methods and Structures of Hydrogels", CRC Press, Boca Raton, FL, 1986.
- Ratner, B.D. "Biomedical applications of hydrogels: a critical appraisal" en "Biocompatibility of Clinical Implant Materials". CRC Series in Biocompatibility, vol. 2, Williams, D.F (ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1981.
- Rhines, T.D y Arnold, M.A. *Anal. Chim. Acta*, 1989, 227, 387.
- Robb, W.L. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1968, 146, 119.

- Russell, A.P y Fletcher, K.S . *Anal. Chim. Acta*, 1985, 170, 209.
- Saari, L y Seitz, W.R . *Anal. Chem.*, 1982, 54, 821.
- Saari, L y Seitz, W.R . *Anal. Chem.*, 1983, 55, 667.
- Schaffar, B.P.H; Wolfbeis, O.S. "Chemically Mediated Fiber Optic Biosensors", en "Biosensors. Principles and Applications", Blum, I.J, Coulet, P.R (eds.), Marcel Dekker, New York, 1991.
- Scheper, T.H; Hilmer, J.M; Lammers, F; Müller, C y Reinecke, M. *J. of Chromatography A*, 1996, 725, 3.
- Schulman, S.G. "Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications", vol 2, Wiley: New York, 1988.
- Seitz, W.R. *Anal. Chem.*, 1984, 56, 16A.
- Seitz, W.R. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1988, 19, 135.
- Sethi, R.S. *Biosens. and Bioelectronics*, 1994, 9, 243.
- Sharma, B.P; Bailey, L.F y Messing, R.A . *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1982, 21, 837.
- Stern, O y Volmer, M . *Physik. Z.*, 1919, 20, 183.
- Stern, S.A; Shah, V.M y Hardy, B.J . *J. Polym. Sci. B*, 1987, 25, 1263.
- Suppan, P. "Chemistry and Life", Royal Society of Chemistry, Cambridge, Gran Bretaña, 1994.
- Tran-Minh, C. *Ion-Selective Electrode Rev.*, 1985, 7, 41.
- Trettnak, W; Leiner, M.J.P y Wolfbeis, O.S . *Analyst*, 1988, 113, 1519.
- Trettnak, W. *Optical Biosensors Based on Immobilized Enzymes*. Tesis Doctoral, KF University, Graz (Austria), 1989.
- Trettnak, W; Leiner, M.J.P y Wolfbeis, O.S . *Biosensors*, 1989, 4, 15.
- Trettnak, W y Wolfbeis, O.S . *Anal. Lett.*, 1989a, 22, 2191.
- Trettnak, W y Wolfbeis, O.S . *Anal. Biochem.*, 1990, 184, 124.
- Tsuji, I; Eguchi, H; Yasukouchi, K; Unoki, M y Taniguchi, I. *Biosens. and Bioelectronics*, 1990, 5, 87.

- Urbano, E; Offenbacher, H y Wolfbeis, O.S . *Anal. Chem.*, 1984, 56, 427.
- Valcárcel, M y Luque de Castro, M.D , *Analyst*, 1993, 118.
- Valcárcel, M y Luque de Castro, M.D. “Flow-through (Bio)chemical Sensors”.
Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, vol. 16. Elsevier Science,
Amsterdam, 1994.
- Völkl, K.P; Opitz, N y Lübbers, D.W . *Fresenius. Z'. Anal. Chem.*, 1980, 301, 162.
- Vurek, G.G; Feustel, P.J y Severinghaus, J.W . *Ann. Biomed. Eng.*, 1983, 11, 499.
- Walters, B.S, Nielsen, T.J y Arnold, M.A . *Talanta*, 1988, 35, 151.
- Wangsa, J y Arnold, M.A . *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1080.
- Wegscheider, W y Knapp, G . *CRC. Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1981, 11, 79.
- Wolfbeis, O.S y Sharma, A . *Anal. Chim. Acta*, 1988, 208, 53.
- Wolfbeis, O.S y Posch, H.P . *Fresenius. Z'. Anal. Chem.*, 1988, 332, 255.
- Wolfbeis, O.S. *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 1990, 337:522.
- Wolfbeis, O.S. “Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors”, vol. I y II. CRC Press,
Boca Ratón, Florida, 1991.
- Wolfbeis, O.S y Li, H . *Proc. SPIE.*, 1991, 1587.
- Wolfbeis, O.S. *J. of Molecular Structure.*, 1993, 292, 133.
- Woodward, J (ed.). “Immobilized Cells and Enzymes”, IRL Press, Oxford, 1985.
- Yasuda, H y Stannett, V. “Permeability of Polymers” en “Polymers Handbook”. J.
Bandrup, E.H. Immergut (eds.), Wiley, New York, (pp III-232ff), 1975.
- Zhujun, Z y Seitz, W.R . *Anal. Chem.*, 1984, 58, 220.

2. PARTE EXPERIMENTAL.

2.1. REACTIVOS, MATERIALES Y APARATOS GENERALES.

2.1.1. REACTIVOS Y MATERIALES.

2.1.1.1. Soportes para la inmovilización de reactivos.

- Intercambiador catiónico CM-Sephadex[®] C-25 (Pharmacia). Capacidad: 4.5 meq g⁻¹. Tamaño de partícula: 40-125 μm.
- Intercambiador catiónico SP-Sephadex[®] C-25 (Sigma). Capacidad: 2.0-2.6 meq g⁻¹. Tamaño de partícula 40-125 μm.
- Gel de sílice, Partisil[®] (Whatman). Tamaño de partícula: 5 μm; área superficial 350 m² g⁻¹.
- Gel de sílice de fase inversa C₁₈ (Sigma), (tamaño de poro 60 Å, área superficial 500 m² g⁻¹, tamaño de partícula 15-40 μm).
- Vidrio de poro controlado (Sigma), (tamaño de poro 75 μm, 200-400 mesh).
- Polvo de grafito Dicoex. Ultracarbon (Fisher), Ultra F purity ACHESON-38.
- Membrana de Afinidad INMOBILON[®]-AV (Millipore). Tamaño de poro 0.65 μm.
- Membrana de Nylon, ASTM 325-44 (Swiss Silk Bolting Cloth Mfg. Co, CH-9425 Thal/SG, Switzerland). Apertura de malla 44 μm; diámetro hilo 35 μm; espesor 61 μm; 126.6 hilos cm⁻¹; superficie libre 31%.

2.1.1.2. Indicadores.

- Dicloruro del tris[2-(2-pirazinil)tiazol]rutenio(II), abreviadamente Ru(pzth)₃Cl₂ (Orellana et al., 1988).
- Dicloruro del tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), abreviadamente Ru(Φ₂p)₃Cl₂ (Orellana et al., 1988).

2.1.1.3. Reactivos bioquímicos.

- Anhidrasa carbónica (E.C.4.2.1.1, *Bovine erythrocytes*) con una actividad específica de 9000 unidades mg⁻¹ de sólido, (Sigma).

- Colesterol oxidasa (E.C.1.1.3.6, *Streptomyces species*) con una actividad específica de 28 unidades mg^{-1} de sólido, (Sigma).
- Colina oxidasa (E.C.1.1.3.17, *Alcaligenes species*) con una actividad específica de 13 unidades mg^{-1} de sólido, (Sigma).
- Fosfolipasa-D (E.C.3.1.4.4, *Streptomyces chromofuscus*) con una actividad específica de 2650 unidades mg^{-1} de sólido, (Sigma).
- Suero Control Precilip[®], (Boehringer Mannheim).
- Suero Control Precinorm[®] L, (Boehringer Mannheim).

2.1.1.4. Reactivos para la inmovilización.

- Glutaraldehido (50% p/v), (Sigma).
- Cianamida (Carbodiimida), (Sigma).
- Sulfato de dimetilo, 99%, (Aldrich).
- D,L- Lisina, 98%, (Sigma).
- Albúmina de suero bovino (BSA), (Sigma).

2.1.1.5. Reactivos para disoluciones patrón.

- Carbonato sódico anhidro, (Sigma).
- Colesterol (estándar para Cromatografía), (Sigma).
- Colina, (Sigma).
- L, α -Fosfatidilcolina (from Frozen Egg Yolk), (Sigma).
- Glucosa, (Sigma).
- Bilirrubina, (Sigma).
- Hemoglobina, (Sigma).
- Ácido ascórbico, (Merck).
- Ácido úrico, (Merck).
- Creatinina, (Merck).
- Urea, (Scharlau).
- Etanolamina, (Sigma).
- D,L-Serina, (Merck).
- Esfingomielina, (Sigma).
- Lisofosfatidilcolina, (Sigma).

2.1.1.6. Reactivos para la preparación de disoluciones reguladoras.

- Biftalato potásico, (Aldrich).
- Ácido acético, (Merck).
- Acetato sódico, (Carlo Erba).
- Fosfato monobásico, (Sigma).
- Fosfato bibásico, (Sigma):
- Tris(hidroxiometil)aminometano-HCl, (TRIS), (Sigma).
- Pirazol, (Merck).
- Ácido cítrico, (Merck).
- Tetraborato sódico decahidratado, (Sigma).
- Ácido (N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfónico]), (HEPES), (Merck).
- Ácido(N,N-bis[2-hidroxiethyl]-2-aminoetanosulfónico) (BES), (Sigma).
- Glicina, (Merck).

2.1.1.7. Gases.

- Argon, CO₂, N₂, O₂ del 99.99% de pureza, (SEO).
- Gas certificado, con un contenido en CO₂ del 9.90%, (Carbueros Metálicos).

2.1.1.8. Otros reactivos.

- Ácido sulfúrico, 96%, (Carlo Erba).
- Ácido clorhídrico, 36%, (Carlo Erba).
- Hidróxido sódico, 97%, (Panreac).
- Triton X-100, (Sigma).
- Isopropanol, 99.5%, (Carlo Erba).
- Metanol, 99.9%, (Carlo Erba).
- Sulfato magnésico heptahidratado, 99.5% (Merck).
- Cloruro sódico, 99.5%, (Merck).
- Cloruro cálcico, 95%, (Panreac).
- Cloruro amónico, 99%, (Panreac).
- Ácido pirúvico, (Sigma).
- Ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (5% p/v), (Sigma).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y todas las disoluciones acuosas fueron preparadas utilizando agua purificada mediante un sistema Milli-Q (Millipore).

2.1.1.9. Material de análisis por inyección en flujo.

- Bomba peristáltica de 4 canales, (Gilson Minipuls).
- Tubos de Vitón resistentes a los disolventes orgánicos.
- Válvula de inyección de 6 vías, (Omnifit 1106).
- Tubo de Teflón (0.5 mm de diámetro interno).
- Conexiones de Teflón.
- Jeringa de inyección de plástico.

2.1.1.10. Otros materiales.

- Membrana de silicona (Ciba-Corning Sylastic® Sheeting, Medfield, MA).
- Silicona transparente (P.E. 04-1011 QUILOSA) sin carga de gel de sílice.
- Silicona negra (K-26 QUILOSA).
- Membrana de poliéster Mylar tipo D (Dupont) de 175 μm .

2.1.2. APARATOS GENERALES.

- Espectrofotómetro UV-VIS Perkin-Elmer Lambda-3 (Überlingen, FRG) provisto de una estación de datos (modelo 3600).
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 equipado con un fotomultiplicador Hamamatsu R-928 sensible al rojo y conectado a un ordenador IBM PS/50.
- Espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS50B conectado a un ordenador Proview para almacenamiento y tratamiento de datos.
- Espectrofotómetro de fibra óptica Guided Wave 260 (El Dorado Hills, CA) equipado con una lámpara de tungsteno-halógeno de 20W y 6V, un fotomultiplicador sensible al rojo GW PDT-100-1 y conectado a un ordenador Toshiba T3200SX.
- Espectrómetro para medidas de emisión con resolución temporal (Applied-Photophysics) equipado con un láser de colorante NY-60 y conectado a un ordenador HP-98165.

- Espectrómetro para medidas de emisión con resolución temporal SPT (Edinburgh Analytical Instruments FL900) equipado con una lámpara de descarga a baja presión (0.3 bar) en N₂ y un fotomultiplicador Hamamatsu R928 de respuesta extendida enfriado con un Peltier a -27 °C. El control del instrumento, la adquisición de datos y su análisis se realizaron con un computador empleando el Software suministrado por Edinburgh Instruments (versión 3.30).
- Microscopio de fluorescencia Diastar Fotomicroscopy, Reichert-Jung.
- Mezclador de gases Argon-Union Carbide para efectuar mezclas de gases en el intervalo 25 - 100% CO₂, con una precisión de ± 5%.
- Mezclador de gases Aalborg (Monsey, NY) para efectuar mezclas de gases en el intervalo 1 - 25% CO₂, con una precisión de ± 0.2%.
- Fibra óptica bifurcada de vidrio (Dolan-Jenner) de 1.22-m de longitud; diámetro interno de 4-mm en los extremos y 6.35-mm en el extremo común.
- Fibra óptica bifurcada de sílice fundida de haz de 14 fibras (500 μm cada una).
- Fibra óptica bifurcada de sílice fundida (Fiberguide Industries, NJ USA); diámetro interno de 3.5-mm en los extremos y 6-mm en el extremo común
- Célula de flujo de acero inoxidable (termostatizable) de construcción propia.
- Tirador de membranas de construcción propia.
- pH-metro CRISON (modelo 2001) dotado de un electrodo combinado de vidrio calomelanos.
- pH-metro ORION (modelo 710A) dotado de un electrodo combinado de vidrio calomelanos.
- Electrodo de CO₂ ORION (modelo 95 - 02).
- Baño termostático Haake D8-GH con control de temperatura de ± 1 °C.

2.2. DISPOSITIVOS DE MEDIDA.

2.2.1. DISPOSITIVO PARA MEDIDAS DE CO₂.

2.2.1.1. Medidas de Intensidad de luminiscencia.

El sistema empleado para la calibración y medidas de intensidad de luminiscencia con el sensor de CO₂ está formado por un espectrómetro de fibra óptica Guided Wave 260, en el cual la radiación procedente de una lámpara de tungsteno-halógeno de 20 W atraviesa un filtro de banda ancha de 400 nm (Oriel, ancho de banda 50 nm) y se dirige a través de uno de los haces de fibra óptica bifurcada hacia una célula de flujo construida en acero inoxidable (volumen de análisis aproximadamente 20 μL), que aparece representada en la Figura 12.

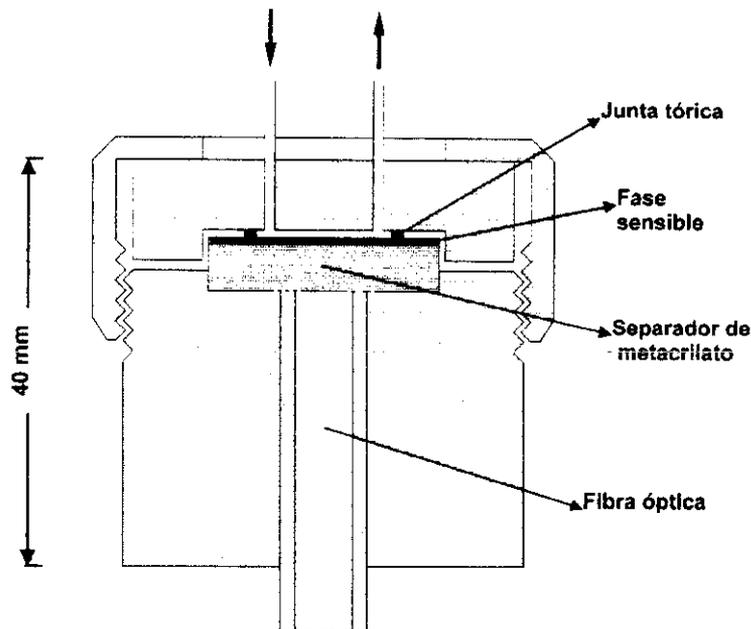


FIGURA 12. Esquema de la célula de flujo empleada para la determinación de CO₂.

La radiación procedente de la muestra se conduce a través de otro haz de fibras al fotomultiplicador atravesando un filtro de corte de 530 nm (Oriel, Statford, CT). Los datos de medida se transfieren, almacenan y procesan en un ordenador Toshiba T3200SX que controla el proceso de medida. El sistema se haya conectado a un mezclador de gases que proporciona continuamente flujos de distinto contenido en CO₂. Estos gases se hacen borbotear a través de disoluciones acuosas antes de pasar a la célula de flujo, teniendo así los denominados "gases húmedos".

2.2.1.1. Medidas de luminiscencia con resolución temporal.

Los tiempos de vida de la emisión del complejo luminiscente ($\tau = 1/\kappa$, donde κ es la constante de la amortiguación exponencial de la emisión) se han determinado mediante la técnica de cronometraje de fotón único (a la que se suele aludir como SPT, del inglés "Single Photon Timing" o TC-SPC, de "Time- Correlated Single Photon Counting") empleando un espectrómetro Edinburgh Instruments FL-900, equipado con una lámpara de descarga a baja presión (típicamente 0.3 bar) en N_2 pulsada a 40000 Hz y con una separación entre electrodos de 1.5 mm. Como detector, se emplea un fotomultiplicador Hamamatsu R928 de respuesta extendida (190 - 850 nm), enfriado con un Peltier a -27 °C. Para las escalas de tiempo largas (> 500 ns de ventana) que, en el caso de los complejos de Ru(II), se hacen imprescindibles, se conectó el equipo a un generador de retrasos externo Ortec 416A. Para las medidas con fibra óptica se ha utilizado un acoplador especial, de diseño propio que se dispone en el compartimento destinado al portacubetas del espectrofotómetro. El extremo común de la fibra óptica bifurcada se introduce en la célula de flujo representada en la Figura 12, donde se sitúa la fase sensible.

El control del instrumento, la adquisición de datos y su análisis se realizaron con un computador Comelta COP 386SX, empleando el Software suministrado por Edinburgh Instruments (versión 3.30). El programa permite la determinación de los tiempos de vida mediante ajuste de los datos experimentales a una curva exponencial (o suma de exponenciales en su caso) utilizando un algoritmo de Marquardt y deconvolución de la respuesta instrumental.

2.2.2. DISPOSITIVO PARA MEDIDAS DE O_2 Y DE LOS BIOSENSORES CON TRANSDUCCIÓN DE O_2 .

El sistema empleado para la calibración y medidas con el sensor de O_2 y/o los biosensores con transducción de O_2 , desarrollados a lo largo de este trabajo, está integrado por un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50 dotado de un acoplador especial para fibra óptica, en combinación con una célula de flujo termostatazada en la que sitúan las membranas sensibles, de diseño equivalente a la presentada en el apartado 2.2.1.1.

La radiación procedente de una lámpara de Xe pulsada es conducida hacia y desde el instrumento a través de un haz de fibras ópticas bifurcadas (Dolan-Jenner, extremo común 6.35-mm en el caso del sensor de O_2 y colesterol; Fiberguide, extremo común 6-mm en el caso del sensor de fosfatidilcolina) cuyo extremo común se introduce en la célula de flujo.

En el caso de las medidas de O_2 , el sistema se haya conectado a un mezclador de gases (Aalborg) que continuamente proporciona mezclas de distinto contenido en O_2 , las cuales son conducidas a través de un tubo de nylon de 6-m de longitud y 1/4-in. (o.d) hasta la célula de flujo. Los datos de medida se transfieren y almacenan en un ordenador IBM-SX55 que controla el proceso de medida.

El dispositivo experimental que se emplea para calibrar los biosensores con transducción de oxígeno (Figura 13) está formado por un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) que consta de una bomba peristáltica (que impulsa la disolución portadora a través de todo el sistema) y una válvula de inyección que permite la introducción de los patrones y las muestras.

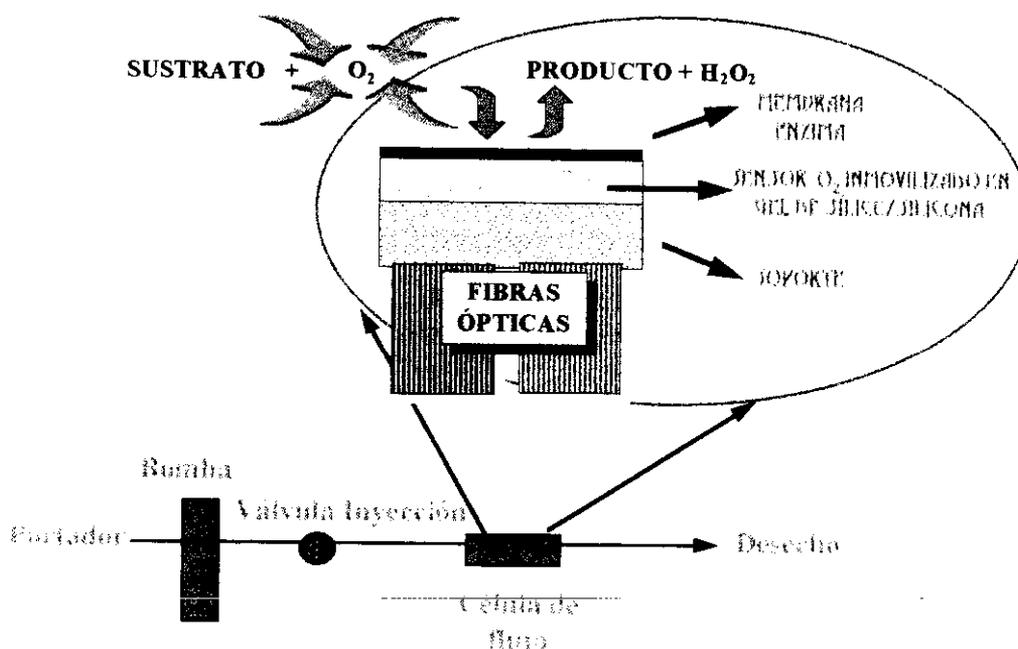


FIGURA 13. Sistema de flujo para los biosensores con transducción de Oxígeno.

2.3. PROCEDIMIENTO OPERATORIO PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LOS (BIO)SENSORES.

2.3.1. SENSOR DE CO₂.

Se prepara una disolución 10^{-4} M de Ru(pzth)₃Cl₂ en agua, a la cual se adicionan posteriormente 50.6 mg de carboximetil-Sephadex C-25. La mezcla se mantiene en la oscuridad durante una hora; a continuación, se filtra a vacío con objeto de eliminar el disolvente y finalmente se deja secar. Por último, se toma una porción (20 mg) de la resina seca con el complejo adsorbido y se equilibra con 20 μ L de una disolución reguladora de hidrógenoftalato (0.1 M y pH 7.25). De esta forma, el Sephadex se hincha y adquiere el aspecto típico de gel. El procedimiento indicado, se repite de la misma forma cuando se utiliza como soporte polimérico el sulfopropil-Sephadex C-25.

2.3.2. SENSOR DE O₂.

Se pesan entre 0.05-75 mg del complejo Ru(Φ_2p)₃²⁺ y se disuelven en 2 mL de acetonitrilo añadiéndose, a continuación, 75 mg del correspondiente soporte sólido (gel de sílice, CPG, gel de sílice modificada, C₁₈ y silicona libre de gel de sílice) en cada caso. La mezcla se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos con agitación y a continuación se elimina el disolvente en un rotavapor. Las partículas de soporte sólido con el complejo adsorbido se mezclan con la silicona transparente en una relación 1:2.6, 1:4 ó 1:8 (p/p) hasta completa homogeneización y, posteriormente, la mezcla se deposita sobre una membrana de Mylar (175 μ m espesor) formando una capa de 75 μ m de espesor, en un dispositivo especial de diseño propio similar a los que se utilizan en cromatografía de capa fina. A continuación, la membrana se deja secar durante 36 horas a 110 °C y, posteriormente, se deposita sobre la primera capa otra capa de 20 μ m de silicona negra (Quilosa) que actúa como aislante de la luz exterior. Las membranas se introducen de nuevo en la estufa a 110 °C durante 36 horas.

Pasado este tiempo se cortan círculos de 2 cm de diámetro que se colocan en la célula de flujo para su medida.

2.3.3. BIOSENSOR DE COLESTEROL.

Se prepara, en primer lugar, la capa sensible al oxígeno, para lo cual se sigue el procedimiento descrito en el apartado 2.3.2.

Una vez que se ha adsorbido el indicador sobre la gel de sílice (Partisil-5 μ m) y preparado la emulsión con silicona, se deposita una capa de 75 μ m sobre una membrana de Mylar. A continuación, con ayuda de un tamiz, se deposita una capa de carbón activo sobre la silicona húmeda y ésta se deja curar durante dos semanas a temperatura ambiente, para evitar un calentamiento que pueda originar la eclosión de las partículas de carbón en el interior de la silicona.

Previamente, el carbón activo se seca en estufa 130 °C durante 90 minutos. A continuación, se pesan 2 g y se agitan con 100 mL de una disolución que contiene 100 mg de carbodiimida en tampón HAc/Ac⁻ 50 mM y pH 4.8 durante 4 horas, a temperatura ambiente.

Una vez secas, se cortan discos de membrana de 2 cm de diámetro y se lavan con agua destilada y con una disolución de etanol al 70%. Se prepara una solución con 2 mg de colesterol oxidasa (ChOD) (28 unidades mg⁻¹) en 75 μ L de disolución fosfato salina (BFS, 20 mM, pH 7.0) a los que se añaden 10 μ L de glutaraldehído al 2.5%, depositándose la mezcla sobre la membrana. Se deja evaporar la solución a temperatura ambiente, aproximadamente durante 6 horas y finalmente se lava con (BFS), almacenándose en este mismo medio a 4 °C cuando no estén usándose.

2.3.4. BIOSENSOR DE COLINA/FOSFATILCOLINA.

En la construcción del biosensor se distinguen dos etapas: 1) Inmovilización de la colina oxidasa y 2) la preparación del biosensor propiamente dicho.

2.3.4.1. Inmovilización sobre carbón activo.

El procedimiento utilizado para la inmovilización de la enzima colina oxidasa sobre una capa de carbón activo depositado sobre una membrana sensible al oxígeno es el mismo que el descrito en el apartado 2.3.3 para la enzima colesterol oxidasa.

2.3.4.2. Inmovilización en membranas de Inmunoafinidad.

Se corta un disco de membrana de inmunoafinidad Inmobilon®-AV (Millipore) de 17-mm de diámetro y se lava con una disolución de tampón fosfato (0.1 M, pH 7.5). A continuación se prepara una disolución que contiene 2 mg de la enzima colina oxidasa disueltos en 50 μ L de tampón fosfato (0.1 M, pH 7.5) y 10 μ L de glutaraldehído al 0.25%. Se sumerge la membrana de Inmobilon®-AV en esta disolución, donde permanece durante 24 horas a 4 °C. Por último, se lava la membrana con tampón fosfato (0.1 M, pH 7.5) y se conserva en este mismo medio a 4 °C hasta su uso posterior.

2.3.4.3. Inmovilización en membranas de nylon.

El método se basa en una modificación del descrito por Hornby y Morris (*Hornby et al., 1975*). En primer lugar, es necesaria una activación del soporte para introducir grupos capaces de enlazarse con la enzima. Se corta un disco de membrana de nylon (ASTM-325-44) de 17-mm de diámetro y se sumerge en un erlenmeyer que contiene 2.6 g de carbonato potásico y 10 mL de sulfato de dimetilo. Se tapa y se introduce en baño de agua a 100 °C durante 15 minutos. El sulfato de dimetilo actúa sobre los enlaces amida del nylon produciéndose imidoésteres. A continuación, y con objeto de detener la reacción, se introduce el erlenmeyer en un baño de hielo durante 10 minutos. Se extrae la membrana ya activada y se lava con metanol absoluto a fin de eliminar el exceso de sulfato de dimetilo sin dañar la estructura del imidoéster formado.

A continuación, se introduce la membrana en una disolución de lisina 0.5 M y pH 9.0 durante 2 horas en condiciones suaves de agitación y, posteriormente, se saca y se lava con NaCl 1 M. Este lavado es seguido de otro con tampón borato 0.1 M y pH 8.5 con objeto de preparar las membranas para la reacción siguiente con el glutaraldehído. La introducción de moléculas espaciadoras de lisina entre el soporte y la enzima permite evitar interferencias de tipo estérico, ya que la enzima se aleja físicamente del soporte.

Para analizar la presencia de grupos amino libres en el soporte, se corta un trozo de la membrana previamente modificada y se añaden unas gotas de un agente revelador: ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico al 0.5% en solución de tetraborato

sódico saturado. La coloración naranja de la membrana indica la presencia de grupos amino libres en su superficie. El blanco se obtiene añadiendo unas gotas de agente revelador a una membrana de nylon no modificada. A continuación, la membrana se trata con una disolución de glutaraldehído al 5% en tampón borato 0.1 M y pH 8.5, durante una hora. En este paso, el grupo amino de la lisina reacciona con el grupo aldehído del agente bifuncional, formándose una base de Schiff. Para eliminar el exceso de glutaraldehído se lavan las membranas con tampón fosfato 0.1 M y pH 7.5.

Se prepara una disolución que contiene 1 mg de la enzima colina oxidasa, 75 μL de una disolución de BSA (4 mg/mL) en tampón fosfato 0.1 M y pH 7.5 y 75 μL de tampón fosfato 0.1 M, pH 7.5, depositándose a continuación sobre la membrana de nylon. Se deja entrecruzar dos horas a temperatura ambiente y posteriormente se introduce en la nevera durante toda la noche. Finalmente, se lava la membrana con tampón fosfato 0.1 M, pH 7.5 y se conserva en la disolución reguladora de trabajo a 4 °C cuando no se usa.

2.4. PROCEDIMIENTO OPERATORIO PARA LA REALIZACIÓN DE LAS MEDIDAS.

2.4.1. SENSOR DE CO₂.

2.4.1.1. Medidas en fase gaseosa.

Las medidas se han realizado utilizando mezclas Ar-CO₂ con un contenido en este último gas que varía entre el 1-25% y el 25-100% dependiendo del mezclador de gases empleado. En la Figura 14 se muestra un esquema del dispositivo experimental empleado para las medidas de CO₂ en fase gaseosa, con el sensor de fibra óptica.

Los gases se hacen borbotear a través de disoluciones acuosas antes de pasar a la célula de flujo, obteniéndose así los denominados “gases húmedos”. En la célula de flujo (descrita en el apartado 2.2.1.1) se sitúa la fase reactiva sobre una placa de poli(metacrilato de metilo) con un orificio central de 3-mm de diámetro y 0.4-mm de profundidad. Una de las entradas de la célula de flujo se conecta a un tubo de silicona que transporta los gases correspondientes y la otra se deja abierta al exterior. Esta misma célula de flujo se utilizará posteriormente para las medidas en disolución

acuosa (ver Figura 12). Como señal de referencia se toma la correspondiente al 0% de CO_2 , obtenida al pasar una corriente de Ar a través de la célula de flujo. A continuación, tras alcanzar el equilibrio, se van alternando las distintas mezclas de gases húmedos empleadas en el calibrado. El contenido exacto de CO_2 en cada una de las mezclas, se obtiene a partir del calibrado previo del mezclador de gases, mediante el método de la burbuja de jabón.

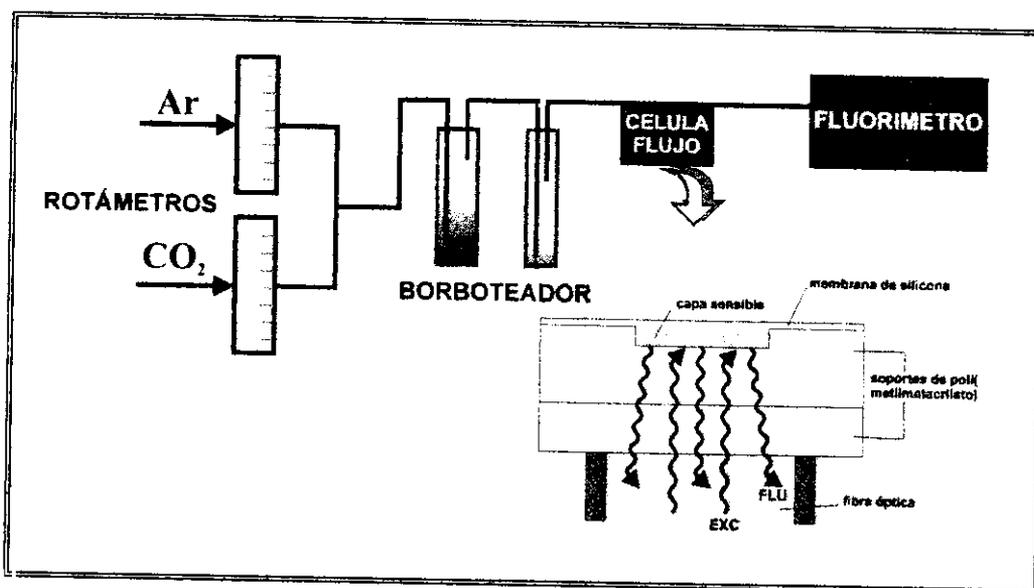


FIGURA 14. Dispositivo de medida para el sensor de CO_2 en fase gaseosa.

2.4.1.2. Medidas en disolución acuosa.

En este caso, el sistema comprende una bomba peristáltica que permite bombear alternativamente la disolución portadora y las disoluciones de calibrado a través de todo el sistema, hasta alcanzar la célula de flujo donde se sitúa la fase reactiva. Como señal de referencia se toma la obtenida al bombear una disolución de tampón cítrico/citrato 0.1 M y pH 5.0. Las disoluciones patrón de CO_2 se prepararon por dilución de una disolución estándar de carbonato sódico de 10^4 ppm, secado previamente a 110°C durante 2 horas en una estufa.

Inmediatamente antes de la medida, el pH de las disoluciones de medida se ajusta a un valor de 5, mediante la adición de tampón cítrico/citrato 0.1 M. De esta forma, nos aseguramos de que todas las especies presentes en la disolución de H_2CO_3 (HCO_3^- , CO_3^{2-} ...) se encuentren en forma de CO_2 (g).

2.4.2. SENSOR DE O₂.

Las medidas se realizaron utilizando mezclas de Ar-O₂ obtenidas con un mezclador de gases con un contenido entre el 2.5-100% de O₂. El gas de muestra se hace pasar a través de la célula de flujo (descrita en el apartado 2.2.1.1 de esta memoria), en la cual se sitúa la fase reactiva sobre una placa de metacrilato de metilo de 2-cm de diámetro y 2-mm de espesor. Una de las entradas de la célula de flujo se conecta a un tubo de Nylon de 6-m de longitud que transporta los gases correspondientes y la otra se deja abierta al exterior (ver Figura 12).

Una vez obtenida en el registro una señal estable correspondiente al 0% de O₂, que se toma como señal de referencia, se van alternando las distintas mezclas de gases empleadas en el calibrado. El contenido exacto de O₂ en cada una de las mezclas, se obtiene calibrando previamente el mezclador de gases, mediante el método de la burbuja de jabón.

2.4.3. BIOSENSOR DE COLESTEROL.

El sistema de flujo utilizado para la calibración y medidas con el biosensor de colesterol se ha descrito en el apartado 2.2.2. La membrana sensible se dispone sobre una placa de poli(metacrilato) de metilo de 2-mm de espesor y el conjunto se sitúa en la célula de flujo termostatizada a 30 °C.

Como disolución portadora se emplea una disolución reguladora de fosfato (0.30 mM, pH 7.5) equilibrada al aire, con un contenido en Triton X-100 e isopropanol de un 2.6 y 11%, respectivamente. Las disoluciones patrón de colesterol se preparan pesando la cantidad necesaria en cada caso y disolviéndola en la disolución portadora.

La disolución de trabajo se bombea a través de todo el sistema con un caudal de 0.14 mL min⁻¹ empleando una bomba peristáltica, introduciéndose con una válvula de inyección de 6 vías tanto las muestras como los patrones de colesterol en la corriente portadora (volumen de inyección 500 µL) (ver Figura 13).

Cuando el O₂ disuelto se consume en el transcurso de la reacción enzimática, se produce un aumento de la señal luminiscente del complejo de Ru(II) inmovilizado que

se registra como un pico transiente, cuya altura puede relacionarse con la concentración de colesterol presente en la muestra.

2.4.4. BIOSENSOR DE COLINA/FOSFATIDILCOLINA.

El sistema de flujo en el cual se integra el biosensor para la determinación de colina/fosfatidilcolina se ha descrito en el apartado 2.2.2. La membrana de nylon se deposita sobre la membrana de O₂, evitando la aparición de bolsas de aire, de forma que el contacto entre ambas resulte máximo. A continuación, se sitúa sobre una placa de poli(metacrilato) de metilo de 2-mm de espesor y se dispone en la célula de flujo.

En este caso, como disolución portadora se emplea una disolución reguladora de fosfato (50 mM, pH 8.0) equilibrada al aire. Las disoluciones patrón de colina se preparan pesando la cantidad necesaria en cada caso y enrasando con la disolución portadora.

Para la preparación de las disoluciones patrón de fosfatidilcolina, se procede de forma similar, pesando la cantidad necesaria y disolviéndola en tampón fosfato (50 mM, pH 8.0) que contiene un 1% de Triton X-100 y 8 mg/100 mL de CaCl₂. A continuación estas disoluciones se incuban durante 20 minutos a 37 °C con 33 unidades de la enzima fosfolipasa-D y, por último, se procede a analizar la colina producida durante la reacción enzimática de hidrólisis del fosfolípido.

La disolución portadora se bombea a través de todo el sistema empleando una bomba peristáltica con un caudal de 0.6 mL min⁻¹, introduciéndose mediante una válvula de inyección de 6 vías tanto los patrones de colina y/o fosfatidilcolina como las muestras (volumen de inyección 40 µL) (ver Figura 13).

El consumo de oxígeno que tiene lugar durante la reacción enzimática se detecta por el aumento de la señal luminiscente del indicador que es registrado como un pico transiente. Con el paso del portador se alcanza de nuevo un nivel de O₂ constante en la disolución y la señal de luminiscencia disminuye volviendo a su valor inicial.

2.5. BIBLIOGRAFÍA .

Orellana, G; Álvarez-Ibarra, C. y Santoro, J. *Inorg. Chem.*, 1988, 27, 1025.

Hornby, W.E y Morris, D.L. "*Immobilized enzymes, antigens, antibodies and peptides*". Weetall, H.H (ed.). Marcel Dekker, New York, 1975.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂.

3.1.1. Interés analítico de la determinación de CO₂.

3.1.1.1. Interés medioambiental.

3.1.1.2. Interés clínico.

3.1.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de CO₂.

3.1.2.1. Métodos analíticos utilizados para la determinación de CO₂.

3.1.2.2. Sensores de fibra óptica.

3.1.3. Estudios previos a la construcción del sensor.

3.1.3.1 Caracterización de las propiedades espectroscópicas del indicador.

3.1.3.2. Evaluación del pK_o del estado excitado (pK_a^{*})

3.1.3.3. Fundamento de la medida

3.1.3.4. Elección de la disolución reguladora.

3.1.3.5. Efecto del CO₂ disuelto sobre la respuesta del indicador. Modelado teórico.

3.1.4. Determinación de CO₂ mediante un sensor basado en medidas de intensidad de luminiscencia.

3.1.4.1. Preparación de la fase sensora.

3.1.4.2. Características analíticas del sensor.

3.1.4.3. Reducción del tiempo de respuesta del sensor. Empleo de la enzima anhidrasa carbónica.

3.1.5. Determinación de CO₂ mediante un optosensor basado en medidas de luminiscencia con resolución temporal.

3.1.5.1. Efecto de la cantidad de indicador inmovilizado.

3.1.5.2. Efecto de la temperatura.

3.1.5.3. Características analíticas.

3.1.6. Aplicación analítica del sensor de CO₂ a medidas en fase gaseosa.

3.1.7. Aplicación analítica del sensor de CO₂ a medidas en disolución acuosa.

3.1.8. Bibliografía.

3.1. SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂.

3.1.1. INTERÉS ANALÍTICO DE LA DETERMINACIÓN DE CO₂.

El CO₂ es un analito de gran interés, tanto desde el punto de vista medioambiental como clínico, así como en ciertos procesos industriales de tecnología alimentaria como las fermentaciones, la carbonatación de bebidas o la conservación de alimentos, entre otros. Asimismo, también se requiere la continua monitorización de los niveles de CO₂ en lugares como túneles o aparcamientos, donde es preciso mantener una calidad del aire adecuada.

Las principales fuentes que liberan CO₂ son (Kirk-Othmer., 1978; Marr et al., 1990):

- **Combustibles fósiles:** El CO₂ aparece como producto durante la combustión de dichos materiales. El aporte anual de CO₂ a la atmósfera debido a esta fuente de producción es del orden de 10¹⁰ toneladas, aunque la mayor parte va a ser asimilado por las plantas (fotosíntesis) o por el océano (disolución).

- **Gases de automóviles:** Contienen de un 7 - 13% de CO₂, dependiendo del tipo de vehículo.

- **Procesos de fermentación:** En el caso de las industrias cerveceras o de producción de bebidas alcohólicas se generan grandes cantidades de CO₂, pudiendo llegar a obtenerse una atmósfera con casi el 100% de dicho gas en las cubas de fermentación.

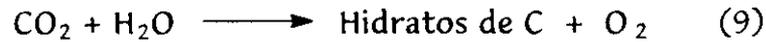
- **Procesos de conversión de la caliza en cemento .**

- **El aliento que exhalamos .** Contiene típicamente de un 4 a un 5% de CO₂.

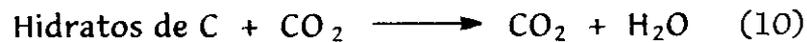
3.1.1.1. Interés medioambiental.

El CO₂ se encuentra presente de forma natural en la atmósfera en cantidades pequeñas (ca. 0.03%). Sin embargo, esta proporción ha aumentado considerablemente, sobre todo en los últimos años, debido al aporte de CO₂ procedente de fuentes antropogénicas.

El CO₂ experimenta un ciclo continuo dentro y fuera de la atmósfera debido a las actividades de plantas y animales. En este ciclo del carbono, las plantas por medio de la fotosíntesis, utilizan la energía luminosa para hacer reaccionar el CO₂ del aire con el agua, produciendo hidratos de carbono y oxígeno.



Los hidratos de carbono se almacenan en las plantas, mientras que el oxígeno se libera a la atmósfera. Cuando las plantas se oxidan por descomposición natural, combustión o consumo por parte de los animales, se absorbe el oxígeno del aire y se libera de nuevo CO₂ a la atmósfera.



Las ecuaciones (9) y (10) representan el ciclo del carbono en la naturaleza, que origina esencialmente un nivel atmosférico constante de CO₂, a no ser que se vea alterado por las actividades humanas.

El hombre ha alterado el ciclo del carbono al talar los bosques, lo que disminuye las plantas disponibles; al quemar carburantes fósiles y aumentar las emisiones de CO₂ procedentes de los automóviles, así como en el proceso de conversión de la caliza en cemento. La primera de estas actividades disminuye la capacidad de la naturaleza para eliminar el CO₂ atmosférico, mientras que las otras aumentan su cantidad en la atmósfera. El resultado neto ha sido un rápido incremento, del 30%, en el nivel atmosférico de CO₂ desde la Revolución Industrial (*Lorius et al., 1990*) y las predicciones apuntan a que esta concentración se doblará en el siglo XXI.

La mayor parte de la radiación solar que incide sobre la tierra, compuesta por muchas longitudes de onda, no llega a la superficie. El ozono filtra la mayor parte de la radiación UV, mientras que el vapor de agua y el CO₂ atmosférico absorben buena parte de la radiación IR. En definitiva, casi toda la luz que llega a la superficie terrestre se halla en la región del visible y aproximadamente la 3ª parte de la misma vuelve a reflejarse hacia el espacio. La mayor parte de los dos tercios restantes es absorbida por materias inanimadas tales como rocas, cemento, etc y posteriormente esta luz vuelve a emitirse en forma de radiación IR o calor, cuando la tierra se enfría.

El CO₂ se comporta como un filtro de una sola dirección, dejando pasar la luz visible pero impidiendo que la luz de una longitud de onda mayor, se desplace en sentido opuesto. Esto da lugar a un aumento de la temperatura de la atmósfera y de la tierra, provocando lo que se conoce como “efecto invernadero”.

Por otra parte, se cree que casi la mitad del CO₂ liberado a la atmósfera es absorbido por las aguas marinas, reduciéndose en alguna medida el potencial calentamiento del planeta, debido a los niveles excesivos de este gas (Walt *et al.*, 1993). El CO₂ penetra en las aguas oceánicas y superficiales por un continuo intercambio a través de la interfase hidrosfera-atmósfera, cuya velocidad está controlada por la diferencia de presión parcial de CO₂ entre ambas fases. Recientes estimaciones (Lorius *et al.*, 1990) indican que la cantidad de CO₂ disuelto en los océanos es aproximadamente 60 veces la cantidad de CO₂ presente en la atmósfera. Sin embargo, no se conoce muy bien la velocidad del proceso de absorción del CO₂ atmosférico por el océano, aunque es lógico pensar que dependerá de ciertas condiciones particulares de las aguas como salinidad, temperatura, etc. (Sarmiento *et al.*, 1992)

Asimismo, el CO₂ es un producto del metabolismo animal y ejerce un papel destacado en el ciclo vital de organismos y plantas. Un aumento del contenido de CO₂ libre en los medios acuáticos (ríos, lagos, etc), originado por un trastorno medioambiental, puede conducir a graves consecuencias para la fauna de dichos lugares (Stoker *et al.*, 1981). En el caso de los peces, éstos producen CO₂ en sus células como consecuencia de la actividad metabólica; éste difunde hacia las branquias y posteriormente abandona la sangre difundándose en el agua. El aumento de CO₂ en el medio exterior retarda su difusión a partir de la sangre del animal, favoreciéndose su acumulación en el organismo y originando una disminución en el transporte de oxígeno y del pH de la sangre. En estas condiciones se puede producir la muerte del animal.

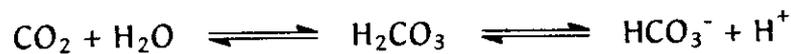
Las plantas, sin embargo, no sólo toleran, sino que responden favorablemente a niveles elevados de CO₂ (Stoker *et al.*, 1981). Concentraciones de hasta el 0.1% de CO₂ en aire proporcionan un aumento en la producción de frutos (e.g. tomates) y estos niveles pueden encontrarse e incluso suministrarse en los invernaderos, especialmente

si en sus proximidades existe una fuente barata de CO₂, como e.g una industria cervecera.

3.1.1.2. Interés clínico.

El análisis de gases en sangre se realiza usualmente para evaluar el estado ácido-base o el estado de oxigenación respiratoria del paciente. Es bien conocido que un estado traumático o de “shock” da lugar a alteraciones de la actividad metabólica que provocan modificaciones en el consumo de O₂ y la producción de CO₂. El análisis de gases en sangre incluye normalmente la medición del pH, P_{CO₂} y P_{O₂}.

La función del equilibrio ácido-base es el mantenimiento de un pH constante en el organismo. El CO₂ disuelto en sangre está en equilibrio entre el plasma y los eritrocitos sufriendo las siguientes reacciones:



En condiciones normales, aproximadamente el 5% del CO₂ total se encuentra en el organismo en forma de gas (físicamente disuelto). El HCO₃⁻ constituye aproximadamente el 90% y el H₂CO₃ menos del 1% del CO₂ total. En cuanto a los valores medios de las presiones parciales de CO₂ venosa y arterial suelen ser 6.1 y 5.3%, respectivamente (Fogt et al., 1990).

El sistema CO₂/HCO₃⁻ constituye el sistema regulador fundamental de la sangre y su misión es mantener el pH hemático. Se describen como “componente respiratorio” y “componente metabólico”, respectivamente. El componente respiratorio, por definición, se regula a través de la función pulmonar y el control se efectúa alterando la concentración de CO₂ de la sangre. El mecanismo de regulación del componente metabólico es una función del riñón y sus acciones se reflejan en cambios en la concentración de HCO₃⁻.

Desde el punto de vista clínico, es necesario detectar los cambios producidos en ambos componentes, así como también el pH, para obtener una información adecuada sobre el origen de las alteraciones en el equilibrio ácido-base hemático.

Dichas alteraciones son de origen respiratorio y se pueden clasificar en (Henry et al., 1980):

-**Hiperventilación:** Se caracteriza por un aumento transitorio del pH hemático como consecuencia de una eliminación en exceso de CO₂ a través de los pulmones, dando origen a lo que se conoce como "alcalosis respiratoria".

-**Enfisema:** Es el caso opuesto, ya que, debido a una deficiente eliminación de CO₂, se produce una disminución transitoria del pH denominada "acidosis respiratoria".

Los métodos tradicionales para análisis de gases en sangre suponen la extracción de una muestra de sangre del paciente y su posterior traslado a un laboratorio donde es analizada. El proceso puede ser lento y los resultados no reflejar los niveles fisiológicos correctos debido a los errores derivados del proceso de transporte. Además, en ciertas situaciones (enfermos en estado crítico o sometidos a una intervención quirúrgica), es necesario un control riguroso en continuo de los niveles de CO₂ en sangre ya que cualquier alteración puede dar lugar a graves consecuencias para el paciente (Collison et al., 1990; Halbert, 1990; Leiner, 1991).

Por estas razones, sería interesante desarrollar dispositivos de medida que permitieran un análisis "in vivo", rápido y exacto de la presión parcial de CO₂ y O₂ en sangre. Es en este contexto, donde los sensores químicos de fibra óptica pueden aportar sus ventajas frente a otro tipo de dispositivos para la monitorización "in vivo" de gases en sangre y otros analitos de interés clínico.

Desde el año 1983 se pueden encontrar en el mercado monitores para gases sanguíneos, incluyendo CO₂, basados en el empleo de sensores ópticos, algunos de ellos con fibra óptica. Por ejemplo, el CDI/3M "Gas-Stat" que, permite la monitorización de sangre extracorpórea durante cirugía coronaria; el sistema de fibra óptica de Puritan-Bennet "FOX" para la monitorización continua "in vivo" en la arteria radial o femoral. El OS1/Marquette "Online ABG", un sistema ex vivo para medidas "a pie de cama" y el recientemente introducido AVL "OPT1", portátil que permite la realización de análisis in vitro y también "a pie de cama" empleando cartuchos desechables.

3.1.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂.

3.1.2.1. Métodos analíticos utilizados para la determinación de CO₂.

Entre los métodos clásicos de análisis de CO₂ los más empleados son la espectrofotometría infrarroja (IR) para la determinación de CO₂ en fase gaseosa y los métodos eléctricos (electrodo de pCO₂) para el análisis de este gas en disolución.

a) Espectrofotometría Infrarroja (IR).

Se trata de una técnica analítica muy valiosa para la identificación de distintos gases, aunque también se usa en el análisis cuantitativo. Muchas moléculas pequeñas presentes en el medio ambiente presentan espectros de absorción característicos en la zona IR, de forma que las longitudes de onda de las bandas de absorción corresponden a las diferencias entre niveles de energía vibracionales.

El CO₂ es uno de los gases que puede analizarse por IR ya que tiene una banda de tensión antisimétrica y otra de flexión a 2350 y 650 cm⁻¹, respectivamente. Midiendo la intensidad de la banda de tensión situada a 2350 cm⁻¹, es posible determinar la cantidad de CO₂ en la muestra. Aprovechando esta característica, se ha aplicado la técnica de IR a la determinación del CO₂ total liberado en muestras de agua tras una acidificación previa de las mismas (Skirrow, 1975), así como a la determinación del contenido de carbono orgánico total en aguas, mediante la conversión de éste último en CO₂. Otra aplicación interesante de la espectroscopía IR descrita en la bibliografía, es el análisis de CO₂ en cervezas mediante el empleo de una técnica especial de muestreo que permite la determinación en la propia línea de procesado (Wilks, 1988).

Asimismo, la espectrofotometría infrarroja también se ha aplicado a la construcción de sensores ópticos para CO₂. Así, Manuccia y col. (Manuccia et al., 1985) han descrito el desarrollo de un optodo para la determinación de P_{CO₂} en sangre, midiendo la absorción a 4.3 μm y empleando como señal de referencia la longitud de onda de 5.05 μm.

Sin embargo, a pesar de ser una técnica muy sensible, en la práctica es difícil de adaptar a la medida de CO_2 en disoluciones acuosas, debido a la importante interferencia que provoca el vapor de agua.

b) Electrodo de $p\text{CO}_2$.

La $p\text{CO}_2$ puede medirse directamente con un electrodo de CO_2 del tipo descrito por Severinghaus y Bradley (*Severinghaus et al., 1958*). Esta medida directa es, en realidad, una medida modificada del pH. El electrodo consiste en una combinación de un electrodo de referencia y un electrodo de vidrio montados ambos por detrás de una membrana de teflón permeable a los gases. Las características de esta membrana de teflón son tales que las moléculas pequeñas sin carga (e.g. el CO_2 disuelto) la atraviesan con facilidad, en tanto que las partículas cargadas (e.g. los protones) no lo hacen.

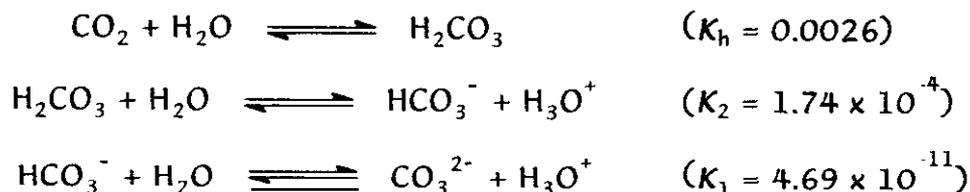
El electrodo está construido de tal forma que permite la medida del pH en una película fina de solución de bicarbonato que está en equilibrio con el CO_2 de la muestra problema. El CO_2 disuelto en la disolución de bicarbonato, reacciona con el agua para formar ácido carbónico y se mide el cambio de pH originado por este último. El electrodo de CO_2 tarda varios minutos en alcanzar el equilibrio, una vez introducida la muestra, y el tiempo de equilibración varía con la temperatura de la misma, con el grosor de la membrana, la fuerza iónica del tampón del electrodo, el volumen de ese tampón y con la $p\text{CO}_2$. Esto hace que el electrodo precise de una frecuente recalibración para compensar las fluctuaciones de la señal.

La $p\text{CO}_2$ de la muestra puede determinarse mediante una curva de calibración que lo relaciona con el pH, o bien mediante la lectura directa con instrumentos que tengan una escala logarítmica para la $p\text{CO}_2$.

3.1.2.2. Sensores de fibra óptica.

Ya en 1975, Lübbers y Opitz (*Lübbers et al., 1975*) informaron sobre la posibilidad de cuantificar la presión parcial de CO_2 por medio de sensores ópticos u “optodos”. El principio de medida de la presión parcial de CO_2 con sensores, tanto ópticos (optodos), como potenciométricos (electrodos), se basa en la detección de los cambios de pH de una solución tampón de $\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$ que está en equilibrio con la

muestra, pero separada de ella por una membrana semipermeable a los gases. Estos cambios de pH son seguidos por medio de indicadores ácido-base apropiados (normalmente indicadores colorimétricos o fluorescentes). En el equilibrio, el pH de la solución tampón, depende de la concentración de H_2CO_3 producido por la hidrólisis del CO_2 que atraviesa la membrana, y que a su vez es proporcional a la presión parcial de CO_2 en la muestra.



Aplicando la ley de acción de masas al 2º equilibrio tendremos:

$$K_{\text{CO}_2} = [\text{H}_3\text{O}^+] [\text{HCO}_3^-] / [\text{H}_2\text{CO}_3] \quad (11)$$

donde K_{CO_2} es la constante de equilibrio del proceso de disolución.

Por otra parte, sabemos que la concentración de H_2CO_3 corresponde a la concentración de CO_2 y que existe una relación entre la $[\text{CO}_2]$ y la presión parcial a través de la ley de Henry:

$$[\text{CO}_2] = S \cdot P_{\text{CO}_2} \quad (12)$$

donde S es el coeficiente de solubilidad. Combinando las ecuaciones (11) y (12) tendremos:

$$[\text{H}_3\text{O}^+] = K_{\text{CO}_2} \cdot S \cdot P_{\text{CO}_2} / [\text{HCO}_3^-] = [\text{CO}_2] \cdot P_{\text{CO}_2}$$

En forma logarítmica:

$$\text{pH} = -\log P_{\text{CO}_2} - \log [\text{CO}_2]$$

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{CO}_2} + \log [\text{HCO}_3^-] / S \cdot P_{\text{CO}_2}$$

Esta ecuación es idéntica a la ecuación de Hendersson-Hasselbach y demuestra que la medida de la $[\text{H}_3\text{O}^+]$ permite la medida de la presión parcial de CO_2 .

Podemos clasificar los sensores ópticos para la determinación de CO₂ recogidos en esta revisión bibliográfica en dos grandes grupos:

- Sensores basados en medidas de *absorbancia o reflectancia*. Emplean indicadores ácido-base o sustancias capaces de modificar su color según el pH de la disolución.

- Sensores basados en medidas de *fluorescencia*. Emplean indicadores fluorescentes, cuya emisión es sensible a la acidez o basicidad del medio.

a) Optodos basados en medidas de absorbancia o reflectancia

Los sensores químicos de fibra óptica para CO₂ basados en este principio incorporan un indicador ácido-base, cuyos cambios de color responden a la variación que experimenta el pH del medio que, a su vez, es función de la P_{CO₂} en la muestra. La reacción indicadora es la siguiente:



El indicador se emplea normalmente disuelto en una solución reguladora de bicarbonato, o bien, inmovilizado sobre un soporte polimérico y separado de la muestra por una membrana permeable al CO₂.

Vurek y col. (Vurek et al., 1984) han desarrollado un sensor para la determinación de CO₂, basado en el empleo del indicador rojo de fenol y utilizando un diseño similar al sensor de pH construido por Peterson y col. (Peterson et al., 1980; Peterson et al., U.S. Patent, 1980). El sensor descrito consta de un tubo de silicona relleno de una disolución isotónica compuesta por el indicador, carbonato potásico y cloruro potásico, sellado en uno de sus extremos con silicona adhesiva y, en el otro, con un par de fibras ópticas. El calibrado del sensor se realiza midiendo la relación (R) de intensidades cuando la fase reactiva es iluminada con luz roja (600 nm) o verde (558 nm) y se relaciona con el pH a través de la siguiente expresión:

$$\log (R/K) = -C \cdot (10^{\delta} + 1) \quad (13)$$

donde K es un constante óptica del sistema; C es la densidad óptica del sensor cuando todo el indicador se halla en forma básica y δ es la diferencia entre el pH y el pK_a del

indicador. El sensor responde en el intervalo de pH fisiológico y se ha aplicado a medidas *in vivo*.

Miller y col. (Miller et al., 1987) describen un prototipo, CDI[®] System 1000 (Cardiovascular Devices, Inc, Irvine, CA), para la determinación de gases y pH *in vivo* mediante el empleo de una sonda de fibra óptica de dimensiones tales que permite su introducción en la arteria a través de un catéter. El extremo de la sonda está formado por tres fibras ópticas de 140 μm de diámetro, en cuyos extremos se sitúan las correspondientes fases sensibles (O_2 , CO_2 y pH). Concretamente, el sensor de CO_2 , emplea como fase reactiva una disolución de rojo cresol en bicarbonato encapsulado en silicona. La P_{CO_2} , al igual que en el caso anterior, se calcula a partir de la relación de intensidades correspondientes a las dos formas del indicador. La precisión obtenida para los distintos analitos pH, CO_2 y O_2 es de 0.03 unidades de pH, 2 y 4 Torr, respectivamente. El optodo mostró una buena biocompatibilidad y permite su uso en continuo durante un período de 72 horas. Sin embargo, tanto el óxido nitroso como el halotano interfieren en el análisis.

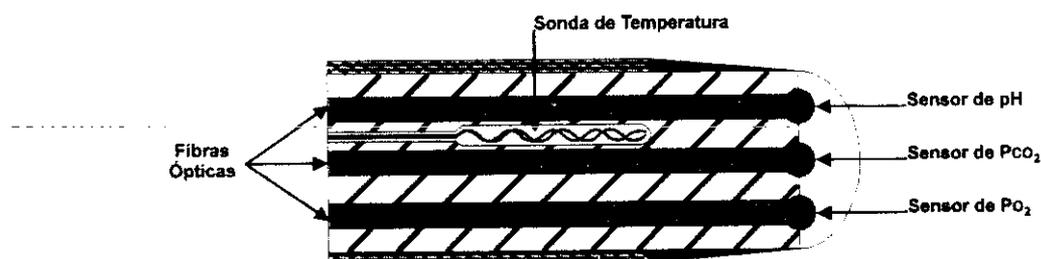


FIGURA 15. Sensor de fibra óptica para la determinación *in vivo* de pH, P_{O_2} y P_{CO_2} . (Miller et al., 1987).

Recientemente, DeGrandpre (DeGrandpre, 1993) ha desarrollado un sensor de fibra óptica, tipo sonda, para la determinación *in situ* de P_{CO_2} en aguas de mar. El sensor está constituido por una microcélula (1.6 μL) a través de la cual, se hace circular una solución indicadora de rojo fenol (pK_a 7.5) o azul de bromotimol (pK_a 6.8) a un pH apropiado. La membrana externa de silicona que recubre el sensor proporciona en primer lugar, una barrera permeable al CO_2 presente en el agua de mar y, en segundo lugar actúa como eficaz dispersor de la radiación procedente de la fibra óptica.

La difusión del CO_2 a través de la membrana provoca el cambio de color de la disolución indicadora y la medida de la relación de intensidades a las longitudes de onda de los máximos de absorción, correspondientes a la forma ácida y básica del indicador, permite calcular la P_{CO_2} en la muestra. El sensor muestra una precisión óptima de $\pm 0.8 \mu\text{atm}$ para una P_{CO_2} de 300 - 500 μatm y en cuanto al tiempo de respuesta varía entre 11 y 26 minutos, dependiendo del caudal empleado para impulsar la disolución indicadora a través del sistema.

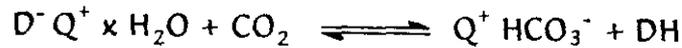
Entre los inconvenientes del sensor, destaca el hecho de que la membrana de silicona sufre continuas deformaciones como consecuencia de la presión ejercida por el agua de mar y el continuo bombeo de la disolución indicadora. Esto provoca cambios en la intensidad de la luz reflectora y en el paso óptico que dificultan su uso para el análisis cuantitativo.

El empleo de un indicador colorimétrico tipo "azo", como material sensible al pH, ha servido de base para la construcción de un optodo para CO_2 disuelto, en el intervalo de presiones parciales entre 0 - 100 hPa (Weigl et al., 1993). Para la fabricación del sensor, se inmovilizó covalentemente el indicador en membranas de celulosa, a través de grupos vinilsulfónico y, posteriormente, se recubrió con una capa de un copolímero de silicona altamente permeable al CO_2 , pero impermeable a los iones (especialmente a los H_3O^+). El sensor también incorpora un pigmento mineral que actúa como aislante óptico, aumentando la reflectividad de las membranas y reduciendo las posibles interferencias debidas a la luz ambiental. El optodo muestra una aceptable estabilidad, tanto química como mecánica, y admite la esterilización, lo cual puede resultar interesante para aplicaciones clínicas.

Por otra parte, la incorporación de indicadores ácido-base, como el rojo cresol o el púrpura de *m*-cresol, en polímeros hidrófobos, mediante la formación de pares iónicos, ha dado lugar a una nueva metodología para la construcción de fases sensibles al CO_2 . (McMurray, 1992; Mills et al., 1992; Mills et al., 1994; Mills et al., 1995; Weigl et al., 1994; Weigl et al., 1995). La composición general de dichas membranas responde al siguiente esquema: indicador (forma aniónica, D^-) / catión de tetraalquilamonio (Q^+) / polímero / plastificante.

El procedimiento general de medida implica la reacción del indicador en su

forma protonada (DH) con el catión de amonio cuaternario (Q^+, OH^-), para dar lugar a un par iónico hidratado intensamente coloreado ($D^- Q^+ \times H_2O$). Este par iónico, se disuelve en el polímero donde, posteriormente, reaccionará con el CO_2 de acuerdo al siguiente esquema:



El resultado de esta reacción es la formación de un nuevo par iónico entre el catión cuaternario y el anión bicarbonato, liberándose un protón que convierte al indicador en su forma protonada, con el correspondiente cambio de color asociado. El proceso es completamente reversible y, en ausencia de CO_2 , se vuelve a observar el color correspondiente al indicador en su forma aniónica.

Las membranas desarrolladas según este procedimiento muestran una rápida respuesta al CO_2 gas (< 3 s para un cambio 0 - 5% de CO_2), debido fundamentalmente al hecho de que el par iónico es disuelto directamente en un polímero permeable al gas y, por ello, no es necesario emplear una membrana de silicona adicional. Además, el agua de hidratación asociada al par iónico es suficiente para disolver el CO_2 y formar HCO_3^- que compite, posteriormente, por el ion amonio con la forma desprotonada del indicador. Sin embargo, la utilización de estas membranas presenta problemas en medios acuosos de elevada fuerza iónica, o ligeramente ácidos ($pH \leq 6$), ya que, en estas condiciones, se favorece la transformación del indicador desde su forma inicial desprotonada (azul) hacia la forma protonada (amarilla).

Finalmente, también se han desarrollado algunos instrumentos (Organon Teknika, Durham) para la detección de la contaminación microbiana mediante un sensor de CO_2 basado en medidas de reflectancia (Wolfbeis, 1991). Consiste en un LED compatible con las características espectroscópicas del indicador, que se encuentra en contacto con la muestra de sangre. El crecimiento bacteriano da lugar a un incremento de los niveles de CO_2 el cual, a su vez, provoca una disminución del pH del tampón en el que se encuentra disuelto el indicador, cuyo cambio de color es medido por el instrumento.

b) Optodos basados en medidas de luminiscencia.

El mayor número de indicadores fluorescentes disponibles, así como la mayor sensibilidad, selectividad y versatilidad de las técnicas luminiscentes, es la causa de que se hayan desarrollado muchos más optodos para CO₂ basados en indicadores fluorescentes que en indicadores colorimétricos (Lübbbers, 1992). Así, los optodos basados en medidas de luminiscencia, presentan generalmente menores límites de detección que los basados en medidas de absorbancia, si bien, el dispositivo óptico requerido para las medidas de luminiscencia es más complejo y costoso que el empleado en medidas de absorbancia. En la TABLA VI se recogen las características más relevantes de los sensores ópticos luminiscentes para CO₂ descritos en la bibliografía.

El primer sensor óptico para la medida de CO₂, basado en el empleo de un indicador fluorescente, fue el desarrollado por Lübbbers y Opitz (Lübbbers et al., 1975). Se trata, en realidad, de una modificación del electrodo de CO₂ descrito por Severinghaus y Bradley (Severinghaus et al., 1958), donde el electrodo de vidrio convencional se sustituyó por una disolución de un indicador fluorescente, la 4-*metilumbeliferona*, en tampón bicarbonato 1µm y, a su vez, separada del medio exterior por una membrana de PTFE de 6µm de espesor. Este indicador resulta muy adecuado para medidas de pH fisiológico, ya que presenta un pK_a~7.8; sin embargo, sus máximos de excitación y emisión se encuentran en la zona UV del espectro. La calibración del sensor se llevó a cabo midiendo la relación de la fluorescencia emitida a 445 nm después de excitar a 318 y 357 nm relacionando, a continuación, dicho valor con la P_{CO₂}. El sensor ha sido aplicado a la medida transcutánea de la P_{CO₂} (Lübbbers et al., 1979); sin embargo, debido a la pobre estabilidad de la fase sensible, este sistema no resultó adecuado para su aplicación en análisis de rutina.

La sal trisódica del *ácido 8-hidroxi-1,3,5-pirenotrisulfónico* (HPTS) es uno de los indicadores fluorescentes más frecuentemente empleados en el desarrollo de optodos para la determinación de CO₂ y, además, resulta ser un indicador casi ideal para la medida del pH fisiológico (Wolfbeis et al., 1983). Su empleo proporciona, entre otras, las siguientes ventajas: *alta solubilidad en agua; excitación y emisión en el visible* (470 y 520 nm, respectivamente); posibilidad de *excitar a dos longitudes de*

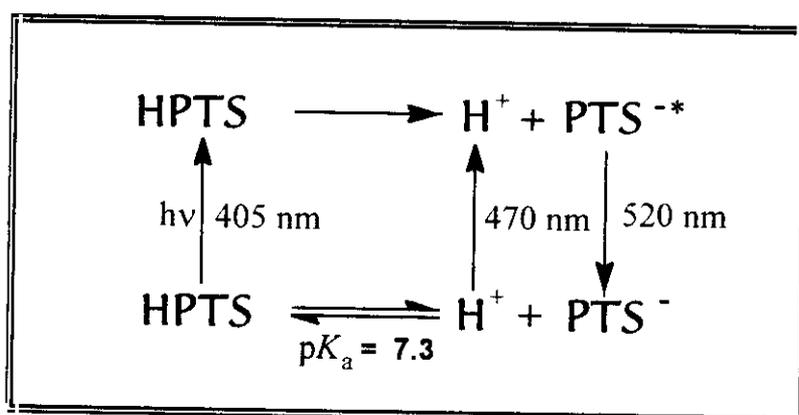
TABLA VI. CARACTERÍSTICAS DE LOS OPTODOS MÁS REPRESENTATIVOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CO₂ BASADOS EN MEDIDAS DE LUMINISCENCIA, APARECIDOS EN LA BIBLIOGRAFÍA.

| Indicador ^a | Soporte ^b | Inmovilización ^c | Tampón | Membrana ^d | Intero. Dinámico | Medio | Referencia |
|------------------------|-------------------------|--|---|-------------------------|----------------------------------|---------------|----------------------------|
| MUF | agarosa | disolución | HCO ₃ ⁻ 5 - 20 mM | PTFE | 1- 140 Torr | gas/sangre | Lübbers et al., 1975 |
| HPTS | interc. iónico | electrostática | HCO ₃ ⁻ 0.1 - 100 mM | Silicona | 1 - 6 mM | acuoso | Zhujun et al., 1984 |
| HPTS | poliacrilamida | adsorción | HCO ₃ ⁻ 1 mM | silicona- bisfenol A | 20 - 115 Torr | acuoso | Munkholm et al., 1988 |
| HPTS | celulosa | covalente | HCO ₃ ⁻ 15 mM | silicona | 0 - 150 Torr | gas | Wolfbeis et al., 1988 |
| HPTS | celulosa + TBP | disolución (par iónico con Q ⁺) | ----- | ----- | 0.76 - 7.6 Torr 0.004 - 10 mM | gas acuoso | Mills et al., 1993 |
| SNARF | PVP | disolución | HCO ₃ ⁻ 100 M | silicona | 10 - 100 Torr | gas | Parker et al., 1993 |
| Fluoresceína | glicol-CPG ó ninguno | adsorción ó ninguno | ----- | ----- | 1 - 190 Torr | gas | Hirschfeld et al., 1987 |
| Fluoresceína | polietilenglicol | dispersión | ----- | ----- | 0.76 - 213 Torr | gas | Kawabata et al., 1989 |
| HCA/MCP HPTS/NR | ----- | ----- | HCO ₃ ⁻ 2.3 ó 0.045 mM | silicona- bisfenol A | 4.5 - 18 mM | agua mar | Walt et al., 1993 |
| Eosina/PR R6G/PR | PHEMA | disolución | HCO ₃ ⁻ 40 mM | silicona | 7.6 - 114 Torr 15 - 75 Torr | gas | Lakowicz et al., 1993 |

^a Indicadores: MUF, 4-metilumbeliferona; HPTS, ácido 8-hidroxi-1,3,6-pirenotrisulfónico; SNARF, seminaftorodamina; HCA, 7-hidroxycumarina-4-ácido acético; MCP, púrpura de metacresol; NR, rojo neutro; PR, rojo fenol; R6G, rodamina 6G. ^b CPG, vidrio de poro controlado; PHEMA, poli(2-hidroxietilmetacrilato); TBP, tetrabutilfosfato; PVP, poli(vinilpirrolidona). ^c Q⁺, catión de tetraoctilamonio. ^d PTFE, poli(tetrafluoroetileno)..

onda diferentes y, por último, la presencia en su molécula de grupos sulfonato que, permiten una *inmovilización electrostática o covalente* del mismo.

La base fotoquímica del funcionamiento de este indicador se representa en el esquema 1. En el estado excitado, la ionización del HPTS se produce a mayor velocidad que su vuelta al estado fundamental; así, incluso a pH menor que 7.3, la fluorescencia que se observa es la característica del estado excitado del PTS^{*-} , aunque el HPTS es la especie mayoritaria en el estado fundamental. Como las longitudes de onda de excitación del HPTS y del PTS^- son muy distintas, puede obtenerse una respuesta del sensor en función del pH del medio, excitando de forma selectiva el HPTS o el PTS^- (o bien, excitando ambas especies secuencialmente y estudiando la relación de intensidades de emisión correspondientes).



ESQUEMA 1.

Basado en este indicador, Opitz y Lübbers (*Opitz et al., 1984*) desarrollaron un instrumento compacto para la medida de CO_2 con fibra óptica, cuya fase reactiva está compuesta por HPTS disuelto en tampón bicarbonato y cubierto por una membrana de PTFE. El tiempo de respuesta del sensor se ve afectado, entre otros factores, por el espesor del conjunto fase reactiva/membrana semipermeable, así como por la capacidad reguladora del tampón empleado y por la cinética del proceso de hidrólisis del CO_2 .

Posteriormente, Zhujun y Seitz (*Zhujun et al., 1984*) construyeron otro sensor para la medida de CO_2 , inmovilizando HPTS en una membrana de intercambio

aniónico. El diseño propuesto consiste en un par de membranas, separadas de una fibra óptica bifurcada por una cavidad rellena de tampón bicarbonato. La membrana externa es de silicona y la membrana interna es una membrana de intercambio iónico que contiene HPTS inmovilizado electrostáticamente. El sensor descrito muestra una relación lineal entre la P_{CO_2} y la $[\text{H}^+]$ de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{H}^+] = K_1 / C \cdot N \quad (14)$$

donde K_1 es la constante de disociación del H_2CO_3 ; C es la concentración analítica de CO_2 , incluyendo todas las formas hidratadas y no hidratadas y N es la concentración del tampón bicarbonato.

Sin embargo, el intervalo de linealidad obtenido es limitado y, por ello, en la práctica se debe seleccionar una concentración de bicarbonato tal que las concentraciones de CO_2 de interés originen cambios de pH entre 8.0 y 6.5, donde el sensor de pH es más sensible. Además del CO_2 , el sensor también responde a otras especies como sulfito y sulfuro (probablemente debido a sus correspondientes especies volátiles SO_2 y H_2S) que, en caso necesario, pueden ser eliminados por oxidación.

Heitzmann describe en una patente (Heitzmann, 1985) la preparación de membranas fluorescentes sensibles al CO_2 , sumergiendo partículas de poliacrilamida entrecruzada en una solución de HPTS en bicarbonato y embebiendo todo el conjunto en silicona. Las partículas de poliamida pueden ser omitidas, obteniéndose de esta forma, una emulsión entre la silicona y la solución de HPTS en bicarbonato. Las membranas muestran una excelente estabilidad a largo plazo, siempre y cuando no se almacenen al aire o en un medio donde la P_{CO_2} es baja. En este último caso, se vuelven inestables, requiriéndose varias horas para la obtención de una línea base estable, cuando se exponen de nuevo a niveles altos de P_{CO_2} . Este efecto se atribuye a la deshidratación que produce una contracción o expansión de las gotas debido a efectos de osmolaridad.

Wolfbeis y col. (Wolfbeis et al., 1988) desarrollaron un sensor combinado para la monitorización simultánea de oxígeno y CO_2 , utilizando una membrana compuesta por dos capas sensibles: una para el oxígeno, formada por el complejo *tris*(bipiridina)rutenio(II), $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$, inmovilizado en gel de sílice y suspendido en

silicona; y la otra, para CO₂, compuesta de HPTS inmovilizado en celulosa y suspendido en un hidrogel. El intervalo de respuesta del sensor para la determinación de CO₂ se sitúa entre 0 - 150 Torr y el límite de detección es de 0.5 Torr.

Dos grupos distintos, Mills y col. (Mills et al., 1993) y Müller y col. (Müller et al., 1996) han aprovechado la capacidad de formación de pares iónicos del HPTS y el hidróxido de tetraoctilamonio, para atrapar este indicador en una matriz polimérica de etilcelulosa, dando lugar a fases sensibles al pH y/o CO₂. Estas membranas no incluyen el tampón bicarbonato en la fase reactiva, ya que, el indicador, por sí mismo, actúa como un sistema regulador en presencia del grupo hidroxilo. Además, las membranas incorporan en su composición un plastificante que permite obviar el uso adicional de una membrana semipermeable, por lo que, los tiempos de respuesta del sensor se reducen considerablemente. Sin embargo, su pequeño intervalo de respuesta, así como, la pobre fotoestabilidad de la sonda, limitan la aplicabilidad de estos dispositivos.

Los indicadores de pH pertenecientes a la familia de las *seminaftorodaminas* (conocidas con el acrónimo SNARF), poseen propiedades fotoquímicas similares a las del HPTS, si bien, se diferencian en el hecho de que, tanto la forma ácida como la forma básica del indicador, emiten fluorescencia tras la excitación a una única longitud de onda. De esta forma, midiendo la relación de intensidades a las dos longitudes de onda máximas, se minimizan los problemas debidos a la posible fotodescomposición de la sonda o a variaciones en la intensidad de la fuente, lo que proporciona un dispositivo de mayor estabilidad temporal.

Además de esta característica, el SNARF presenta, entre otras, las siguientes ventajas: una intensa absorción en el verde, lo que permite el empleo de LEDs como fuentes de excitación; no es sensible al oxígeno y, por último, existen un gran número de derivados funcionalizados o covalentemente inmovilizados a dextrano. Entre los inconvenientes, podemos mencionar que presenta moderados desplazamientos de Stokes entre las bandas de excitación y de emisión y menores rendimientos cuánticos de emisión que los del HPTS (especialmente si se encuentran inmovilizados sobre un soporte sólido).

Basándose en las propiedades luminiscentes de este indicador, Parker y col. (Parker et al., 1993) han construido sensores de fibra óptica para pH/CO₂, mediante

el atrapamiento del SNARF en una matriz polimérica de silicona-poli(vinilpirrolidona). Dichos optodos muestran intervalos de respuesta para el CO₂ comprendidos entre 10-100 Torr y tiempos de respuesta del orden de varios minutos.

Otro tipo de indicadores fluorescentes, empleados con frecuencia en la construcción de sensores de pH y CO₂, son la *fluoresceína* y derivados. La popularidad de las fluoresceínas se debe principalmente al hecho de que existen derivados funcionalizados comerciales que permiten la inmovilización covalente del indicador en un soporte polimérico (Koller, 1991). Sin embargo, las fluoresceínas suelen ser fotoinestables y presentan pequeños desplazamientos de Stokes.

Hirschfeld y col. (Hirschfeld et al., 1987) han desarrollado un sensor de fibra óptica para monitorizar la presión parcial de CO₂ en sangre, midiendo las variaciones producidas en la fluorescencia de la *2,7-diclorofluoresceína* y la *fluoresceína* sódica, en función del pH. El sensor está constituido por una única fibra óptica, que conduce tanto la radiación de excitación como la de emisión, lo cual resulta esencial en los sensores clínicos, puesto que se reduce considerablemente el tamaño de la sonda, se minimizan los problemas de enfoque y alineamiento óptico y se mejora la estabilidad fotométrica.

Munkholm y col. (Munkholm et al., 1988), han empleado fluoresceína copolimerizada con 2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) y con acrilamida para la construcción de fases sensibles al pH/CO₂. Como membrana semipermeable utilizan un copolímero compuesto de dimetilsiloxano-carbonato de bisfenol A. La polimerización se lleva a cabo sobre la propia fibra óptica de vidrio, que transmite tanto la radiación de excitación como la de emisión.

Por otra parte, Kawabata y col. (Kawabata et al., 1989) construyeron un optodo para la determinación de CO₂ utilizando una dispersión de fluoresceína en polietilenglicol como fase reactiva. La fotopolimerización se lleva a cabo directamente sobre la superficie del extremo de la fibra óptica de cuarzo, previamente modificada, obteniéndose membranas poliméricas de un espesor aproximado de 10 µm. La respuesta del sensor es reversible para concentraciones de CO₂ comprendidas en el intervalo de 0 - 28% (v/v). El tiempo de respuesta, cuando la señal alcanza el 90% de su valor máximo, es de 10 s y el límite de detección resultó ser el 0.1%. La respuesta del sensor es rápida; sin embargo, se ve afectada por cambios en la humedad relativa.

El fenómeno conocido como “*transferencia de energía de fluorescencia*” desde un fluoróforo (molécula “donante”) a una molécula “aceptora” sensible al pH, puede constituir la base para el desarrollo de sensores de fibra óptica para pH/CO₂.

Las condiciones para que dicho proceso sea eficaz son las siguientes: el donante y el aceptor deben estar a una distancia adecuada conocida como distancia característica de Förster (~ 50 Å); debe existir un solapamiento espectral entre los espectros de absorción y emisión del indicador y del fluoróforo, respectivamente y, por último, el espectro de absorción del indicador (aceptor) debe modificarse en respuesta al pH(P_{CO₂}), en el intervalo de longitudes de onda correspondiente a la emisión del fluoróforo (donante). Si se dan todas estas condiciones, la emisión fluorescente y el tiempo de vida del donante también variarán en respuesta al analito.

Entre las ventajas que aporta la utilización de este principio de medida podemos citar: una mayor sensibilidad hacia el pH; mayor flexibilidad a la hora de elegir luminóforos según sus características fotoquímicas y, no tanto, en función de su sensibilidad al pH; y, por último, la posibilidad de diseñar optodos fluorescentes basados en medidas de tiempos de vida de emisión.

Siguiendo este principio, Walt y col. (Walt et al., 1993) han construido sensores ópticos basados en medidas de intensidad de emisión para la determinación de CO₂ en agua de mar. Como sistemas indicadores emplean el par HCA/MCP, donde HCA representa la 7-hidroxycumarina-4-ác. acético (donante) y MCP corresponde al púrpura de *m*-cresol (aceptor), o bien, una mezcla de HCA y rojo neutro (NR) disueltos en agua de mar sintética. La disolución indicadora se dispone en el extremo de unas fibras ópticas, separándola del medio externo por medio de una membrana de carbonato de bisfenol A. El principal inconveniente que presenta la sonda es su elevado tiempo de respuesta, como consecuencia de los procesos de difusión del gas a través de la membrana y su posterior disolución. Además, los problemas asociados al empleo de altas concentraciones de moléculas aceptoras (efecto de filtro interno, elevadas absorbancias y/o turbidez) necesarias, por otra parte, para una eficaz transferencia de energía, dificultan la medida de intensidad de emisión absoluta. Estos problemas se pueden obviar mediante el empleo de pares donante-aceptor unidos covalentemente, o bien, mediante la realización de medidas de fluorescencia con resolución temporal.

En este sentido, Lakowicz y col. (Lakowicz et al., 1993) han desarrollado sensores de fibra óptica para pH/CO₂ basados en el principio de transferencia de energía de fluorescencia y detección mediante espectrofluorimetría de modulación de fase. Las parejas de indicadores seleccionadas, eosina/rojo fenol; rodamina 6G/rojo fenol e hidrazida de rojo Texas/azul de bromotimol se encapsularon en membranas de silicona permeables al CO₂. La instrumentación requerida para las medidas es relativamente simple y de bajo coste, lo cual es especialmente importante cuando los indicadores empleados poseen tiempos de vida del orden de nanosegundos.

Finalmente, aparte de las *aplicaciones clínicas y/o medioambientales* de los fluorosensores de CO₂, también se han descrito algunos optodos para su aplicación en el campo de la *Biotecnología* (e.g detección de la posible *contaminación bacteriana* en muestras biológicas). Existe en el mercado un dispositivo comercializado por AVL Photonics, que permite la monitorización del nivel de CO₂ en cultivos bacterianos, por medio de un optodo basado en medidas de fluorescencia (Swenson, 1990). La muestra es introducida en contenedores sellados, que contienen un medio de cultivo estéril y, a continuación, se somete a un proceso de incubación durante un determinado tiempo. Si existe actividad biológica en el medio, se producirá un aumento de la concentración de CO₂, como resultado del crecimiento bacteriano, el cual, puede ser detectado por el sensor de fibra óptica introducido en el contenedor. El instrumento está diseñado para permitir la monitorización de 240 cultivos simultáneamente. Cada uno de los 240 sensores está compuesto por un LED azul como fuente de excitación y un fotodiodo como detector. La detección se lleva a cabo mediante el empleo de LEDs verdes y rojos conectados a un microcomputador.

La búsqueda de nuevos indicadores con propiedades fotofísicas y fotoquímicas adecuadas para la construcción de optodos de pH y/o CO₂, que permitan mejorar las características y superar algunos de los inconvenientes de los dispositivos descritos hasta el momento (pequeños o moderados desplazamientos de Stokes, excitación y emisión en el ultravioleta, e imposibilidad de construir dispositivos basados en medidas de tiempos de vida de emisión, entre otros), ha constituido una de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación multidisciplinar. En este sentido, hemos estudiado la posibilidad de utilizar un quelatocomplejo luminiscente de Ru(II) (dadas las características especialmente apropiadas para el desarrollo de sensores de fibra

óptica que presentan estos compuestos, como ya mencionamos en el apartado 1.4.4.2), sintetizado por los miembros del Dpto. de Química Orgánica de la U.C.M con unas propiedades ácido-base características, como posible candidato para su aplicación en la construcción de un optodo de CO₂.

3.1.3. ESTUDIOS PREVIOS A LA CONSTRUCCIÓN DEL SENSOR.

3.1.3.1. Caracterización de las propiedades espectroscópicas del indicador.

a) Propiedades ácido-base del estado fundamental.

En la construcción del sensor para la determinación de CO₂ se ha utilizado como indicador un nuevo complejo luminiscente, el tris[2-(2-pirazinil)tiazol]rutenio(II), abreviadamente Ru(pzth)₃²⁺, sintetizado y caracterizado recientemente (Orellana et al., 1987; Orellana et al., 1988; Orellana et al., 1989; Orellana et al., 1992). Por ser un miembro de la familia de los complejos polipiridílicos de Ru(II), el Ru(pzth)₃²⁺ muestra bandas de absorción intensas tanto en la zona UV ($\lambda_{\text{max}} = 311 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 47000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) como en la región del visible ($\lambda_{\text{max}} = 460 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 17000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Estas propiedades hacen que dichos compuestos sean de un enorme interés para su aplicación como materiales sensibles en los sensores de fibra óptica (Demas et al., 1991).

Además entre otras características, el complejo Ru(pzth)₃²⁺ posee tres átomos de nitrógeno heterocíclicos que no están involucrados en la coordinación con el átomo metálico, como se puede observar en la Figura 16 donde se representa la estructura tridimensional del compuesto.

Es precisamente la presencia de estos átomos de nitrógeno heterocíclicos no coordinados, la causa de que este tipo de compuestos participen en reacciones ácido-base. El carácter básico de estos átomos de nitrógeno integrados en anillos de pirazina permite su protonación (esquema 2), caracterizada por la constante K_a .



ESQUEMA 2

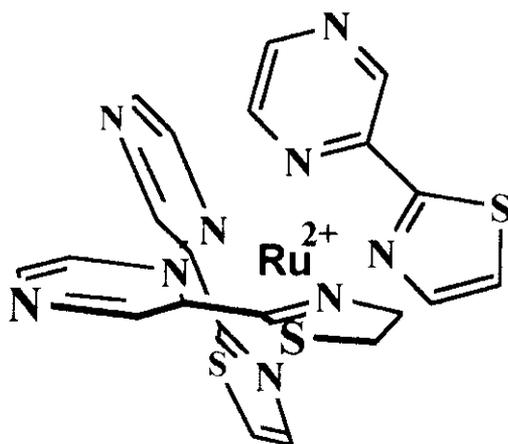


FIGURA 16. Estructura tridimensional del catión $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$

Hemos estudiado el equilibrio ácido-base del indicador en el estado fundamental. En la Figura 17 se muestran los espectros de absorción del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en disoluciones acuosas de pH comprendido entre 0 - 13, así como en disoluciones de concentración creciente de H_2SO_4 (8 - 85%, p/p), que corresponden a valores de acidez de Hammett (H_0) de hasta -8.3. Estos espectros ponen de manifiesto la existencia de un equilibrio entre las especies protonadas y la especie no protonada del complejo, evidenciado por la aparición de varios puntos isobéuticos.

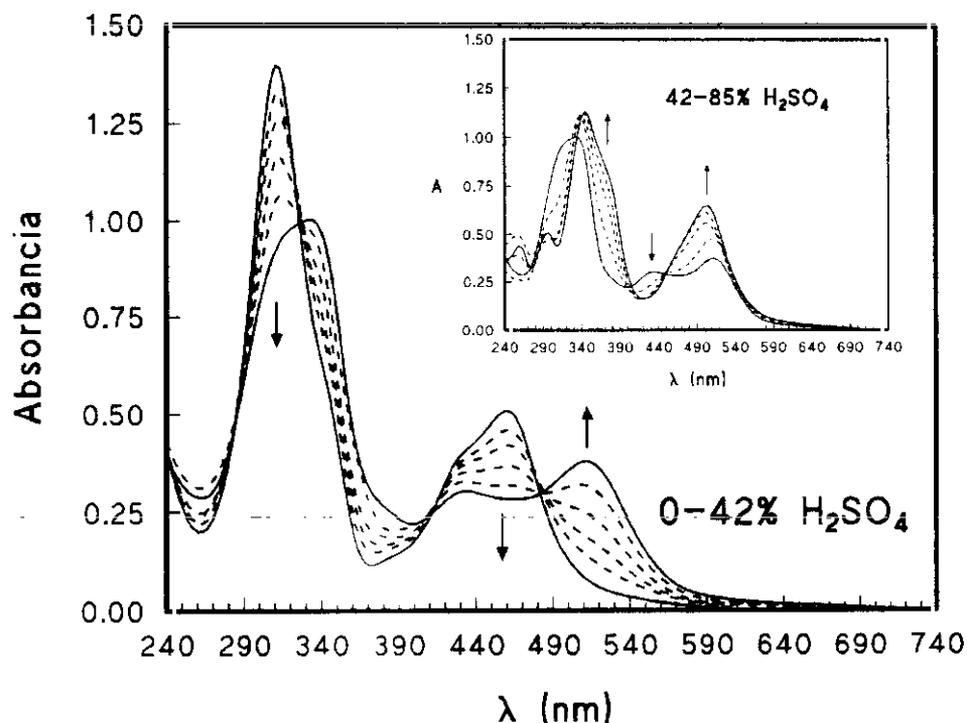


FIGURA 17. Espectros de absorción UV-VIS del complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ 10^{-5} M en función del porcentaje de H_2SO_4 (p/p) presente en el medio.

En la región de pH comprendida entre 0 - 14, el espectro de absorción del complejo de Ru(II) permanece inalterado, lo cual indica la existencia de una única especie, que es la forma no protonada. Este hecho se debe fundamentalmente a la escasa basicidad de la pirazina ($pK_a = 0.6$) que se ve disminuida adicionalmente al producirse la coordinación al centro metálico, cargado positivamente. En cambio, cuando se incrementa la concentración de H_2SO_4 entre el 8 - 42% aparecen varios puntos isobéuticos que corresponden al equilibrio entre las formas monoprotónada y no protonada de dicho complejo. Mientras que la forma no protonada presenta máximos de absorción en la zona UV y visible, situados a 311 y 460 nm respectivamente, la forma monoprotónada absorbe a 335 y 511 nm.

Si seguimos aumentando la concentración de ácido sulfúrico hasta ~ 90%, aparecen nuevos puntos isobéuticos que indican la existencia de nuevas especies protonadas. Sin embargo, todos estos cambios en el espectro de absorción son completamente reversibles si se neutraliza la acidez de la disolución.

El cálculo de la constante de acidez correspondiente al equilibrio entre las especies no protonada y monoprotónada del complejo en el estado fundamental, se ha realizado mediante valoración espectrofotométrica, por espectroscopía de absorción UV-VIS. Este método es ideal cuando el valor del pK_a es particularmente bajo o alto (e.g. menor de 2 o mayor de 11) y está basado en la determinación de la relación de especies moleculares (moléculas neutras) a especies iónicas, en una serie de disoluciones con un valor de acidez de Hammett (H_0) conocido (Rochester, 1970).

El procedimiento empleado ha consistido en preparar una serie de disoluciones acuosas con concentraciones crecientes de ácido sulfúrico y siempre la misma concentración del indicador (10^{-5} M). El porcentaje de ácido sulfúrico en la disolución se debe conocer con exactitud, ya que los valores del parámetro de acidez de Hammett (H_0) sólo están tabulados para determinadas concentraciones porcentuales del ácido usado (Rochester, 1970). Lo mismo ocurre con las densidades finales de las disoluciones, que deben ser conocidas con exactitud para asegurar la constancia en la concentración del complejo.

De esta manera, se prepararon disoluciones de complejo con concentraciones de H_2SO_4 en el intervalo de 0 - 85% (p/p) y se registró el espectro de absorción UV-VIS de cada una de ellas. La representación gráfica de la absorbancia (A) a cualquier

longitud de onda distinta de la de los puntos isobéuticos, frente al parámetro de acidez H_0 de Hammett se ajusta a una curva sigmoideal, cuyo punto de inflexión es el pK_a del compuesto. Para conseguir la máxima exactitud posible en el cálculo, se eligen aquellas longitudes de onda a las que la diferencia entre los coeficientes de absorción molar de las formas ácida y básica es máxima.

De esta forma, se ha determinado el pK_a a partir de las lecturas de absorbancia a las longitudes de onda de los cuatro máximos observados en los espectros de absorción correspondientes a disoluciones del complejo en las que la concentración de H_2SO_4 varía entre el 8 - 42% (Figura 17). Para ello, se calculó el punto de inflexión de las curvas sigmoideales A/H_0 que se muestran en la Figura 18.

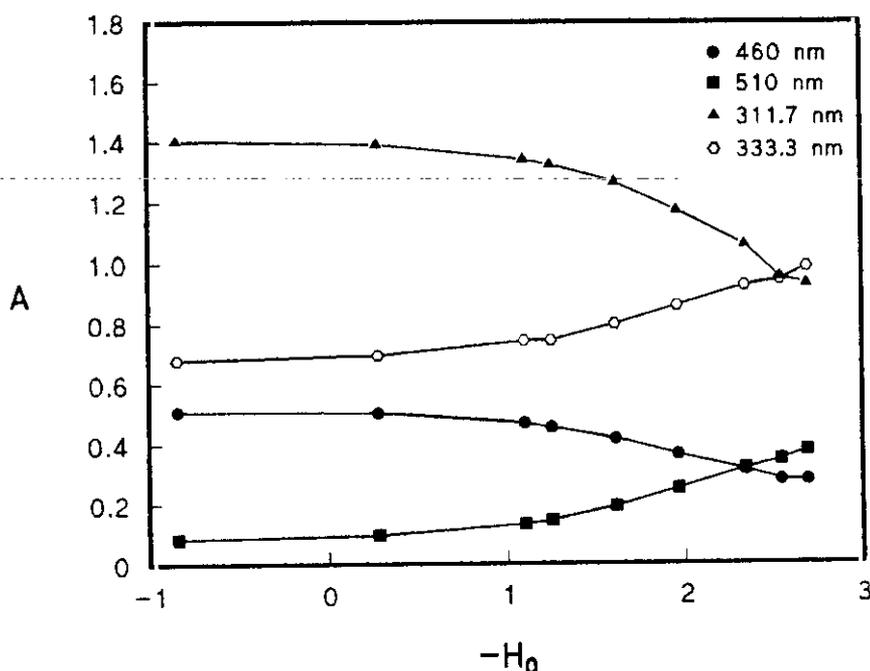


FIGURA 18. Representación gráfica de la Absorbancia frente al parámetro de acidez de Hammett (H_0) de diversas disoluciones del complejo $Ru(pzth)_3^{2+}$ 10^{-5} M en H_2SO_4 de concentración variable (8 - 42%, p/p).

El valor obtenido fue de $pK_a = -1.9 \pm 0.1$, el cual refleja efectivamente la disminución de la densidad electrónica que provoca en el heterociclo la coordinación al átomo metálico.

Aunque en los espectros de absorción del $Ru(pzth)_3^{2+}$ se aprecian nuevos puntos isobéuticos a concentraciones muy elevadas de H_2SO_4 , no ha sido posible

calcular las sucesivas constantes de acidez (pK_{a_2} y pK_{a_3}), debido a que no se logra acceder a regiones donde predominen las formas di o triprotonada.

b) Propiedades ácido-base del estado excitado.

Dado que nuestro propósito es construir un sensor de luminiscencia para la determinación de pH o la concentración de CO_2 (a través de la transducción de pH), es fundamental conocer cuál es el comportamiento del estado excitado del complejo en función de la acidez del medio.

En la Figura 19 se muestran los espectros de excitación y emisión del $Ru(pzth)_3^{2+}$ en disolución acuosa equilibrada al aire a temperatura ambiente. Como se puede apreciar en dicha figura, el complejo presenta una intensa banda de emisión centrada a 652 nm que corresponde a la desactivación del estado excitado 3MLCT . En ambos casos los espectros se encuentran sin corregir.

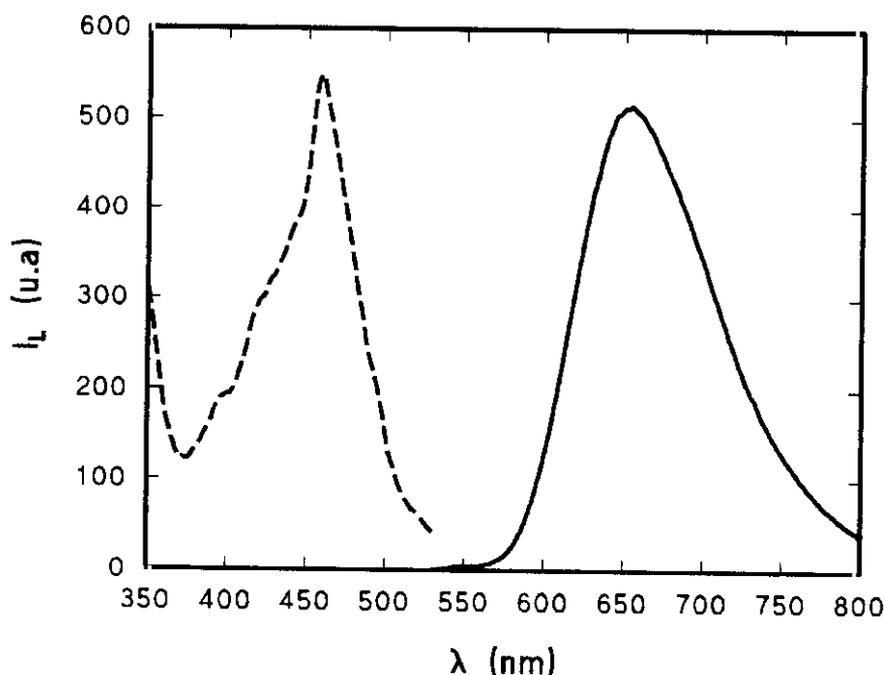


FIGURA 19. Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 653$, rendijas 10/10) y de emisión ($\lambda_{exc} = 463$ nm, rendijas 10/10, filtro en emisión a 530 nm) del $Ru(pzth)_3^{2+} 10^{-5}$ M en disolución acuosa equilibrada al aire y a temperatura ambiente. Espectros sin corregir.

Es bien conocido (*Demas et al., 1991; Juris et al., 1988*) que para este tipo de compuestos, después de la excitación se alcanza inicialmente un estado excitado singlete que se des pobla rápida y eficazmente por cruce entre sistemas a un estado

excitado triplete de transferencia de carga $^3\text{MLCT}$; (la utilización de las nomenclaturas “singlete” y “tripleto” debe tomarse en sentido laxo debido a la fuerte mezcla de estados que provoca la presencia del metal pesado). La desactivación del estado $^3\text{MLCT}$ tiene lugar a través de procesos radiativos ($\lambda_{\text{em}}^{\text{máx}} = 600 - 800 \text{ nm}$) y no radiativos. La desactivación también puede ocurrir por una promoción electrónica, térmicamente inducida, a un estado tripleto de energía próxima centrado en el metal (^3MC), el cual, a su vez, decae al estado fundamental sin emisión. Además, debido a la naturaleza intramolecular de la transferencia de carga metal-ligando, que proviene de una transición electrónica desde un orbital centrado en el metal (t_{2g}) hacia un orbital de los ligandos (π^*), se produce un aumento de la densidad electrónica del anillo de pirazina correspondiente y se exalta el carácter básico del átomo de nitrógeno que no participa en enlaces de coordinación con el átomo metálico.

Con el fin de realizar un estudio detallado de la variación de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ con el pH del medio, se procedió a realizar una valoración espectrofluorimétrica de una disolución acuosa 1 M de NaOH con una disolución acuosa 1 M de HCl en presencia de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+} 10^{-5} \text{ M}$ (Figura 20).

Para ello, se acopló al espectrofluorímetro una cubeta de cuarzo para medidas en flujo, a través de la cual se bombeó de forma continua la disolución sobre la que se iban adicionando cantidades crecientes de ácido, realizándose el espectro de emisión tras cada nueva adición y midiendo continuamente el pH del medio. La luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ disminuye hasta el 1% de su valor inicial cuando el pH varía desde 12 hasta 0. Por otra parte, la curva de valoración obtenida al llevar a cabo el proceso contrario (partiendo de una disolución ácida) conduce al mismo resultado, no observándose descomposición ni cambio alguno del espectro de absorción de las respectivas disoluciones dentro del intervalo de pH estudiado. Idénticos resultados se obtuvieron empleando otros ácidos minerales como el ácido perclórico (Figura 21).

El espectro de absorción del complejo, como ya se mencionó en el apartado anterior, no se modifica en el intervalo de pH comprendido entre 0 y 12. Asimismo, cuando una disolución acuosa del complejo que contiene un 42% de H_2SO_4 (medio en el que más del 99% de su estado fundamental está en forma monoprotonada) se excita a 511 nm, se observa una débil emisión centrada a 813 nm que corresponde a la forma monoprotonada. A la vista de estos resultados, parece claro que la

transferencia protónica tiene lugar en el estado excitado y que, en ella, se ven involucrados los átomos de nitrógeno no coordinados de la pirazina.

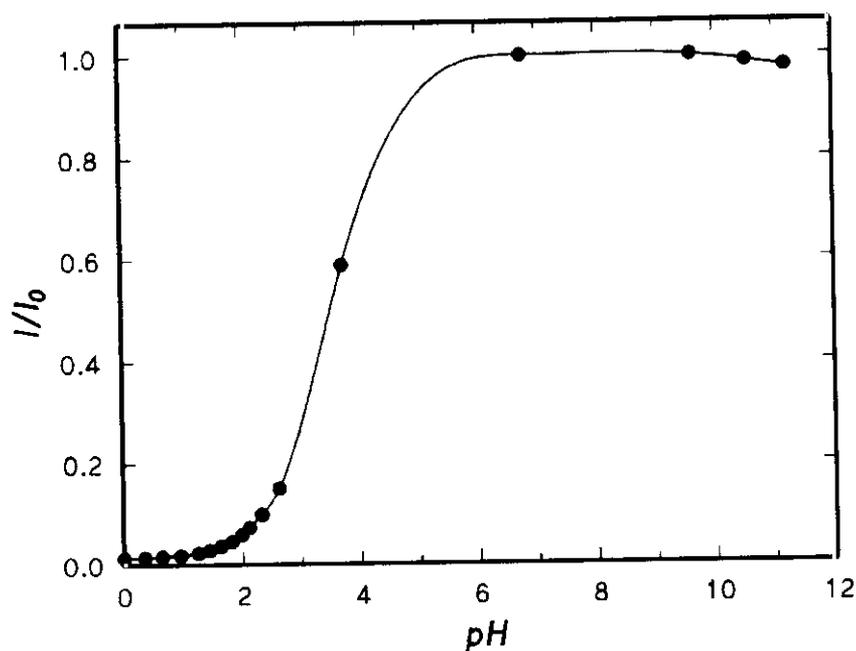


FIGURA 20. Valoración por luminiscencia de una disolución acuosa 1 M de NaOH con otra 1 M en HCl, ambas con una concentración 10^{-5} M de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$.

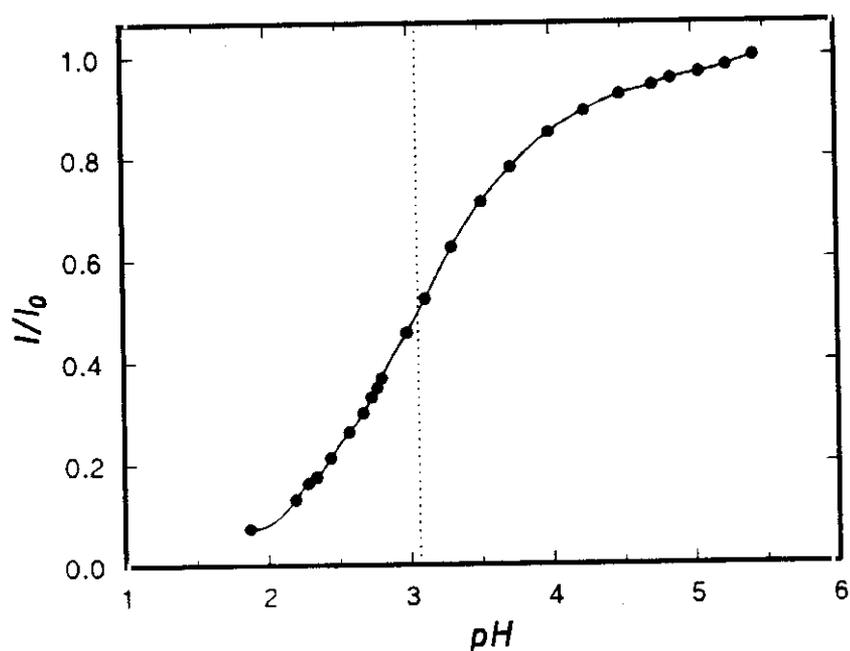


FIGURA 21. Valoración por luminiscencia de una disolución acuosa 10 mM de NaOH con otra 10 mM de HClO_4 , ambas con una concentración 10^{-5} M de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$.

Con objeto de comprobar si en medio tamponado se reproducía la variación de luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ con la acidez del medio observada anteriormente, se llevaron a cabo distintos experimentos variando la naturaleza, el pH y la concentración de distintas disoluciones amortiguadoras. Para ello, se prepararon disoluciones reguladoras de fosfato, hidrógenoftalato y acetato (Figura 22).

Se observa, en todos los casos, una dependencia de la intensidad de emisión con el pH de naturaleza sigmoideal, cuyo punto de inflexión coincide con el pK_a de los distintos tampones empleados (7.20, 5.40 y 4.76, respectivamente) (Perrin et al., 1974).

Asimismo, el grado de desactivación de la emisión depende de la concentración del tampón (Figura 22A) resultando máximo a la mayor concentración ensayada, 100 mM. Este hecho es importante de cara a la construcción del sensor, ya que permitirá el empleo de un medio tamponado de concentración notablemente superior a la utilizada en los dispositivos anteriores (típicamente 1-15 mM en tampón bicarbonato), con la consiguiente mayor simplicidad de construcción y mantenimiento operativo del terminal sensible, así como, una mayor reproducibilidad y estabilidad del sensor.

Dado que en medio básico la intensidad de emisión del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ observada es independiente de la concentración del tampón y que no ocurre así en medio ácido, se concluye que la transferencia protónica tiene lugar desde la forma ácida del tampón y que, por tanto, ésta es la auténtica especie desactivadora.

Según predice la ecuación de Stern-Volmer (Stern et al., 1919) la emisión luminiscente de un indicador puede relacionarse con la concentración de una especie que actúa como desactivadora dinámica de su estado excitado, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]$$

en donde I_0 e I son las intensidades de emisión en ausencia y en presencia del desactivador Q y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer que, a su vez, es el producto de la constante de desactivación bimolecular del estado excitado (k_q) y del tiempo de vida del estado excitado en ausencia del desactivador (τ_0). Por consiguiente, K_{sv} depende de

la naturaleza y viscosidad del disolvente, de la temperatura y de la naturaleza del luminóforo.

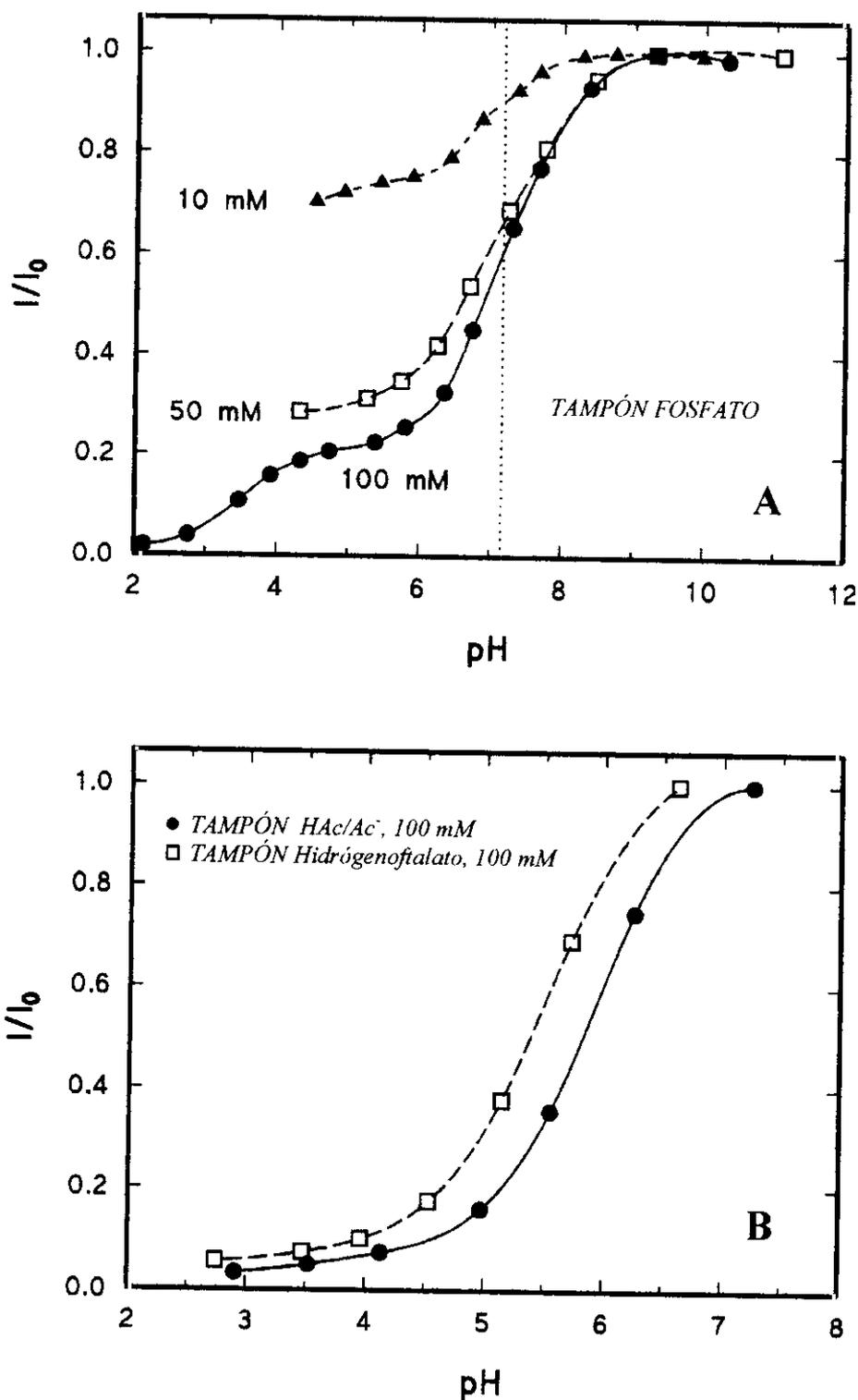


FIGURA 22. (A) Variación de la luminiscencia normalizada del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en función del pH y la concentración de una disolución amortiguadora de fosfato. (B) Variación de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en función del pH de disoluciones amortiguadoras de hidrógenoftalato y acetato.

Hemos determinado que esta relación lineal entre el cociente de I_0/I y la $[Q]$ se cumple en el caso de disoluciones del complejo (Figura 23) en las que se mantiene el pH prácticamente constante y se varía la concentración del ácido de Brønsted presente en el medio. La eficiencia del proceso de desactivación está directamente relacionada con la fuerza del ácido de Brønsted empleado y viene reflejada por el valor medido de la constante de Stern-Volmer (K_{sv}). Cuanto mayor es la fuerza del ácido más eficaz es el proceso de desactivación y mayor es el valor de dicha constante, como se pone de manifiesto con los resultados obtenidos (1975, 1570, 300, 190 y 43 M^{-1} para H_3O^+ , H_3PO_4 , hidrógenoftalato, $H_2PO_4^-$ y HAc, respectivamente).

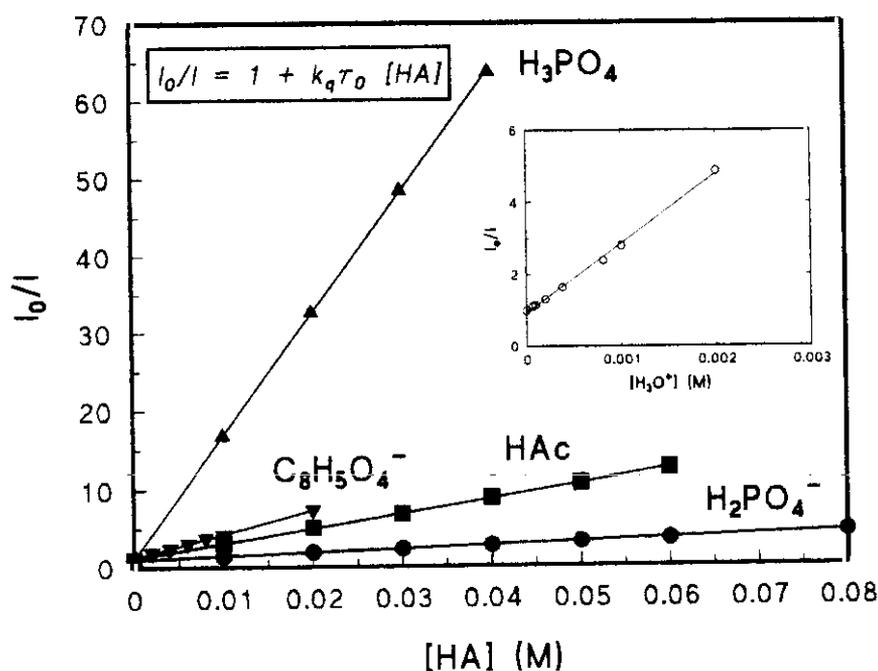


FIGURA 23. Representaciones de Stern-Volmer de disoluciones acuosas del $Ru(pzth)_3^{2+}$ en presencia de H_3PO_4 (a pH 1.5), HAc (a pH 2.8), $H_2PO_4^-$ (a pH 4.5), hidrógenoftalato (a pH 4.1) ó HCl (H_3O^+).

Sin embargo, con algunos ácidos de Brønsted catiónicos ensayados, como el TRIS o los iones imidazolio, con valores de pK_a de 8.06 y 6.9, respectivamente, se encontró que la desactivación es insignificante o prácticamente nula. Este hecho puede atribuirse a las posibles repulsiones electrostáticas entre las dos especies catiónicas, las cuales dificultan el proceso de transferencia del protón. Igualmente se ha comprobado que las bases conjugadas (fosfato, acetato y ftalato) de los ácidos de Brønsted ensayados no desactivan el estado excitado del complejo.

Por último, dado que en el caso del complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ el equilibrio ácido-base tiene lugar en el estado excitado, es de esperar que también el tiempo de vida de emisión varíe con el pH. Se han llevado a cabo medidas de tiempos de vida de disoluciones del complejo en agua, en tampón fosfato (50 mM, pH 7.00) y tampón hidrógenoftalato (50 mM, pH 5.00) equilibradas con Ar y a temperatura ambiente, obteniéndose valores de 390, 265 y 65 ns, respectivamente, lo cual corrobora nuestras hipótesis. Estos datos confirman la naturaleza dinámica de la transferencia protónica, así como la posibilidad de emplear este indicador en la construcción de un sensor de fibra óptica para la determinación de pH y/o CO_2 (como representante principal de los gases "ácidos" de interés clínico y ambiental), basado en medidas de intensidad de luminiscencia y/o tiempos de vida .

3.1.3.2. Evaluación del pK_a del estado excitado (pK_a^*).

Una caracterización completa del indicador requiere la evaluación de la constante de acidez del estado excitado (pK_a^*). El punto de inflexión de las curvas de valoración de las Figuras 18-20 no refleja, a diferencia de lo que ocurría con los espectros de absorción, el pK_a^* del estado excitado del indicador luminiscente, salvo en el caso de que las formas ácida y básica del mismo tengan el mismo tiempo de vida de emisión (Schulman, 1988).

Una de las formas de calcular este parámetro es a partir de la ecuación desarrollada por Förster (15) (Ireland et al., 1976), que se basa en la equivalencia termodinámica de los distintos caminos por los que una especie ácida (A), en el estado fundamental, puede alcanzar el estado excitado de menor energía de la base conjugada (B).

$$\text{pK}_a^* = \text{pK}_a + 2.1 \times 10^4 [(1/\lambda_B) - (1/\lambda_A)] \quad (15)$$

Para el caso que nos ocupa, el empleo de dicha ecuación conduce a valores de pK_a^* de 2.6 y 4.5 dependiendo de si las longitudes de onda usadas son las de absorción o emisión, respectivamente. La discrepancia entre ambos valores se debe, probablemente, a las condiciones restrictivas del ciclo de Förster, que son todavía mayores cuando se trata de los quelatos de rutenio.

Una forma alternativa de evaluar el pK_a^* es a partir de los tiempos de vida de emisión (τ), mediante el empleo de la ecuación (16):

$$pK_a^* = pK_{ap}^* + \log (\tau_A/\tau_B) \quad (16)$$

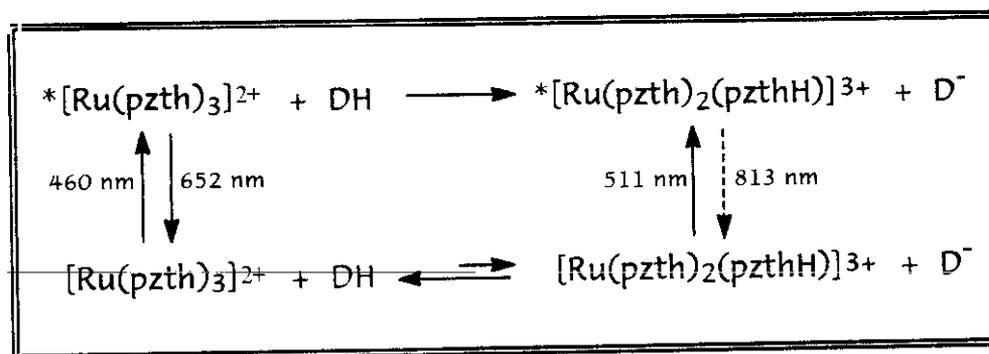
donde pK_{ap}^* corresponde al punto de inflexión de la curva de valoración de una disolución de NaOH 1 M con HCl de la misma concentración, utilizando $Ru(pzth)_3^{2+}$ como indicador.

Sin embargo, ha sido imposible determinar el tiempo de vida de la forma monoprotonada del complejo, ya que, presenta tiempos de vida menores que la propia resolución del equipo utilizado (7 ns) y tan sólo se ha podido obtener el valor del pK_{ap}^* que resulta ser de 3.5.

A la vista de los resultados, no se puede asignar un valor exacto al pK_a^* , únicamente se sabe que es ciertamente mayor que el correspondiente al estado fundamental (pK_a) y, por tanto, que la basicidad del complejo $Ru(pzth)_3^{2+}$ es mayor en el estado excitado.

3.1.3.3. Fundamento de la medida.

Como resumen de lo ya expuesto, se ha llegado a la conclusión de que el mecanismo por el cual la emisión del complejo $Ru(pzth)_3^{2+}$ es sensible a los H_3O^+ o a los ácidos de Brönsted es el que aparece en el siguiente esquema, aceptado por otros autores para compuestos similares (Nazeeruddin et al., 1984):



ESQUEMA 3

donde DH representa H_3O^+ . Este esquema de reacción se mantiene cuando el complejo está

en presencia de una disolución reguladora (DH/D⁻), siendo en este caso la forma ácida del tampón (DH) la auténtica especie desactivadora.

En su *estado fundamental*, entre pH 0 y 14, el complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ se comporta como una *base muy débil*, por lo que se encuentra casi exclusivamente en su forma no protonada; se precisa un medio fuertemente ácido (42% de H_2SO_4 , como ponen de manifiesto los espectros de absorción UV-VIS mostrados en la Figura 17) para que tenga lugar dicha protonación. La excitación electrónica de la forma no protonada puede realizarse prácticamente a cualquier longitud de onda en el intervalo comprendido entre 190 - 550 nm, aunque el máximo de absorción en la región visible del espectro electromagnético se encuentra a 460 nm (véase Figura 17). En el *estado excitado*, la basicidad del complejo es del orden de 10^6 veces *superior* (debido fundamentalmente, al aumento de la densidad electrónica sobre los tres átomos de nitrógeno no coordinados de la pirazina, como consecuencia de la transferencia intramolecular metal-ligando), de forma que si existen H_3O^+ u otros ácidos de Brönsted en el medio, es capaz de intervenir en una reacción bimolecular con éstos antes de regresar de nuevo al estado fundamental. Por lo tanto, el $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en el estado excitado puede protonarse a valores de pH en que no existe la forma ácida conjugada del estado fundamental (probablemente, se trata de una protonación irreversible, pues el cortísimo tiempo de vida del estado excitado, una vez que ha aceptado un ion hidrógeno, impide que se establezca un equilibrio ácido-base).

Asimismo, el estado excitado de la forma no protonada del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$, se desactiva también, por emisión de fuerte luminiscencia a 652 nm (máximo de emisión sin corregir). Por el contrario la forma monoprotonada del complejo excitado regresa mucho más rápidamente a su estado fundamental, con emisión de una débil luminiscencia a 813 nm (máximo de emisión sin corregir). Por consiguiente, la intensidad de emisión a 652 nm, será proporcional a la acidez o concentración de otro ácido de Brönsted presente en el medio. Por otra parte, puesto que la protonación tiene lugar en el estado excitado, el tiempo de vida de emisión del mismo (en su forma no protonada) también se ve alterado en función de la concentración de ácido presente en el medio.

Este principio de medida es totalmente original y distinto a los empleados, hasta

el momento, en la construcción de sensores de fibra óptica para la determinación de pH y/o CO₂ (véase TABLA VI, sección 3.1.2.2) (Orellana et al., 1992), cuyo esquema básico de funcionamiento se basa en el equilibrio ácido-base del estado fundamental del indicador.

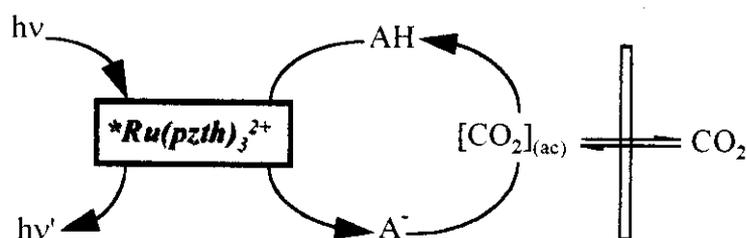
3.1.3.4. Elección de la disolución reguladora y del pH de trabajo.

En un primer intento de evaluar el efecto producido por el CO₂ sobre las propiedades luminiscentes del complejo, se llevó a cabo un estudio en disolución, previo a la construcción del sensor, del comportamiento del indicador en presencia de concentraciones variables del analito. Para ello, se midieron los valores de los tiempos de vida de emisión de disoluciones acuosas 10⁻⁵ M de Ru(pzth)₃²⁺ saturadas de Ar, aire y CO₂, obteniéndose valores de 414, 358 y 333 ns, respectivamente. Después de resaturar la disolución con Ar se obtiene una recuperación de la señal inicial del 98.8%. Estos datos ponen de manifiesto la existencia de una dependencia entre la señal luminiscente del indicador y la concentración de CO₂ presente en el medio, lo cual permitiría (como ya anticipábamos en las secciones precedentes), el empleo de este compuesto en la construcción de un optodo para CO₂. Sin embargo, las condiciones experimentales en las que llevaron a cabo estas determinaciones parecen no ser las óptimas, puesto que la emisión y el tiempo de vida del indicador en presencia de un 100% del analito, disminuyen tan sólo un 20% respecto al valor obtenido en ausencia del mismo. Por esta razón pasamos a estudiar nuevas disoluciones amortiguadoras, a partir de las cuales, obtuviésemos una mayor sensibilidad para el analito, de cara a la construcción de un sensor de fibra óptica competitivo con los ya descritos en la bibliografía.

A la hora de elegir el tampón se han tenido en cuenta varios aspectos. En primer lugar, se debe trabajar a un pH tal, que todo el ácido de Brönsted presente en la disolución se encuentre su forma básica conjugada, de manera que reaccione con el analito según se indica en el esquema 4. Por otra parte, el pH del medio debe ser adecuado para disolver la máxima cantidad posible de CO₂, consiguiendo al mismo tiempo una cierta concentración de especie desactivante del indicador excitado.

Considerando los resultados indicados en el apartado 3.1.3.1, se prepararon disoluciones 10⁻⁵ M del Ru(pzth)₃²⁺ en tampones de distinta naturaleza, estudiando los

cambios producidos en la emisión luminiscente, después de saturar la disolución con 100% CO₂ y 100% Ar en ciclos sucesivos.



ESQUEMA 4

Se ensayaron disoluciones amortiguadoras de fosfato 100 mM a distintos valores de pH: 8.4, 7.9 y 7.2, comprobándose que de todos ellos, el medio más alcalino es el que proporciona la mayor sensibilidad al CO₂, obteniéndose valores del cociente I_0/I (I_0 : intensidad de emisión en presencia de 100 Ar; I : intensidad de emisión en presencia de 100% de CO₂) de 2.35. Los resultados obtenidos con esta disolución se muestran en la Figura 24A.

Un hecho que llama la atención observando dicha gráfica es que, a partir del 2º ciclo de medida, no es posible obtener recuperaciones del 100% de la señal inicial, después de resaturar la disolución con Ar. En principio, este fenómeno podría deberse a la permanencia en la disolución de una pequeña cantidad de CO₂ residual (en forma de las especies determinadas por el pH final del medio), que no puede ser eliminado por completo de la fase acuosa.

Aparte del fosfato, también se estudió la posibilidad de utilizar tampón hidrógenoftalato (HFT⁻)/ftalato (FT²⁻) cuyo valor de pK_{a_2} es de 5.41, ya que se ha comprobado, (véase Figura 21), que la desactivación del estado excitado del indicador por los iones hidrógenoftalato es más eficaz que la observada en presencia de H₂PO₄⁻, lo cual nos llevó a tomarlo en consideración, a pesar del riesgo de trabajar en el límite de la capacidad amortiguadora del tampón.

Para ello, se prepararon disoluciones del complejo en tampón hidrógenoftalato/ftalato de concentración 0.1 M cuyos valores de pH correspondían a 6.52, 7.25 y 7.45, respectivamente. En cada una de ellas, se midió la variación de la señal

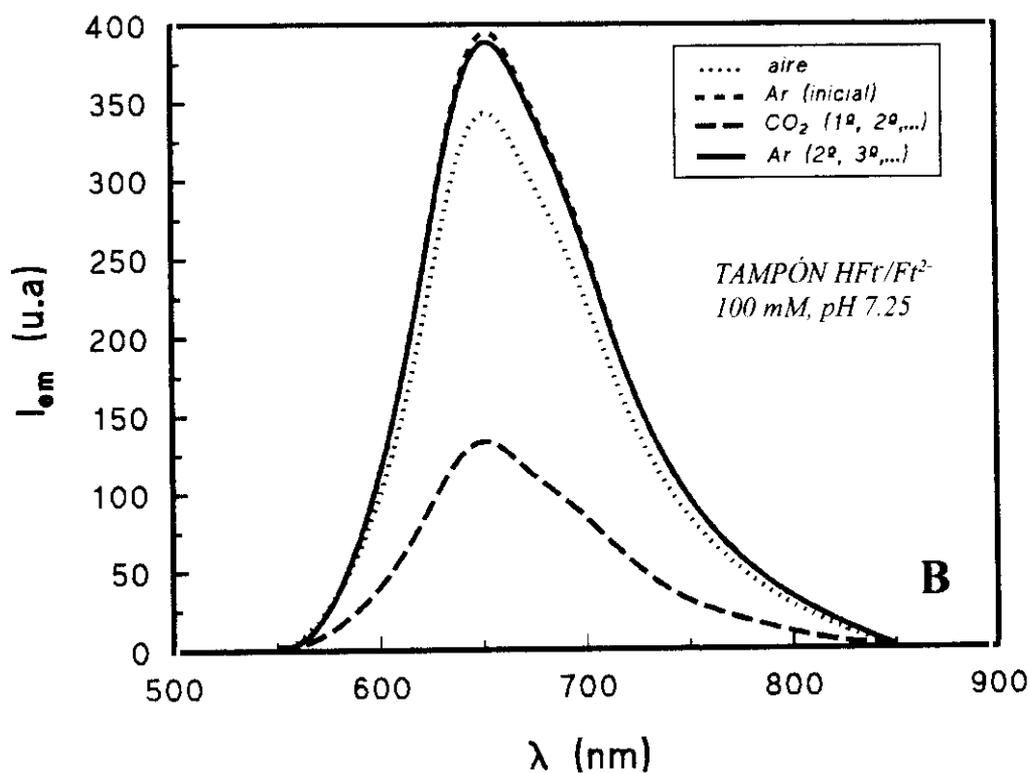
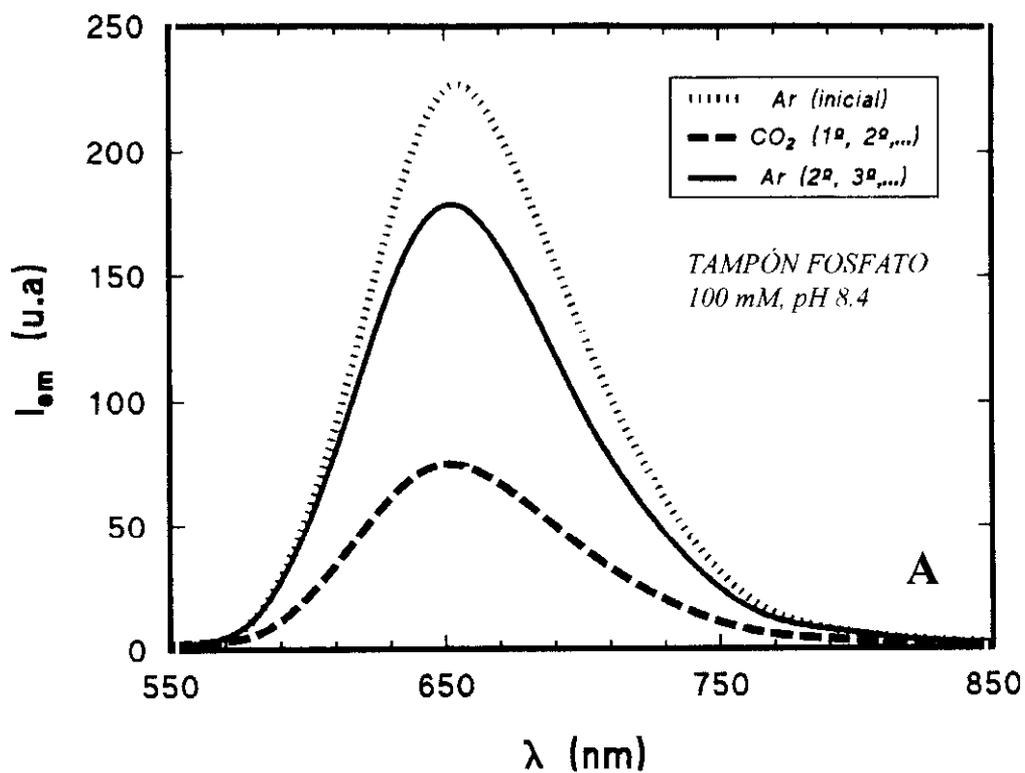


FIGURA 24. Efecto del CO_2 sobre la intensidad de emisión del $Ru(pzth)_3^{2+}$ en presencia (A) de una disolución reguladora de fosfato 100 mM a pH 8.4 y (B) en presencia de una disolución reguladora de HFT/ Ft^{2-} 100 mM a pH 7.25.

de emisión después de borbotear en la disolución sucesivamente una muestra de gas de 100% Ar - 100% CO₂ (I_0 : intensidad de emisión en presencia de 100% Ar; I : intensidad de emisión en presencia de 100% CO₂), obteniéndose los resultados que figuran en la TABLA VII.

TABLA VII. EFECTO DEL pH DE LA DISOLUCIÓN AMORTIGUADORA Hf⁺/Ft²⁻ (0.1 M) SOBRE LA RESPUESTA DEL Ru(pzth)₃²⁺ 10⁻⁵ M FRENTE A CICLOS SUCESIVOS 100% Ar - 100% CO₂.

| pH | I_0/I | | |
|------|---------|---------|---------|
| | CICLO 1 | CICLO 2 | CICLO 3 |
| 6.52 | 2.35 | 2.38 | 2.37 |
| 7.25 | 3.01 | 2.95 | 2.93 |
| 7.45 | 3.12 | 3.05 | 3.05 |

La elección del pH óptimo supone llegar a un compromiso entre el grado de desactivación obtenido y la capacidad amortiguadora del tampón. A la vista de los resultados mostrados en la TABLA VII, se ha seleccionado el pH de 7.25 como el más adecuado, por ser aquél al cual el proceso desactivación/recuperación ha resultado más favorable con respecto a los otros dos probados. A pH menores de 7.25, la variación de la concentración de hidrógenoftalato en el medio es menor y, de ahí que, la desactivación se produzca en menor extensión. A valores de pH mayores de 7.25 el grado de desactivación es ligeramente superior, pero la capacidad amortiguadora del tampón es menor, con la consiguiente inestabilidad del pH que ello conlleva.

Por otra parte, los espectros de emisión mostrados en las Figuras 24A y 24B, demuestran que la eficacia de la desactivación en presencia de una disolución saturada de CO₂, es mayor cuando se utiliza una disolución amortiguadora de hidrógenoftalato potásico, ya que la emisión del complejo disminuye un 67% de su valor inicial frente a un 57% en el caso del tampón fosfato. En cuanto a los tiempos de vida de emisión obtenidos en presencia de tampón hidrógenoftalato, sus valores, 387 ns (Ar), 332 ns (aire) y 111 ns (CO₂), confirman los resultados obtenidos con medidas de intensidad de emisión.

Por otra parte, en lo que se refiere a la recuperación de la señal inicial, el empleo de hidrógenoftalato de pH 7.25, también favorece dicho proceso, ya que se han obtenido recuperaciones del 97% frente al 80% alcanzado con tampón fosfato. Sin embargo, en ambos casos los sucesivos ciclos 100% Ar - 100% CO₂ conducen exactamente a los mismos niveles de emisión de la primera purga con CO₂ y de la segunda saturación con Ar. Este fenómeno, como ya anticipábamos, puede deberse a una pequeña cantidad de CO₂ que permanece en la disolución y que no puede ser eliminado por completo del medio.

La obtención de una desactivación más eficaz del estado excitado, así como la mayor recuperación de la señal inicial obtenidas con el empleo de un tampón hidrógenoftalato/ftalato, han sido las razones que nos han llevado a seleccionar este sistema regulador como el óptimo para la construcción del sensor objeto de este trabajo. En presencia del tampón, la intensidad y el tiempo de vida del Ru(pzth)₃²⁺ tendrán un valor determinado, debido a su desactivación parcial por el hidrógenoftalato presente en la disolución. Ahora bien, la disolución del CO₂ en dicho medio producirá una variación en las concentraciones de hidrógenoftalato y ftalato, de manera que aumentará la concentración de HFT⁻ en el medio, produciéndose consecuentemente una disminución de la intensidad y tiempo de vida de luminiscencia, que será proporcional a la concentración de CO₂.

Por último, reseñar que, al igual que ocurre con otros complejos de Ru(II) (Demas et al., 1991), se ha comprobado que el O₂ también desactiva el estado excitado del Ru(pzth)₃²⁺, ya que los valores, tanto de intensidad de emisión, como de tiempos de vida, obtenidos a partir de disoluciones acuosas del complejo equilibradas al aire son el 83% de los correspondientes a la misma disolución purgada con Ar. En medio tamponado se han obtenido resultados similares.

3.1.3.5. Efecto del CO₂ disuelto sobre la respuesta del indicador. Modelado teórico.

Una vez optimizados el tipo y pH de la disolución reguladora que proporcionan mayor sensibilidad en la respuesta al CO₂, se procedió a realizar un calibrado en disolución borboteando gases con un porcentaje variable de CO₂. Para ello, se han medido los valores de intensidad y tiempo de vida de emisión de disoluciones del

complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en tampón $\text{Hf}^-/\text{Ft}^{2-}$ 100 mM y a pH 7.25, saturadas alternativamente con Ar y con mezclas Ar- CO_2 de distinto contenido en este último gas.

En la Figura 25 se muestra el calibrado realizado en todo el intervalo de concentraciones de CO_2 , en el cual se ha representado el cociente I_0/I (τ_0/τ) en función del porcentaje de CO_2 presente en la mezcla de gases (donde I_0 (τ_0) es la intensidad (tiempo de vida) de emisión del compuesto en ausencia de CO_2 e I (τ) es la intensidad (tiempo de vida) de emisión en presencia de distintas mezclas Ar/ CO_2).

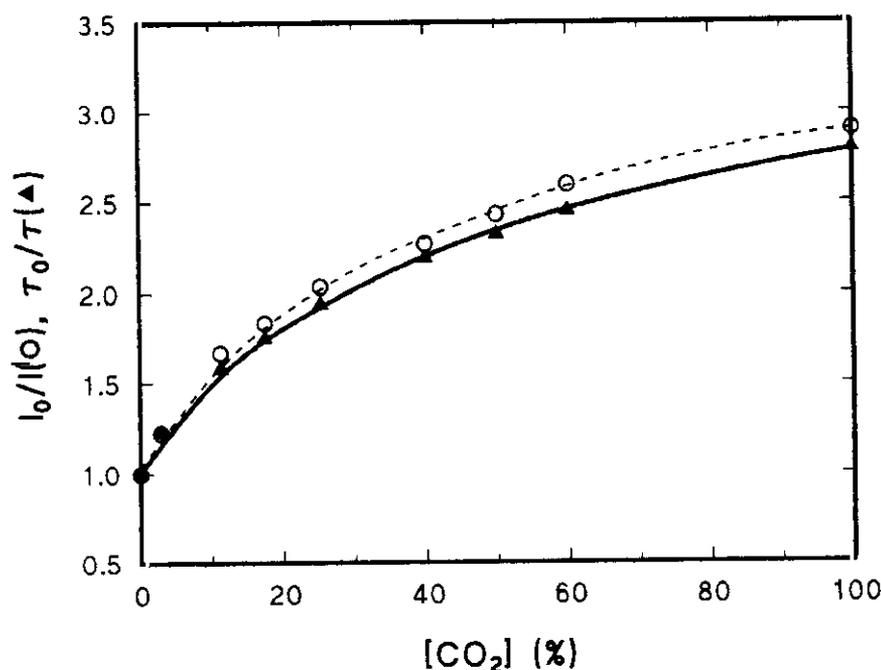


FIGURA 25. Calibrado realizado en una disolución de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ 10^{-5} M en tampón hidrógenoftalato 0.1 M a pH 7.25, empleando una mezcla de gases CO_2/Ar saturadas con H_2O en función de la concentración de CO_2 presente en la misma. Condiciones de trabajo ($P_T = 718.15$ Torr; 21°C ; $P_{\text{V}_{\text{H}_2\text{O}}}(21^\circ\text{C}) = 21.65$ Torr). La línea sólida/punteada corresponde a una unión manual de los puntos experimentales.

Como se observa en esta Figura, no se obtienen relaciones lineales, como cabría esperar a partir de la representación de I_0/I (τ_0/τ) frente a la concentración de CO_2 , tal y como predice la ecuación de Stern-Volmer (17) para aquellos casos en los que la desactivación es puramente dinámica.

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_{\text{sv}} [Q] \quad (17)$$

Sin embargo, habría que tener en cuenta dos aspectos que explicarían la falta de linealidad observada en los calibrados de Stern-Volmer: en primer lugar, el mecanismo que gobierna la respuesta de nuestro indicador hacia el CO_2 , donde el verdadero desactivador de la luminiscencia del complejo es el ion hidrógenoftalato y no el CO_2 ; y en 2º lugar, los equilibrios químicos en los que se ven involucradas las especies presentes en la disolución.

De cara a una completa caracterización del mecanismo de respuesta del sensor, sería deseable encontrar una función matemática que relacione la señal analítica obtenida con la concentración de CO_2 , de forma que se pueda llegar a obtener un modelo que permita predecir el comportamiento del sensor y la función de calibrado a partir del menor número posible de puntos. Para ello, es necesario conocer cómo se modifica el pH de la disolución y, por tanto, la concentración de la especie hidrógenoftalato (HFt^-) (verdadero desactivador) en función de la presión parcial de CO_2 .

Puesto que existe una dependencia de las constantes de equilibrio con la fuerza iónica, antes de plantear ningún equilibrio, calcularemos en primer lugar el valor de la fuerza iónica de nuestro medio compuesto de un tampón hidrógenoftalato/ftalato de concentración 0.1 M y pH 7.25, empleando la siguiente expresión:

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i (z_i)^2 \quad (18)$$

donde c_i y z_i corresponden a la concentración y la carga del ion, respectivamente.

Se ha obtenido un valor de $\mu = 0.3$ que deberá considerarse a la hora de calcular el valor de las respectivas constantes de equilibrio aparentes.

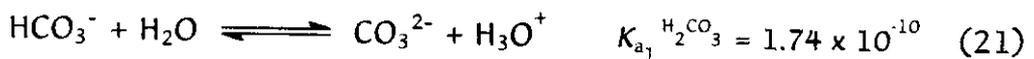
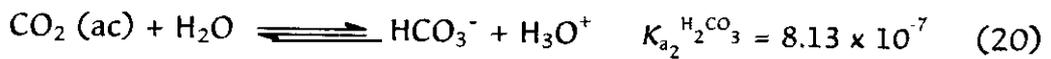
La cantidad de CO_2 disuelto en agua depende no sólo de su presión parcial, sino también de la interacción con otros solutos presentes en la disolución (*Butler, 1982*). En soluciones ácidas ($\text{pH} < 5$) la concentración de CO_2 (en mol L^{-1}) viene determinada por la ley de Henry:

$$[\text{CO}_2] = K_H \cdot P_{\text{CO}_2} \quad (19)$$

donde P_{CO_2} es la presión parcial de CO_2 en atmósferas y K_H es la constante de Henry, la cual varía ligeramente con la composición del medio. En este caso, teniendo en

cuenta la fuerza iónica del medio ($\mu = 0.3$), K_H vale $0.0316 \text{ mol L}^{-1} \text{ atm}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (Butler, 1982).

En el caso de disoluciones alcalinas, el CO_2 hidratado se ioniza para dar iones hidrógeno, iones bicarbonato e iones carbonato, de acuerdo a las ecuaciones (20) y (21). La reacción de hidratación del CO_2 en agua para originar H_2CO_3 , es lenta comparada con la reacción de ionización del H_2CO_3 , por lo que, si se realizasen mediciones en la escala de tiempos del orden de milisegundos, se podría distinguir entre el CO_2 disuelto y las especies hidratadas. Sin embargo, en el equilibrio la $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ es tan sólo 10^{-3} veces la de CO_2 y, al tratarse de especies no cargadas, ninguna de ellas tiene especial significación en el equilibrio ácido-base, por lo que expresaremos a partir de este momento de forma abreviada la suma de $[\text{H}_2\text{CO}_3] + [\text{CO}_2]$ simplemente como $[\text{CO}_2]$.



La dependencia de la concentración de las distintas especies con el pH vendrá dada por las siguientes ecuaciones, en forma logarítmica:

$$\log [\text{CO}_2] = \log K_H + \log P_{\text{CO}_2} = -1.50 + \log P_{\text{CO}_2} \quad (22)$$

$$\begin{aligned} \log [\text{HCO}_3^-] &= \log K_{a_2} + \log [\text{CO}_2] - \log [\text{H}_3\text{O}^+] = & (23) \\ &= -7.59 + \log P_{\text{CO}_2} + \text{pH} \end{aligned}$$

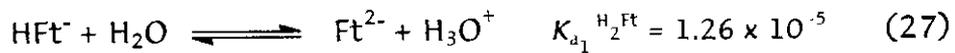
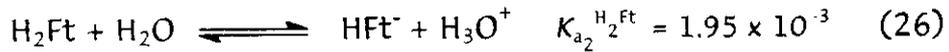
$$\begin{aligned} \log [\text{CO}_3^{2-}] &= \log K_{a_1} + \log [\text{HCO}_3^-] - \log [\text{H}_3\text{O}^+] = & (24) \\ &= -17.35 + \log P_{\text{CO}_2} + 2 \text{ pH} \end{aligned}$$

$$\log [\text{H}_2\text{CO}_3] = -3 + \log [\text{CO}_2] \quad (25)$$

Las $[\text{CO}_2]$ y $[\text{H}_2\text{CO}_3]$ son independientes del pH; tan sólo dependen de la presión parcial de CO_2 . Las únicas especies cuya concentración varía en función del pH son HCO_3^- y CO_3^{2-} .

Por otra parte, otros equilibrios posibles son aquéllos en los que se ven involucradas las especies que constituyen la disolución amortiguadora. Para obtener esta disolución se disolvió hidrógenoftalato potásico en un volumen determinado de

agua y, a continuación y antes de enrasar la disolución, se ajustó el pH hasta 7.25 mediante la adición de NaOH.



Sabiendo que $0.1 = [\text{H}_2\text{Ft}] + [\text{HFt}^-] + [\text{Ft}^{2-}]$, a partir de las ecuaciones (26) y (27) despejando y sustituyendo tendremos:

$$0.1 = [\text{HFt}^-] \left[1 + \frac{[\text{H}_3\text{O}^+]}{K_{a_2}^{\text{H}_2\text{Ft}}} + \frac{K_{a_1}^{\text{H}_2\text{Ft}}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \right] \quad (28)$$

de donde, despejando la $[\text{HFt}^-]$ que, de acuerdo a lo indicado en 3.1.3.1.b, se propone es la especie desactivante del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ excitado:

$$[\text{HFt}^-] = \frac{0.1 K_{a_2}^{\text{H}_2\text{Ft}} [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{H}_3\text{O}^+]^2 + K_{a_2}^{\text{H}_2\text{Ft}} [\text{H}_3\text{O}^+] + K_{a_2}^{\text{H}_2\text{Ft}} K_{a_1}^{\text{H}_2\text{Ft}}} \quad (29)$$

Esta expresión pone de manifiesto la dependencia de la $[\text{HFt}^-]$ (desactivador del estado excitado del indicador) con el pH, que a su vez dependerá de la concentración de CO_2 disuelto en el medio. Para el cálculo del pH correspondiente a cada presión parcial de CO_2 , tendremos que plantear en primer lugar el balance de carga incluyendo todas las especies iónicas presentes en el medio,

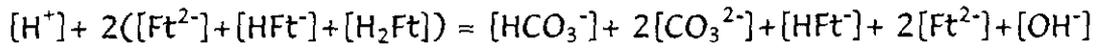
Balance de carga:

$$[\text{H}^+] + [\text{Na}^+] + [\text{K}^+] = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{HFt}^-] + 2[\text{Ft}^{2-}] + [\text{OH}^-] \quad (30)$$

Por otra parte, si consideramos que inicialmente, a $\text{pH} = 7.25$, prácticamente todo el HFt^- se ha neutralizado con NaOH para dar Ft^{2-} , en el equilibrio se cumplirá que:

$$[\text{Na}^+] = [\text{K}^+] = ([\text{Ft}^{2-}] + [\text{HFt}^-] + [\text{H}_2\text{Ft}]) \quad (31)$$

Sustituyendo esta expresión en el balance de carga,



de donde se obtiene la condición protónica:

$$\boxed{[H^+] + [HFt^-] + 2[H_2Ft] = [HCO_3^-] + 2[CO_3^{2-}] + [OH^-]} \quad (32)$$

A partir del diagrama, representado en la Figura 26, se puede concluir que esta condición protónica se cumple en el punto de corte $[HFt^-] = [HCO_3^-]$, lo cual implica, que el equilibrio prioritario es el correspondiente a la reacción:

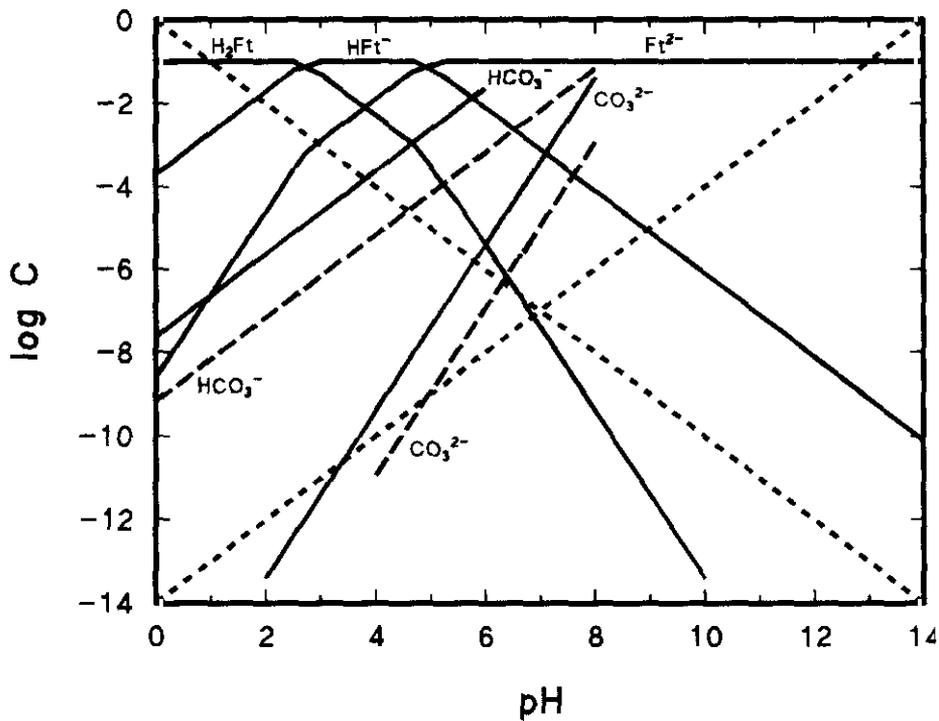


FIGURA 26. Diagrama de predominancia de las especies presentes en disolución en función del pH y de la presión parcial de CO₂: (—) P_{CO₂} = 0.91 atm; (---) P_{CO₂} = 0.03 atm.

En el equilibrio, se cumplirá que $[HFt^-] = [HCO_3^-]$. Sustituyendo estas concentraciones por sus valores correspondientes de acuerdo a las ecuaciones (23) y (29) tendremos:

$$\boxed{[HFt^-] = \frac{0.1 K_{a_2}^{H_2Ft} [H_3O^+]}{[H_3O^+]^2 + K_{a_2}^{H_2Ft} [H_3O^+] + K_{a_2}^{H_2Ft} K_{a_1}^{H_2Ft}} = \frac{2.6 \times 10^{-8} P_{CO_2}}{[H_3O^+]}} \quad (33)$$

Finalmente, introduciendo en la ecuación (33) los valores correspondientes de las constantes de equilibrio, podremos calcular el valor de pH correspondiente a cada presión parcial de CO_2 y, una vez conocido, se podrá calcular $[\text{HFt}^-]$ a partir de la ecuación (29). En la TABLA VIII aparecen calculados los valores de pH y $[\text{HFt}^-]$ correspondientes a los valores de P_{CO_2} utilizados para el calibrado representado en la Figura 25.

TABLA VIII. CÁLCULO DEL pH y $[\text{HFt}^-]$ PARA CADA VALOR DE P_{CO_2} EMPLEADA EN EL CALIBRADO EN DISOLUCIÓN.

| $[\text{CO}_2]$, % ^a | P_{CO_2} ^b | pH ^c | $[\text{HFt}^-]$, mM ^d |
|----------------------------------|--------------------------------|-----------------|------------------------------------|
| 3 | 0.03 | 6.53 | 2.3 |
| 5 | 0.05 | 6.41 | 3.0 |
| 11 | 0.10 | 6.23 | 4.5 |
| 17 | 0.16 | 6.13 | 5.5 |
| 25 | 0.23 | 6.04 | 6.5 |
| 40 | 0.37 | 5.95 | 8.4 |
| 50 | 0.46 | 5.89 | 9.1 |
| 60 | 0.55 | 5.85 | 10.0 |
| 100 | 0.91 | 5.73 | 12.6 |

^a En mezclas CO_2 -Ar.

^b Calculado a partir de la expresión $(P_{\text{atm}} - P_{\text{vH}_2\text{O}}^{21^\circ\text{C}}) \times (\% \text{CO}_2)$.

^c Calculado a partir de la ec. (33).

^d Calculado a partir del pH obtenido y la ec. (29).

En la Figura 27, se representa el cociente I_0/I (τ_0/τ) obtenido al borbotear en la disolución amortiguadora mezclas gaseosas con distinto porcentaje de CO_2 , en función de la $[\text{HFt}^-]$ teóricamente presente en la disolución, calculada en la TABLA VIII una vez alcanzado el equilibrio. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de una relación lineal entre I_0/I (τ_0/τ) y la concentración de HFt^- , lo cual confirma la hipótesis de que, efectivamente, es el hidrógenoftalato el auténtico desactivador de la

emisión del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ excitado. Las rectas de ajuste obtenidas en cada caso son: $I_0/I = (0.163 \pm 0.005)[\text{HFt}^-] + (0.93 \pm 0.04)$ y $\tau_0/\tau = (0.146 \pm 0.006)[\text{HFt}^-] + (0.94 \pm 0.05)$, con coeficientes de regresión lineal $r = 0.999$, correspondiendo la pendiente del calibrado a la constante de Stern-Volmer. Se han encontrado diferencias significativas entre las pendientes de ambos calibrados para un nivel de confianza del 99%. Como se observa en la Figura 27, el calibrado obtenido representando intensidad de emisión relativa, queda ligeramente por encima del calibrado de tiempos de vida, lo cual podría atribuirse a la existencia de un cierto grado de desactivación estática de la luminiscencia.

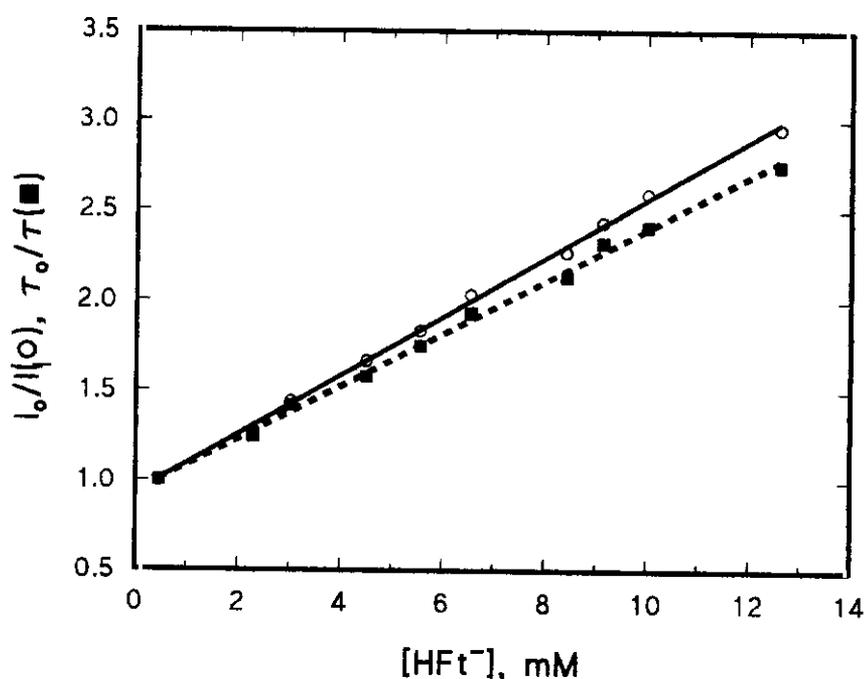


FIGURA 27. Calibrados de Stern-Volmer, representando I_0/I y τ_0/τ en función de la concentración de hidrógenoftalato.

Los datos experimentales permiten calcular una constante de asociación entre el HFt^- y el $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ igual a 18 M^{-1} . La K_{sv} obtenida a partir de la gráfica de la Figura 27 (160 M^{-1}), es lógicamente inferior a la determinada a partir de la representación de la Figura 23 (300 M^{-1}) debido a la muy superior fuerza iónica a la que se ha llevado a cabo el primero de los experimentos. Un aumento de la fuerza

iónica disminuye la velocidad de reacción entre especies cargadas netas de signo opuesto, como predice la teoría de Debye-Smoluchowsky (Rau et al., 1986).

Una vez conseguido nuestro primer objetivo, que consistía en demostrar la existencia de una dependencia lineal entre el cociente $I_0/I(\tau_0/\tau)$ y $[HFT^-]$, el siguiente paso en nuestro estudio ha sido deducir una expresión matemática que permita relacionar la señal analítica con la P_{CO_2} , de forma que se pueda llegar a obtener una ecuación de ajuste para los calibrados representados en la Figura 25. Puesto que, como ha quedado demostrado, el ion hidrógenoftalato es la especie que desactiva la luminiscencia del estado excitado del $Ru(pzth)_3^{2+}$, la ecuación de Stern-Volmer se puede escribir de la siguiente forma:

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_{sv} [HFT^-]$$

y, como en el equilibrio se cumple que $[HFT^-] = [HCO_3^-]$, sustituyendo en la expresión anterior, queda expresada la ecuación de Stern-Volmer en función de la P_{CO_2} .

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_{sv} [HCO_3^-] = 1 + K_{sv} \frac{2.6 \times 10^{-8} P_{CO_2}}{[H_3O^+]} \quad (34)$$

Finalmente, introduciendo en la ecuación (33) los valores de las constantes de equilibrio correspondientes, despejando la $[H_3O^+]$ y sustituyendo en (34) resulta la siguiente ecuación de ajuste (35):

$$I_0/I = \tau_0/\tau = 1 + K_{sv} \left\{ \frac{(1.0 \times 10^{-11} X - 1.35 \times 10^{-15} X^2)}{[-5.1 \times 10^{-11} X + (2.6 \times 10^{-21} X^2 + 3.1 \times 10^{-19} X)^{1/2}]} \right\}$$

donde X representa la P_{CO_2} .

Para comprobar la validez del modelo propuesto, se han comparado los valores experimentales correspondientes al calibrado realizado con medidas de tiempos de vida (Figura 25), con los valores proporcionados por la ecuación teórica (35), obteniéndose los resultados representados en la Figura 28, que se ajustan a la siguiente ecuación $(\tau_0/\tau)_{calc.} = (1.02 \pm 0.04) (\tau_0/\tau)_{exp} + (0.01 \pm 0.08)$; $r = 0.998$. Estos

resultados ponen de manifiesto la práctica coincidencia de los calibrados teórico y experimental, lo cual demuestra la validez del modelo propuesto para describir el comportamiento del optodo de CO_2 .

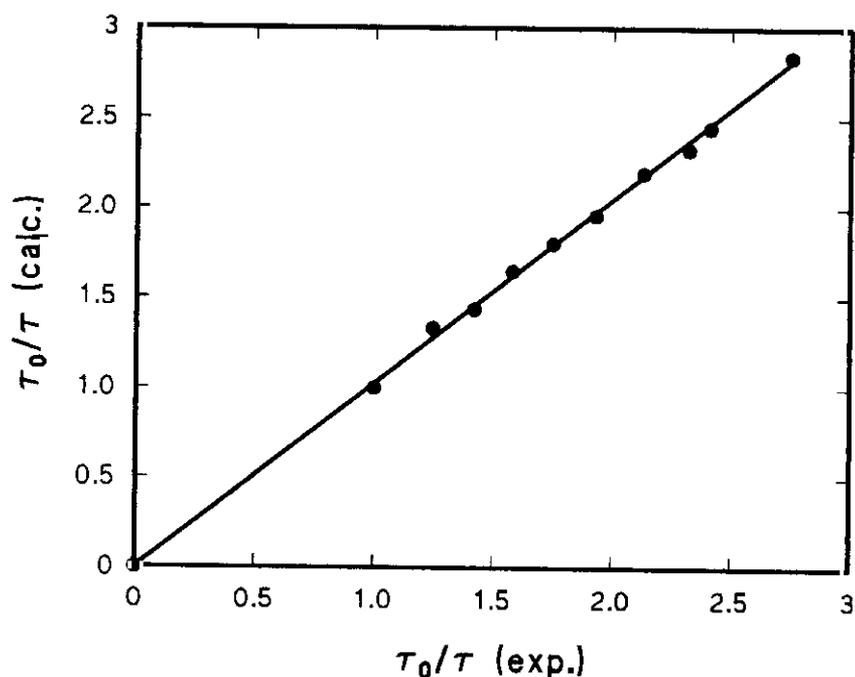


FIGURA 29. Comparación de los valores teóricos (obtenidos según ecuación 35) y de los valores experimentales (Figura 25) correspondientes a los calibrados basados en medidas del tiempo de vida de emisión.

3.1.4. DETERMINACIÓN DE CO_2 MEDIANTE UN SENSOR BASADO EN MEDIDAS DE INTENSIDAD DE LUMINISCENCIA.

3.1.4.1. Preparación de la fase sensora.

a) Inmovilización del indicador

Una vez concluido el estudio en disolución, se procedió a inmovilizar el indicador en un soporte sólido adecuado para la construcción del sensor de fibra óptica. De lo expuesto en el apartado 3.1.3, resultaba evidente la necesidad de incluir en el terminal sensible, el indicador disuelto en la disolución amortiguadora $\text{HFT}^-/\text{Ft}^{2-}$, necesaria para el funcionamiento del $\text{Ru}(\text{pzt})_3^{2+}$ como indicador de CO_2 . Se ensayaron distintos procedimientos de inmovilización: a) preparación de una *emulsión* del indicador, disuelto en tampón, en *silicona*; b) preparación de un *sol-gel*

con el indicador “atrapado”; c) inmovilización *electrostática* del indicador en una resina de intercambio iónico.

De todos ellos, el tercero fue el que proporcionó mejores resultados y mayor sensibilidad (en el caso del sol-gel no se obtuvo respuesta al CO₂).

El complejo se inmovilizó por ello, electrostáticamente según se indicó en el apartado 2.3.1. Concretamente, se han probado dos intercambiadores catiónicos tipo Sephadex, polímero que se suele emplear como relleno (fase estacionaria) en las columnas cromatográficas para la purificación de compuestos, el carboximetil-Sephadex[®] C-25 y el sulfopropil-Sephadex[®] C-25, cuya diferencia reside fundamentalmente en la naturaleza del grupo enlazado a la matriz de poli-(carboximetil)-dextrano. Estas resinas son estables a pH > 2 y al hincharse en agua se produce un aumento de 30 veces su volumen, permitiendo que moléculas de elevado peso molecular (> 200000) tengan acceso a los grupos funcionales internos (*Slama-Schwok et al., 1981*).

La inmovilización del Ru(pzth)₃²⁺ en sulfopropil-Sephadex no dio buenos resultados, ya que se produjo una desorción del complejo al poner la resina en contacto con la disolución reguladora HFt⁻/Ft²⁻ 0.1 M a pH 7.25 utilizada para la construcción del terminal sensible. Sin embargo, cuando se empleó carboximetil-Sephadex, no se observó este fenómeno y la absorción del complejo a partir de la disolución acuosa de partida, según el procedimiento indicado en el apartado 2.3.1, resultó ser cuantitativa, por lo que se eligió este soporte polimérico para la inmovilización del complejo.

b) Elección de la membrana permeable al CO₂.

La mayoría de los sensores para gases incorporan en su diseño una membrana semipermeable que separa la fase reactiva de la corriente gaseosa (*Wolfbeis, 1991*). Esta membrana tiene como misión, en primer lugar prevenir el arrastre de la fase indicadora por efecto de la corriente gaseosa y, en segundo lugar, aumentar la selectividad del sensor. En el caso de los sensores de CO₂, la membrana actúa como una barrera impidiendo el paso de los protones y de cualquier ion interferente presente en la disolución. A la hora de seleccionar el material polimérico adecuado

han de tenerse en cuenta factores tales como la *solubilidad y permeabilidad* de los gases en el polímero.

Tradicionalmente, la *silicona* ha sido el material polimérico más ampliamente utilizado como membrana semipermeable en los sensores de CO₂. Ello se debe a la elevada permeabilidad y solubilidad que presenta este polímero hacia los gases en general y, en particular, hacia el O₂ y el CO₂. En nuestro caso, según se indica en el apartado 2.4.1.1, el gel con el Ru(pzth)₃²⁺ adsorbido se deposita sobre un pocillo de metacrilato, el cual se cubre con una membrana de silicona para aumentar la estabilidad mecánica y la selectividad del dispositivo. Hemos ensayado membranas de silicona comerciales de distinta procedencia (véase TABLA IX) con objeto de evaluar cuál es la que proporciona un mejor funcionamiento del optodo particularmente, en lo que se refiere a los tiempos de respuesta ya que este parámetro está gobernado por el coeficiente de difusión del CO₂ en el material polimérico en cuestión.

Los valores representados en la TABLA IX corresponden a los tiempos requeridos para alcanzar un 90% (t₉₀) de la respuesta total del optodo frente una mezcla gaseosa que contiene un 20 % de CO₂, cuando la concentración de este gas varía entre 0 - 20%, t₉₀ (directo), y cuando pasamos de 20 - 0%, t₉₀ (inverso). Los resultados indican una clara dependencia del tiempo de respuesta del sensor con el tipo de membrana utilizada.

Aunque en los tres casos se trata del mismo material, silicona, las membranas no tienen el mismo espesor ni exactamente la misma composición (esta última se desconoce ya que se trata de marcas registradas). Es un hecho conocido que el grado de entrecruzamiento de un polímero, así como, la presencia de distintos aditivos o plastificantes en su composición, pueden modificar considerablemente el coeficiente de permeabilidad del mismo (Yasuda et al., 1981).

En nuestro caso, no habiéndose observado diferencias significativas en cuanto a la respuesta del sensor en función del tipo de membrana utilizada, seleccionamos para experimentos posteriores la membrana Sylastic® Sheeting (Ciba Corning), membrana utilizada, por otra parte, en electrodos comerciales de CO₂, por ser ésta la que proporcionaba los menores tiempos de respuesta, tanto para la reacción directa (0-20% CO₂) como para la reacción inversa (20 - 0% CO₂).

TABLA IX. EFECTO DE LA MEMBRANA UTILIZADA EN COMBINACIÓN CON EL OPTODO, SOBRE LOS TIEMPOS DE RESPUESTA (DIRECTO E INVERSO) DEL SENSOR A UNA MEZCLA GASEOSA QUE CONTIENE UN 20% DE CO₂.

| Membrana | t_{90} (directo), min | t_{90} (inverso), min |
|---|----------------------------|----------------------------|
| Ciba-Corning Sylastic® Sheeting. (Ciba Corning) | 2.5 | 3.0 |
| Sylastic® Sheeting, Medical Grade (Dow Corning). | 3.0 | 6.0 |
| Silicona (General Electric Co.) | 5.0 | 7.0 |

c) Características espectrales del reactivo inmovilizado.

En la Figura 29 se han representado los espectros de excitación y emisión obtenidos con el optodo de CO₂ tras disponer el complejo Ru(pzth)₃²⁺ inmovilizado en carboximetil-Sephadex en la célula de flujo, según se indica en el apartado 2.4.1.1, en presencia de aire y a temperatura ambiente. Los espectros de luminiscencia se encuentran sin corregir en ambos casos.

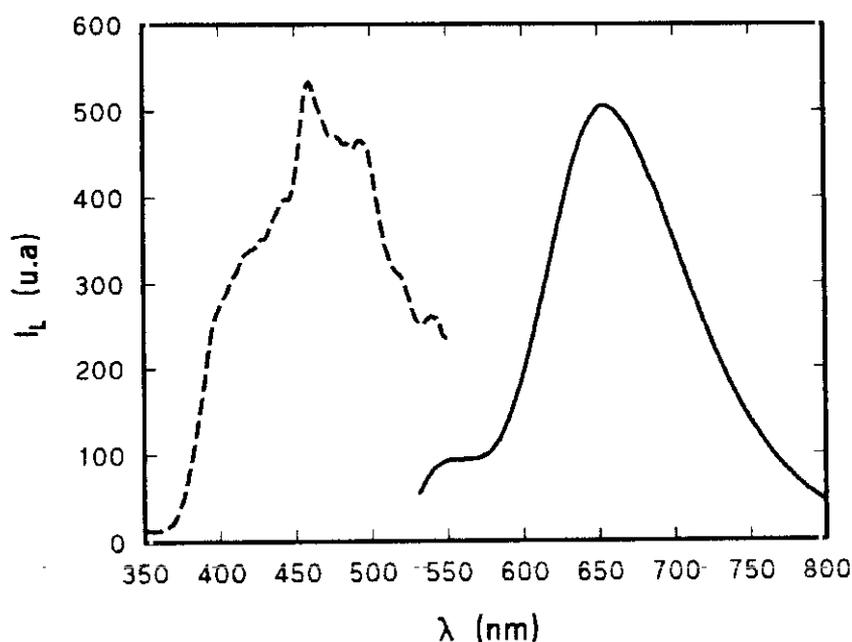


FIGURA 29. Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 653$, rendijas 10/10) y de emisión ($\lambda_{exc} = 463$ nm, rendijas 10/10, filtro en emisión a 530 nm) del Ru(pzth)₃²⁺ disuelto en tampón HFT⁻/Ft²⁻ 0.1 M, pH 7.25, inmovilizado en CM-Sephadex, equilibrado al aire y a temperatura ambiente. Espectros sin corregir.

Observando estos espectros y comparándolos con los obtenidos en disolución acuosa (Figura 19) se deduce que la posición de los máximos de excitación (463 nm) y emisión (653 nm) del complejo no se modifica por el hecho de encontrarse éste inmovilizado sobre un soporte sólido, lo cual se debe sin duda a la naturaleza de las fuerzas electrostáticas por las cuales el complejo se encuentra retenido en el soporte. Hay que precisar que, en el caso del complejo inmovilizado, se ha observado una cierta emisión por debajo de 550 nm, originada por la placa de poli(metilmacrilato) sobre la que se deposita el gel con el fin de realizar las medidas.

Por otra parte, en las Figuras 30 y 31 se muestran las curvas de extinción de la luminiscencia correspondientes a una disolución 10^{-5} M de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en tampón $\text{HFT}^-/\text{Ft}^{2-}$ 0.1 M y pH 7.25, y del complejo inmovilizado en Sephadex, respectivamente, equilibrados con Ar en ambos casos. Conviene destacar que los tiempos de vida de emisión obtenidos en ambos casos (438 y 293 ns, respectivamente a 20 °C) son muy distintos, siendo el del complejo inmovilizado inferior al obtenido en disolución.

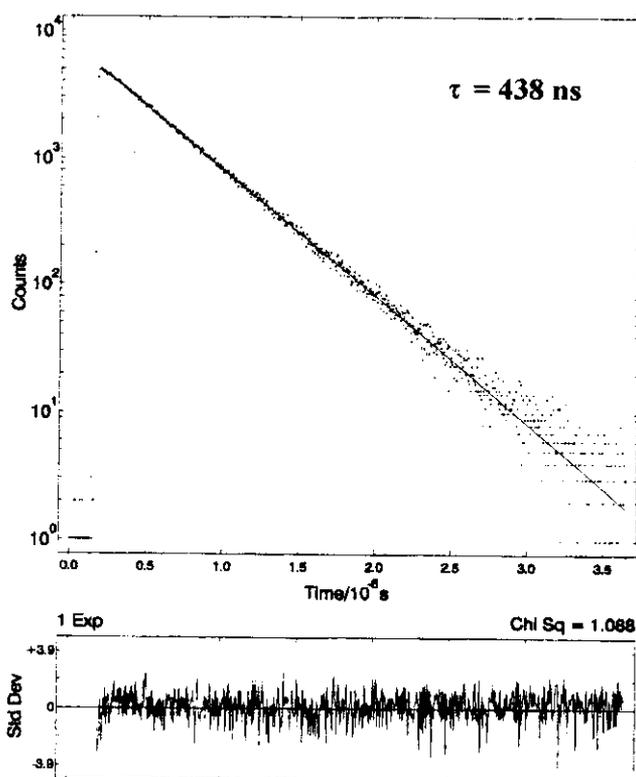


FIGURA 30. Curva de extinción de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ 10^{-5} M en disolución acuosa de tampón hidrógenoftalato 0.1 M, pH 7.25, equilibrada con Ar ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 652 \text{ nm}$).

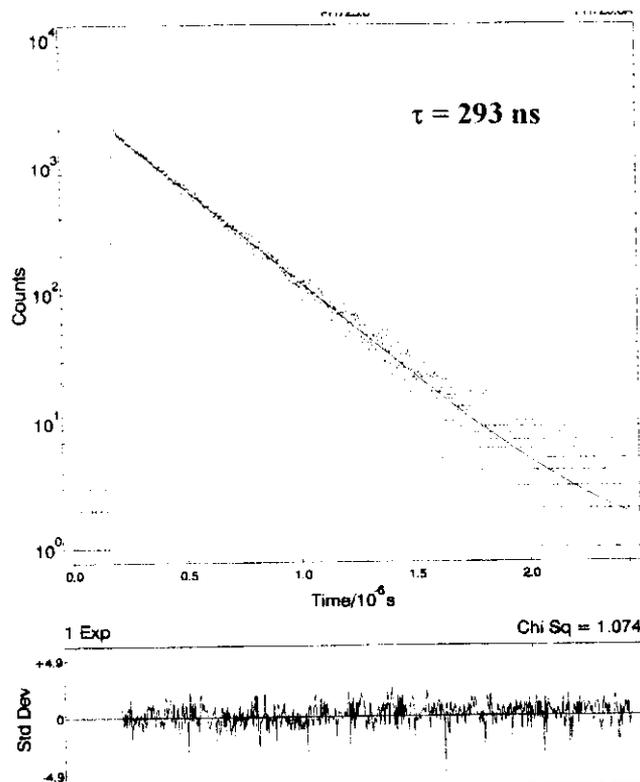


FIGURA 31. Curva de extinción de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ inmovilizado en CM-Sephadex, equilibrado con Ar ($\lambda_{\text{exc}} = 337 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 653 \text{ nm}$).

Como sugieren Masschelein y col. (Masschelein et al., 1991) esta desactivación de la luminiscencia producida aparentemente por la resina, se debe probablemente a un efecto sinérgico originado por la combinación de *interacciones electrostáticas* en el sitio de *intercambio*, así como *interacciones con* la propia *matriz* del Sephadex, presumiblemente a través de los átomos de nitrógeno libres del ligando. Estas últimas pueden ser de dos tipos: a través de un *equilibrio ácido-base* y/o a través de *enlaces de hidrógeno*. La resina puede inducir cambios locales del pH alrededor de la zona de intercambio, dando lugar a una disminución del mismo.

Este efecto de “*acidez local*” ha sido observado en el caso de aminas incorporadas en Nafión (Szentirmay et al., 1985). La segunda posibilidad es que la desactivación provocada por el Sephadex, tenga su origen en la formación de enlaces de hidrógeno favorecida por ciertas conformaciones de las cavidades.

Una combinación de estos factores podría explicar el menor tiempo de vida (293 ns) que presenta el $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ cuando se encuentra inmovilizado, con respecto

Una combinación de estos factores podría explicar el menor tiempo de vida (293 ns) que presenta el $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ cuando se encuentra inmovilizado, con respecto al obtenido en disolución (438 ns). Asimismo, estos resultados experimentales ponen de manifiesto la gran aplicabilidad para la construcción de optodos de las técnicas basadas en la medida de tiempos de vida de emisión, que son capaces de revelar información adicional que no puede ser obtenida con medidas de intensidad de emisión.

Por otra parte, se comprueba que se obtiene un decaimiento estrictamente *monoexponencial* de la emisión tanto si el complejo se encuentra en disolución como si se halla inmovilizado en el Sephadex. Este comportamiento se ha observado para otro tipo de complejos de Ru(II) (e.g. $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$, donde bpy: bipyridina) en soportes análogos (Ireland et al., 1976). La obtención de decaimientos monoexponenciales es indicativo de la presencia de una única especie luminiscente en ambos medios y, en el caso del indicador inmovilizado hace referencia a la homogeneidad del microentorno local que encuentran las distintas moléculas de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ adsorbidas sobre el soporte.

La aparición de un decaimiento monoexponencial de la emisión, facilita notablemente la construcción de un sensor de fibra óptica basado en la variación del tiempo de vida de emisión del estado excitado del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en presencia de CO_2 . Estos sensores presentan, entre otras, la ventaja de la independencia del tiempo de vida de emisión con la cantidad de luminóforo inmovilizado, de manera que cualquier posible fotodescomposición o pérdida del mismo no afecta a la respuesta del optodo, aumentando el tiempo de vida útil del sensor y su utilidad para la construcción de optodos dedicados a la monitorización medioambiental.

3.1.4.2. Características analíticas del sensor.

a) Calibrado.

El calibrado del sensor de CO_2 se realizó de acuerdo al procedimiento indicado en el apartado 2.4.1.1. En la Figura 32 se muestran los perfiles de respuesta del sensor a distintas mezclas Ar- CO_2 saturadas de vapor de agua (gases húmedos) y con un contenido en este último gas que varía entre el 0 - 100%. Como se observa en dicha Figura, aproximadamente el 75% de la respuesta total del sensor se alcanza para

aquellas mezclas con un contenido en CO_2 menor del 25%. El sensor de fibra óptica basado en el empleo de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ presenta un intervalo de respuesta mayor que otros fluorosensores para CO_2 , en los que la señal alcanza el 75% de su valor máximo con tan sólo un 10% de CO_2 (Wolfbeis et al., 1988; Kawabata et al., 1989) o un 4.5% de CO_2 (Opitz et al., 1984).

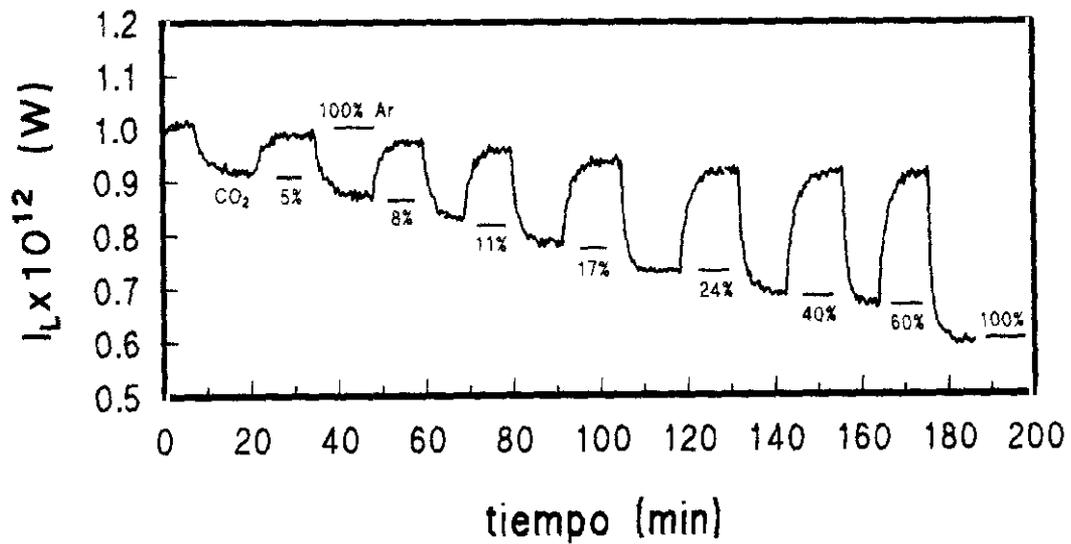


FIGURA 32. Respuesta del sensor a distintas mezclas Ar- CO_2 . ($P_T = 711 \text{ Torr}$, 20°C).

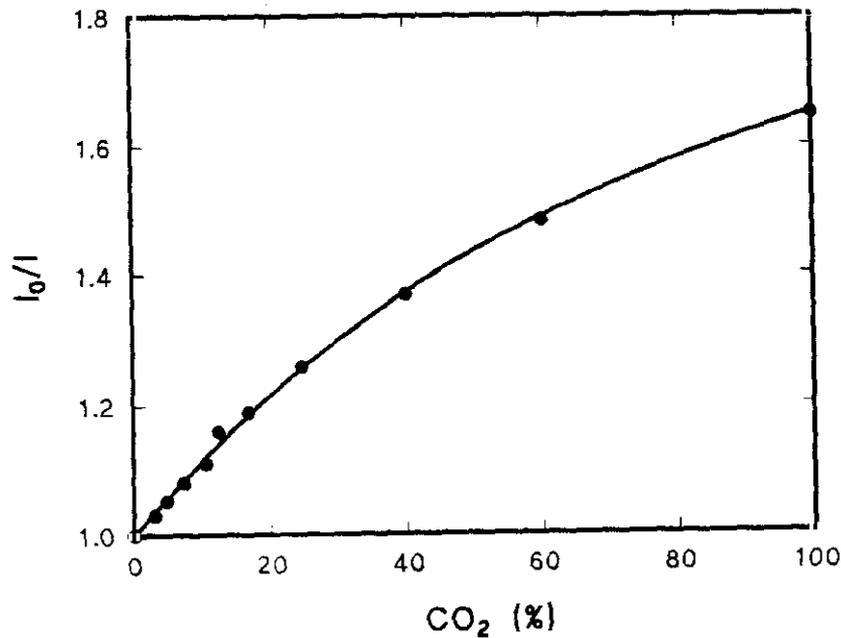


FIGURA 33. Calibrado realizado con el sensor de fibra óptica empleando una mezcla de gases Ar/ CO_2 saturadas con agua en función del % CO_2 presente en la misma. ($P_T = 712 \text{ Torr}$, 20°C).

En la Figura 33 se muestra el calibrado, basado en medidas de intensidad de luminiscencia, obtenido con el sensor en todo el intervalo de concentraciones de CO₂. Para ello, se ha representado el cociente I_0/I (donde I_0 es la intensidad de emisión en presencia de Ar e I representa la intensidad de emisión en presencia de distintas mezclas Ar/CO₂) en función del porcentaje de CO₂ presente en la mezcla.

b) Precisión y límite de detección.

La *precisión* del sistema, basado en medidas de intensidad de luminiscencia se evaluó en términos de la desviación estándar relativa de la señal de emisión normalizada, para ocho determinaciones análogas de muestras con un 6, 25 y 100% de CO₂ empleadas en el calibrado con gases húmedos. Los resultados obtenidos se recogen en la TABLA X.

TABLA X. ESTUDIO DE LA PRECISIÓN DEL SENSOR CALCULADA PARA MEZCLAS GASEOSAS CO₂/Ar SATURADAS CON H₂O CON UN 6, 25 Y 100% DE CO₂, RESPECTIVAMENTE.

| [CO ₂], % | I_0/I (n = 8) | RSD, % |
|-----------------------|--------------------|--------|
| 6 | 1.08 | 3.0 |
| 25 | 1.28 | 1.7 |
| 100 | 1.60 | 2.7 |

El *límite de detección* se calculó a partir de diez determinaciones del cociente I_0/I correspondiente al blanco, en este caso Ar puro y aplicando el criterio recomendado por la IUPAC (Winefordner, 1983). Como I_0 se tomó la media de diez valores del blanco y como I diez lecturas diferentes del mismo. La desviación estándar de dichos cocientes (S_b) resultó ser de 5.0×10^{-3} . Multiplicando por 3 este valor y llevándolo a nuestra ecuación de calibrado, se ha obtenido un valor para el límite de detección que corresponde a un 0.4% de CO₂.

c) Estudio de interferencias.

Es bien conocido que, en general, el O₂ desactiva muy eficazmente el estado excitado de los complejos polipiridílicos de Ru(II) (Demas et al., 1991; Juris et al., 1988). En el caso del Ru(pzth)₃²⁺, se ha podido comprobar en una serie de estudios

previos en disolución (apartado 3.1.3.4) que, tanto la intensidad de emisión, como el tiempo de vida del estado excitado del complejo se ven afectados por la presencia de O_2 . Así, los valores de estos parámetros obtenidos a partir de disoluciones acuosas del complejo equilibradas en aire (21% O_2) son el 83% de los obtenidos en el caso de que las disoluciones estén equilibradas con Ar (0% O_2). Puesto que el O_2 es un gas muy común, que se encuentra presente tanto en la atmósfera como disuelto en agua, se procedió a comprobar si el efecto interferente observado en disolución se mantenía una vez que el indicador se encuentra inmovilizado en Sephadex y separado del medio externo a través de la membrana de silicona.

Para el estudio de interferencias, se emplearon mezclas de gases (Ar- CO_2 - O_2) con un porcentaje constante CO_2 y porcentajes variables de O_2 , midiéndose el efecto del mismo sobre la relación I_0/I , donde I_0 representa la intensidad de emisión en presencia de un 100% de Ar e I es la intensidad de emisión en presencia de las distintas mezclas (Ar- CO_2 - O_2). El criterio para considerar interferencia se fijó en 2s siendo s la desviación estándar de las señales obtenidas en ausencia del elemento interferente. Los resultados obtenidos se muestran en la TABLA XI.

TABLA XI. SENSIBILIDAD RELATIVA DEL OPTODO DE CO_2 .

| $[CO_2]$, % | CO_2/O_2 | Sensibilidad relativa, % |
|--------------|------------|-----------------------------|
| 4 | 1:3 | 98.1 |
| | 1:4 | 100 |
| | 1:5 | 110 |
| 7.5 | 1:3 | 98.5 |
| | 1:4 | 100 |
| | 1:5 | 111 |
| 15 | 1:3 | 94.5 |
| | 1:4 | 98.2 |
| | 1:5 | 112 |

Según se deduce de los datos experimentales, a partir de relaciones CO_2/O_2 de 1:5, el O_2 interfiere en la determinación de CO_2 con el sensor óptico descrito a todas las concentraciones de CO_2 ensayadas. La membrana de silicona no constituye ningún obstáculo para que el O_2 difunda a través de ella, desactivando la luminiscencia del indicador inmovilizado, ya que este material es permeable no sólo al CO_2 , sino también al O_2 , con coeficientes de permeabilidad para ambos gases de 1090 y $203 \text{ mol m s}^{-1} \text{ N}^{-1}$ (a 25°C), respectivamente.

Para aumentar la selectividad del optodo, eliminando o minimizando la interferencia debida al oxígeno se pensó en sustituir la membrana de silicona por otro material alternativo que fuera menos permeable al O_2 , como es el caso del politetrafluoroetileno (PTFE); sin embargo la pequeña respuesta obtenida frente al CO_2 , así como los elevados tiempos de respuesta, debidos fundamentalmente a la menor permeabilidad de este material al CO_2 , nos llevaron a desechar esta idea.

La presencia de otros gases existentes en muestras de interés médico o fisiológico tales como el óxido nitroso y/o halotano, han demostrado no modificar la señal obtenida con este tipo de complejos a niveles muy superiores a los encontrados normalmente en dichas muestras (*Wolfbeis, 1986*). Por ello, y debido a la complejidad experimental que implica este tipo de interferentes no se ensayó su efecto sobre el optodo.

Con respecto a otros gases susceptibles de desactivar oxidativamente el estado excitado del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$, tales como el Cl_2 y el SO_2 , su presencia podría interferir en las determinaciones de CO_2 . Sin embargo, al igual que en el caso anterior, las dificultades experimentales y la escasa probabilidad de encontrarlos en el medio a analizar han desaconsejado su análisis.

Finalmente, se ha estudiado la posible interferencia en disolución de otros ácidos volátiles como el HAc, encontrándose que su presencia (incluso en relaciones tan elevadas como 1:100) no afecta a la sensibilidad del sistema. Ello se debe, con toda seguridad, a la permeabilidad selectiva hacia el CO_2 que presenta la membrana de silicona. Por otra parte, debido a la total impermeabilidad de la membrana a las disoluciones acuosas, todos aquellos iones, desactivadores, o especies neutras disueltos en ellas que no puedan penetrar en el polímero no afectan a la respuesta del sensor.

d) Tiempo de respuesta.

En la Figura 34 se representa la señal de emisión obtenida con el sensor de CO₂ en función del tiempo, cuando la concentración de CO₂ en el gas de medida varía entre 0-100% y viceversa. El tiempo requerido para alcanzar el 90% de la señal total (t_{90}) resultó ser de 2 minutos para la reacción *directa* (0 - 100% CO₂) y de 3 minutos para la reacción *inversa* (100 - 0% CO₂).

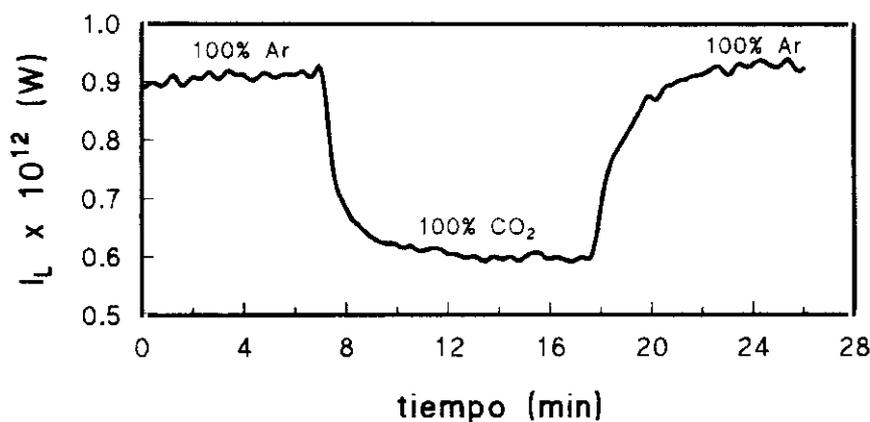


FIGURA 34. Respuesta del optodo a un ciclo 0 - 100% CO₂ y viceversa ($P_T = 715$ Torr, 20 °C).

Aunque en principio pueda parecer que el tiempo de respuesta del sensor es elevado, estos valores son comparables e incluso menores que los obtenidos con la mayoría de los sensores de fibra óptica para CO₂ descritos hasta la fecha (~ 1-20 minutos dependiendo del volumen de la fase reactiva)¹; así como los observados en el caso de los electrodos de CO₂ que no difieren significativamente de estos últimos (Jensen et al., 1972; Carbon Dioxide Electrode Model 95-02, 1986).

Estos valores son una consecuencia de los factores que afectan principalmente al tiempo de respuesta de un sensor de CO₂: la *difusión* del gas a través de la membrana semipermeable y, posteriormente, a través de la capa sensible, así como la *lenta cinética* de la reacción de hidratación del CO₂ (Kern, 1960).

La membrana polimérica juega un papel fundamental en el funcionamiento del sensor, permitiendo únicamente la difusión de los gases a su través y aumentando por tanto la selectividad del mismo. Ahora bien, precisamente esta etapa es uno de los factores que más influyen sobre el tiempo de respuesta del sensor ya que, si se

¹ Sin embargo, Mills y col. (Mills et al., 1992) han descrito membranas sensibles al CO₂ con $t_{90}=3-7$ s.

burbujean los gases directamente sobre una disolución acuosa del complejo, los cambios en la señal se producen con mayor rapidez. Por ello, en la práctica (como ya se mencionó en el apartado 3.1.4.1.c) se debe seleccionar una membrana que permita una gran permeabilidad al analito y que presente el mínimo espesor posible. Se ha comprobado además que, tanto la respuesta del sensor óptico, como el tiempo requerido para producirse ésta son independientes del caudal de gas empleado.

Otro factor determinante del tiempo de respuesta es el *espesor o volumen de la fase sensible*, de forma que cuanto mayor sea éste, mayor será el tiempo de respuesta del sensor, ya que será necesario equilibrar un volumen mayor antes de alcanzar el equilibrio. En nuestro caso utilizamos un volumen de fase reactiva de 60 μL ya que, aunque se probaron volúmenes menores, éstos dieron peores resultados en cuanto a nivel de señal, reproducibilidad y facilidad de construcción del terminal sensible.

Aunque los factores mencionados anteriormente influyen sobre la velocidad de respuesta de los optodos de CO_2 , quizá el auténtico factor limitante sea la lenta cinética de la siguiente reacción:



donde las constantes de velocidad para las reacciones directa e inversa, a 25 °C, y asumiendo una cinética de pseudo-1^{er} orden, tienen valores de 0.040 s^{-1} y 30 s^{-1} , respectivamente (Gutfreund, 1967; Bauer et al., 1980). Además, Peng y col. (Peng et al., 1992) han demostrado, mediante una serie de experimentos cinéticos, que la reacción de hidratación del CO_2 en medio alcalino, $\text{CO}_2(\text{ac}) + \text{OH}^-(\text{ac}) \rightarrow \text{HCO}_3^-(\text{ac})$ encuentra una barrera de activación adicional de 55.4 KJ mol^{-1} que no existe cuando la misma reacción tiene lugar en fase gaseosa, por lo que se supone inducida probablemente por efectos de solvatación.

Por otra parte, la notable diferencia observada en los tiempos de respuesta del senos en sentido directo e inverso (30 s y 3 min, respectivamente) pueden atribuirse, al igual que ocurre en el caso de otros sensores ópticos para la determinación de CO_2 (Lübbbers et al., 1983; Opitz et al., 1984; Zhujun et al., 1984; Wolfbeis et al., 1988; Munkholm et al., 1988; Kawabata et al., 1989) a las diferentes constantes de velocidad de ambos procesos, indicadas anteriormente.

Así pues, mientras que los procesos de difusión del analito pueden acelerarse empleando membranas más permeables y fases reactivas de menor espesor, la lenta reacción de hidratación del CO₂, es un problema que aún no ha sido abordado de forma eficaz en la construcción de optodos para la cuantificación de este analito.

3.1.4.3. Reducción del tiempo de respuesta del sensor. Empleo de la enzima anhidrasa carbónica.

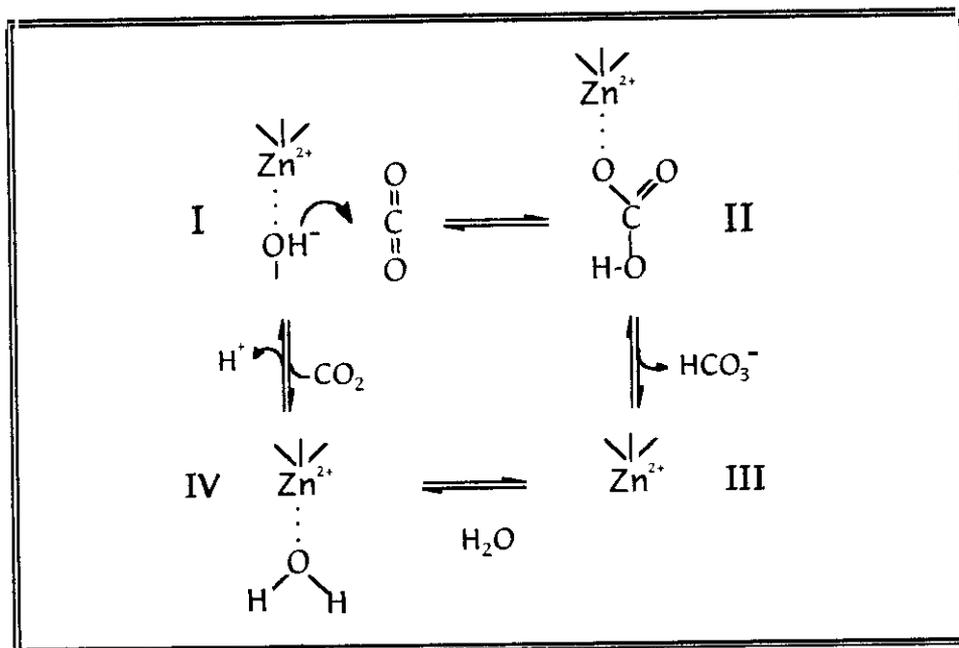
Posiblemente, una de las mayores limitaciones que presentan los sensores de CO₂ de cara a su aplicación para la monitorización en continuo, son los elevados tiempos de respuesta que presentan con relación a los obtenidos para otros sensores de gases, por ejemplo los optodos de O₂ (Gehrich et al., 1986; Opitz et al., 1987; Lübbers, 1992).

En un intento por mejorar las características de nuestro sensor, se estudió la utilización de la enzima *anhidrasa carbónica* en combinación con el sensor óptico, como ya habían sugerido, por su parte, algunos autores, (Opitz et al., 1976; Heitzmann, 1985; Lübbers, 1992) para disminuir el tiempo de respuesta del optodo.

La anhidrasa carbónica juega un papel fisiológico fundamental, ya que cataliza la hidratación del CO₂ *in vivo*, permitiendo un rápido intercambio de este gas en los eritrocitos y alvéolos pulmonares (Lindskog et al., 1971; Bauer et al., 1980; Dogson et al., 1991). Se trata de una *metaloenzima* extremadamente activa, que es capaz de catalizar la interconversión de CO₂ y HCO₃⁻ con constantes de velocidad para las reacciones respectivas de 10⁻⁶ y 6x10⁻⁵ s⁻¹, a 25 °C (Bauer et al., 1980; Zheng et al., 1992). La clave de la excelente actividad catalítica mostrada por la enzima se debe a la presencia en su estructura de un ion Zn²⁺ coordinado a tres histidinas y a un grupo hidroxilo a pH básico; mientras que a valores bajos de pH el 4º ligando es una molécula de H₂O. El esquema 5 muestra, de forma simplificada, el mecanismo catalítico.

La teoría más aceptada respecto al comportamiento enzimático señala que la anhidrasa carbónica rebaja la energía de activación necesaria para la hidratación del CO₂ en disolución acuosa, proporcionando un ambiente relativamente anhidro, ya que el centro activo de la enzima está situado en una región hidrofóbica (Dewar et al.,

1985; Bohr, 1988). El CO_2 se almacena en la cavidad hidrófoba de la proteína de forma que el ataque nucleófilo por parte del OH^- unido al Zn se ve enormemente favorecido.



ESQUEMA 5

Dadas las excelentes propiedades catalíticas de la anhidrasa carbónica y, por tanto, la posibilidad de actuar sobre uno de los factores limitantes del tiempo de respuesta del optodo para CO_2 , se procedió a la preparación de fases sensibles al CO_2 , en ausencia y en presencia de la enzima disuelta en la fase reactiva, comparándose los resultados obtenidos en cada caso. A continuación, pasaremos a describir con más detalle los aspectos más relevantes de este estudio.

a) Optimización de los factores que afectan a la respuesta enzimática.

La preparación de las fases sensibles al CO_2 , se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.1, adicionando las unidades necesarias de la enzima anhidrasa carbónica disuelta en tampón fosfato del pH adecuado. La fase reactiva se sitúa en el extremo de la fibra óptica siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.4.1.1. Se estudió, en primer lugar, la influencia de algunas variables que pueden afectar a la respuesta enzimática: *pH*, *actividad enzimática* y *temperatura*.

Con el fin de determinar el *pH óptimo* para la realización de las medidas, se llevó a cabo un estudio de la respuesta del sensor en función del pH de la disolución reguladora incluida en la fase reactiva que contiene la enzima. Hay que mencionar que, para las medidas en presencia de la anhidrasa carbónica, fue necesario sustituir el tampón hidrógenoftalato empleado hasta el momento (por ser el que proporcionaba una mayor sensibilidad en la respuesta), por tampón fosfato, ya que, según la bibliografía el primero ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad de la enzima (Tauber, 1949).

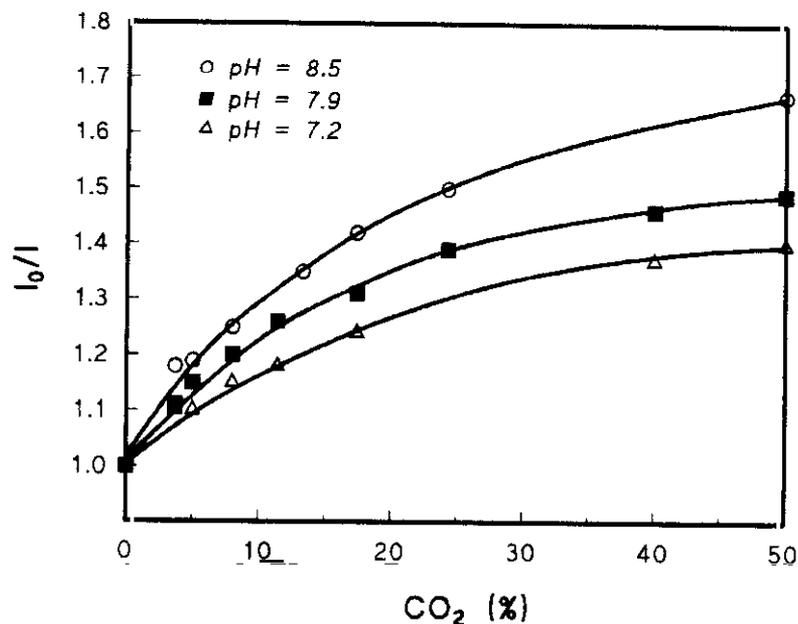


FIGURA 35. Calibrados realizados con el sensor de fibra óptica en presencia de anhidrasa carbónica (1 mg mL^{-1}) a pH 7.2, 7.9 y 8.5 (Fosfato, 0.1 M).

La Figura 35 muestra los calibrados obtenidos con el sensor de fibra óptica que incorpora la enzima anhidrasa carbónica, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 5 - 50% de CO₂ para tres valores diferentes de pH (7.2, 7.9 y 8.5). Como se puede observar, la máxima respuesta se consigue cuando el pH del tampón corresponde a un valor de 8.5. Este mismo resultado se reproduce exactamente en ausencia de la enzima, lo cual está de acuerdo con el mecanismo de funcionamiento del sensor. Al aumentar el pH aumenta la cantidad de ion dihidrógeno fosfato, presente en el medio desactivándose más eficazmente el estado excitado del complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ que en presencia del anión monohidrógeno fosfato que es la especie mayoritaria el pH inicial.

En lo que respecta al tiempo de respuesta, la dependencia de la actividad de la enzima anhidrasa carbónica con el pH es bien conocida (Bauer et al., 1980). La velocidad de la reacción de hidratación del CO_2 , catalizada por la enzima, muestra un perfil sigmoïdal a valores altos de pH; mientras que para la reacción inversa, se observa este mismo comportamiento a valores bajos de pH, estando situado el punto de inflexión en torno a 7 en ambos casos. De los tres valores de pH ensayados (7.2, 7.9 y 8.5), seleccionamos el de 8.5 por ser el que proporcionó los menores tiempos de respuesta (40 s) y de recuperación (~ 2 min) frente a sucesivos ciclos 0-100% CO_2 . Estos tiempos son muy inferiores a los obtenidos (2.5 y 6 min, respectivamente) bajo las mismas condiciones experimentales, pero en ausencia de enzima.

En segundo lugar, se procedió a estudiar el efecto de la *actividad enzimática* sobre el tiempo de respuesta del sensor para lo cual, se mantuvo constante el pH de la fase reactiva a un valor de 8.5. Se varió la concentración de enzima presente en la capa sensible en el intervalo comprendido entre 0 - 1.0 mg mL^{-1} midiéndose, a continuación, la respuesta de los correspondientes sensores a sucesivos ciclos 0 - 100% CO_2 .

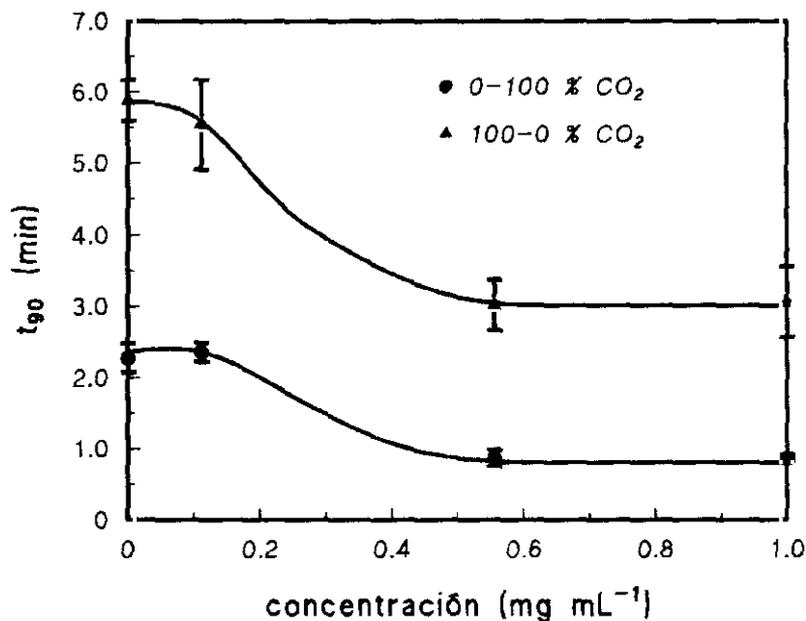


FIGURA 36. Tiempos de respuesta y de recuperación del optodo de CO_2 en función de la concentración de enzima presente en la fase sensible ($n = 5$).

Los resultados obtenidos, representados en la Figura 36, indican que, tanto el tiempo de respuesta directo como inverso del sensor, disminuyen a medida que se incrementa la actividad enzimática en la fase indicadora, hasta alcanzar un valor

constante correspondiente a una concentración de anhidrasa carbónica de 0.5 mg mL^{-1} . Valores superiores no conducen a una reducción de los tiempos de respuesta del sensor, probablemente por estar trabajando en exceso de actividad enzimática, por lo que, como situación de compromiso entre tiempo de respuesta y cantidad de enzima requerida, se seleccionó el valor mencionado anteriormente de 0.5 mg mL^{-1} para posteriores experimentos. En estas condiciones se consiguió reducir los tiempos de respuesta del sensor aproximadamente en un 50% con respecto a los obtenidos en ausencia de la enzima.

Finalmente, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la respuesta del sensor enzimático. La Figura 37 muestra la respuesta del biosensor a una mezcla gaseosa que contiene un 5% de CO_2 , en el intervalo de temperaturas comprendido entre $15 - 40 \text{ }^\circ\text{C}$. A efectos de comparación, todas las curvas han sido desplazadas hasta un origen común, aplicando el factor de conversión adecuado.

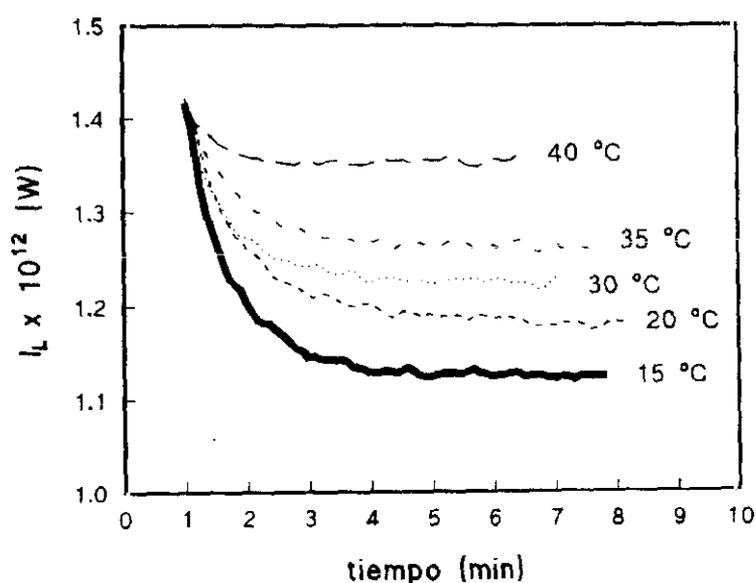


FIGURA 37. Respuesta del sensor en presencia de 0.5 mg mL^{-1} de anhidrasa carbónica frente a una mezcla gaseosa con un 5% de CO_2 , en función de la temperatura.

Es evidente que la mayor rapidez ($t_{90} = 50 \text{ s}$) en la respuesta del sensor se obtiene a la máxima temperatura ensayada, lo cual indica una mayor actividad enzimática. Sin embargo, la dependencia inversa de la solubilidad del CO_2 en la fase reactiva con la temperatura (Bauer et al., 1980) da lugar a una notable disminución de la sensibilidad del biosensor a medida que ésta aumenta. Por ello, se seleccionó un

valor de temperatura de 20 °C para la realización de las medidas, ya que es la que proporciona la mejor combinación de sensibilidad y tiempo de respuesta del optodo.

b) Estudio del tiempo de respuesta del sensor.

Una vez optimizados los parámetros fundamentales que influyen sobre la respuesta de la enzima anhidrasa carbónica, se procedió a comparar los tiempos de respuesta obtenidos, en todo el intervalo de concentraciones del analito, con sensores de CO₂, en ausencia y en presencia de la enzima. Los resultados se muestran en la Figura 38.

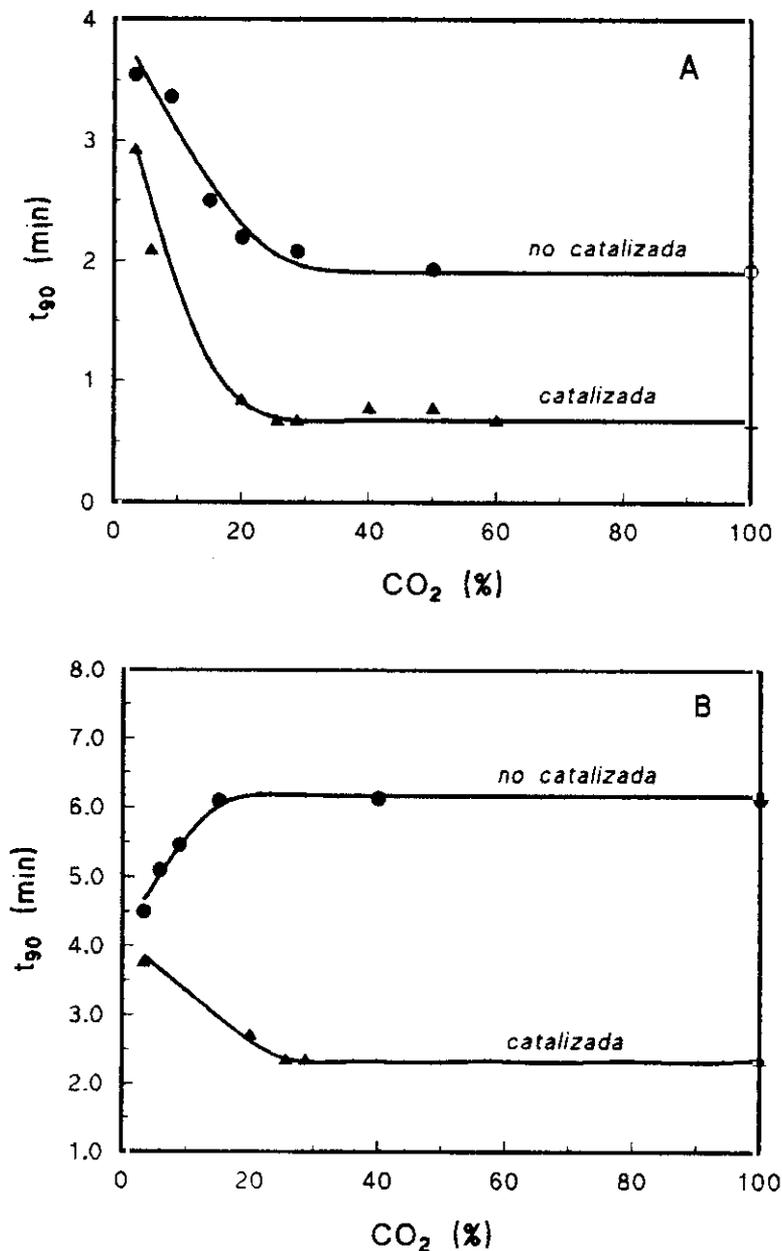


FIGURA 39. Tiempos de respuesta directo (A) e inverso (B) obtenidos con sendos optodos de CO₂, en ausencia y en presencia de anhidrasa carbónica (0.5 mg mL⁻¹) en la fase indicadora.

A partir de la observación de dicha gráfica, se demuestra que la incorporación de la enzima anhidrasa carbónica en la composición de la fase indicadora da lugar a una notable reducción en los tiempos de respuesta del optodo de CO₂. Este hecho se debe, sin duda, a la capacidad de la enzima para catalizar ambos sentidos de la reacción de hidratación del CO₂, que es una de las etapas limitantes del análisis de CO₂ con sensores químicos.

Las diferencias observadas en los tiempos de respuesta de los respectivos sensores son más acentuadas en el caso de la respuesta a altas concentraciones de CO₂; así, para un 100% del analito, el tiempo de respuesta se reduce de 2 minutos a 40 segundos, mientras que el tiempo de recuperación pasa de 6 a 2 minutos. Sin embargo, y a pesar de la reducción, no es posible equiparar los tiempos de respuesta directo e inverso del biosensor, ya que se trata de una característica intrínseca de todo sensor de CO₂, cuyo origen se encuentra en las diferentes velocidades de reacción de los procesos de difusión del gas hacia/desde la fase reactiva (Gehrich et al., 1986; Opitz et al., 1987). Por otra parte, aunque menores, los tiempos de respuesta del sensor de CO₂ en presencia de la enzima siguen siendo superiores a los obtenidos para los optodos de oxígeno (Opitz et al., 1987; Lübbers, 1992; Mills et al., 1993), debido fundamentalmente al mayor espesor o volumen de las fases sensibles empleadas en los sensores de CO₂ que provocan un aumento del tiempo necesario para alcanzar el equilibrio.

3.1.5. DETERMINACIÓN DE CO₂ MEDIANTE UN OPTOSENSOR BASADO EN MEDIDAS DE LUMINISCENCIA CON RESOLUCIÓN TEMPORAL.

La utilización del tiempo de vida de emisión como magnitud medible permite, entre otras ventajas, obtener un dispositivo de *superior estabilidad* de medida y *vida útil* (véase apartado 1.4.7.1). No obstante, y a pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, la mayoría de los sensores ópticos para CO₂ descritos hasta la fecha (ver apartado 3.1.2.2) emplean exclusivamente la *intensidad de luz* emitida como magnitud medible ya que, al estar basados en un equilibrio ácido-base en el estado fundamental del indicador (colorimétrico o fluorescente), el tiempo de vida de emisión no varía con el pH del medio. Sin embargo, como ya anticipamos en la sección

3.1.3.4, el empleo del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ como indicador luminiscente sensible al $\text{pH}/\text{P}_{\text{CO}_2}$ permite utilizar como principio de medida la determinación del tiempo de vida del estado excitado y simultánea o alternativamente, la intensidad de luminiscencia para la monitorización del analito, ya que su respuesta a éste se basa en la protonación del estado excitado del indicador, competitiva con su emisión de luz.

3.1.5.1. Efecto de la cantidad de indicador inmovilizado.

Con el fin de comprobar la independencia de la respuesta del optosensor de la concentración de indicador, se prepararon 3 optodos de CO_2 , que diferían en la concentración de complejo inmovilizado (1.0×10^{-4} , 5.0×10^{-5} y $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) en la fase reactiva, midiendo a continuación la respuesta relativa del sensor (τ_0/τ) hacia una mezcla gaseosa con un 5% de CO_2 . Los tiempos de vida de emisión obtenidos con el sensor resultaron ser independientes de la cantidad de indicador inmovilizado, lo cual confirma la superioridad de los sensores basados en tiempos de vida frente a los de intensidad de emisión. Como ya se mencionó en el apartado 1.4.7 de esta Memoria, una de las ventajas que presenta esta técnica de medida, es su *independencia* de la *concentración* del fluoróforo en la fase sensible, dentro de un amplio intervalo. Es por ello que, los sensores basados en la medida de este parámetro son, en general, dispositivos de *mayor estabilidad y vida útil* ya que la pérdida de reactivo (debido a la *fotodescomposición* o al “lavado” de la fase sensible) no afecta a la medida.

3.1.5.2. Efecto de la temperatura.

La luminiscencia es una propiedad que se ve afectada por la temperatura, de forma que, generalmente, disminuye al aumentar la misma. Este hecho se puede explicar considerando el aumento de la energía cinética de las moléculas, que favorece las colisiones entre las mismas y con el disolvente aumentando, por tanto, la probabilidad de que tengan lugar fenómenos de relajación vibracional y rotacional (ambos procesos no radiativos), o bien la existencia de otros fenómenos competitivos de naturaleza no radiativa.

En el caso de los complejos polipiridílicos de $\text{Ru}(\text{II})$, el efecto de la temperatura se ha atribuido a su posible desactivación, por una promoción térmicamente inducida, desde un estado triplete de transferencia de carga ($^3\text{MLCT}$) hasta otro estado excitado

de energía superior centrado en el metal (3MC) el cual, a su vez, decae al estado fundamental sin emisión (Demas et al., 1991).

En ausencia de procesos de desactivación bimoleculares, el tiempo de vida de emisión (τ) se define como el inverso de la suma de las constantes cinéticas de todos los procesos competitivos por los que transcurre la desactivación del estado excitado (ecuación 36) (Juris et al., 1988; Demas et al., 1991): emisión de luminiscencia (k_r), desactivación no radiativa (k_{nr}) y promoción térmicamente inducida a un(os) estado(s) excitado(s) de contenido energético superior no emisor(es) (k_{te}).

$$1/\tau = k_{obs} = k_r + k_{nr} + k_{te} = k_o + k_{te} \quad (36)$$

En el caso que nos ocupa, los procesos de promoción térmica se pueden reducir a uno sólo, cuya dependencia con la temperatura sigue un comportamiento de tipo Arrhenius (ecuación 37):

$$k_{te} = A \exp(-\Delta E/RT) \quad (37)$$

donde A es el factor preexponencial, ΔE la energía de activación experimental y R la constante universal de los gases.

Sustituyendo el valor de k_{te} en la ecuación (36), se obtiene la ecuación (38), que expresa la dependencia existente entre el tiempo de vida de emisión y la temperatura:

$$1/\tau = k_o + A \exp(-\Delta E/RT) \quad (38)$$

Se han realizado una serie de experimentos cuyo objetivo es estudiar cómo afecta la temperatura a la luminiscencia del $Ru(pzth)_3^{2+}$ cuando éste se encuentra en disolución e inmovilizado. Para ello, en primer lugar, se midió el tiempo de vida de emisión del $Ru(pzth)_3^{2+}$ en una disolución tampón hidrógenoftalato 0.1 M a pH 7.25 saturado con Ar, en el intervalo de temperaturas comprendido entre 277 y 321 K. Como se puede observar en la Figura 39, se produce un importante descenso en el tiempo de vida del indicador al aumentar la temperatura. Los puntos experimentales ($\tau = 1/k$) representados en la Figura 39 se ajustaron con éxito a la ecuación (38), lo

que corrobora la validez del modelo empleado, obteniéndose valores de $k_o = (1.39 \pm 0.04) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $A/\text{s}^{-1} = (2.4 \pm 1.3) \times 10^{12}$ y $\Delta E = (3.0 \pm 0.1) \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

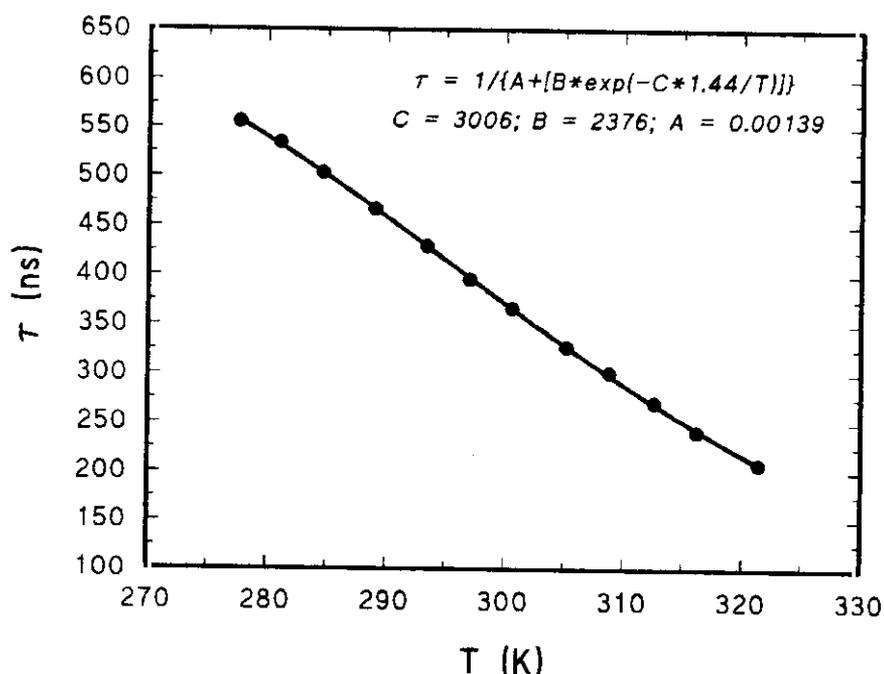


FIGURA 39. Variación del tiempo de vida de emisión de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ (10^{-5} M) disuelto en tampón hidrógenoftalato 0.1 M , $\text{pH } 7.25$, equilibrada con Ar , en función de la temperatura. La línea sólida representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (38).

Cuando se llevaron a cabo experimentos similares midiendo la variación que experimenta el tiempo de vida de luminiscencia del indicador inmovilizado en Sephadex, con la temperatura, se obtuvieron los resultados representados en la Figura 40. Se obtiene un comportamiento muy similar al observado en disolución acuosa, y al igual que en el caso anterior, la ecuación (38) también representa un buen modelo para predecir el comportamiento del sensor con la temperatura. El ajuste de los datos experimentales a dicha ecuación proporciona valores de los parámetros $k_o = (1.67 \pm 0.05) \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, $A/\text{s}^{-1} = (3.9 \pm 1.5) \times 10^{11}$ y $\Delta E = (2.5 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$.

Asimismo, a partir de estos valores y los obtenidos en disolución, hemos calculado a través de la expresión (39); la eficiencia del proceso de promoción térmica ($\phi_{3_{\text{MC}}}$) desde el estado excitado $^3\text{MLCT}$ al ^3MC , obteniéndose valores de 0.40 y 0.46 (a 293 K) para el indicador en disolución acuosa y absorbido en Sephadex, respectivamente.

$$\phi_{3MC} = k_{te} / \Sigma k_i = \frac{A \exp(-\Delta E/RT)}{1/\tau} \quad (39)$$

De esta forma, podemos concluir que la inmovilización del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ en Sephadex conduce en cierta forma a una menor fotoestabilidad del indicador, ya que rebaja el nivel energético del estado excitado ^3MC responsable de la fotolabilización del ligando, por lo que la barrera energética (ΔE) entre los estados $^3\text{MLCT}$ y ^3MC disminuye ligeramente aumentando, por tanto, la probabilidad de los procesos de desactivación térmicamente inducidos. Esto nos lleva a la conclusión de la necesidad de controlar en todo momento la temperatura de trabajo, con el fin de obtener resultados exactos y precisos de la concentración de CO_2 .

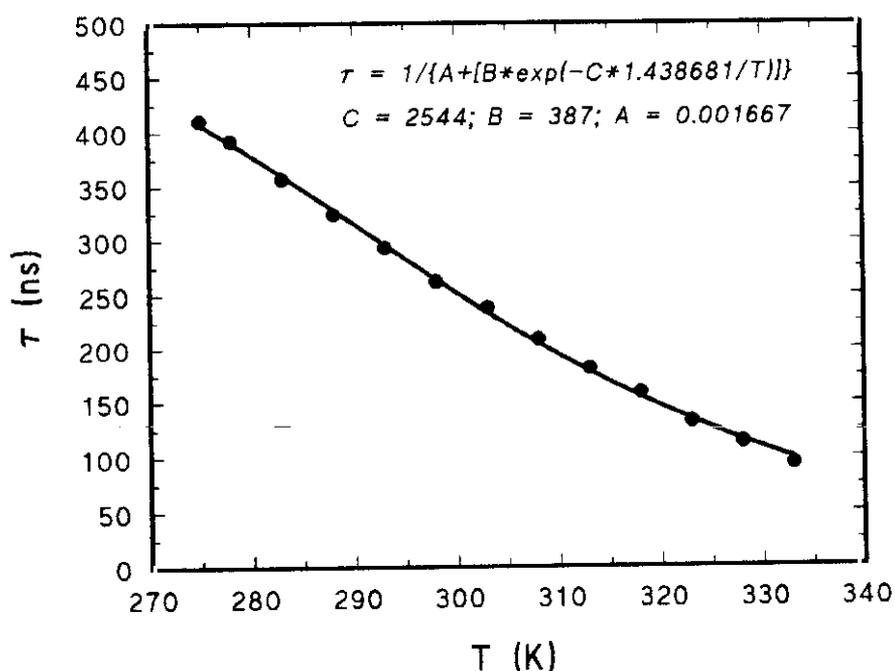


FIGURA 40. Variación del tiempo de vida del complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ inmovilizado en CM-Sephadex y equilibrado con Ar, en función de la temperatura. La línea sólida representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación (38)..

3.1.5.3. Características analíticas.

a) Calibrado.

El calibrado del sensor se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1.2. Aunque no es frecuente cuando un luminóforo se encuentra inmovilizado sobre un soporte sólido, se han obtenido cinéticas de la extinción de la

luminiscencia del mismo estrictamente *monoexponenciales* en todo el intervalo de concentraciones de CO_2 , lo cual indica, una vez más, la *homogeneidad* del *microentorno local* correspondiente a cada molécula de $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ adsorbida en el soporte en las condiciones utilizadas para la preparación del terminal sensible. A 20°C , el tiempo de vida del indicador inmovilizado es 293 ns en presencia de un 100% de Ar, mientras que éste disminuye hasta 165 ns después de saturar la fase sensible con un 100% de CO_2 .

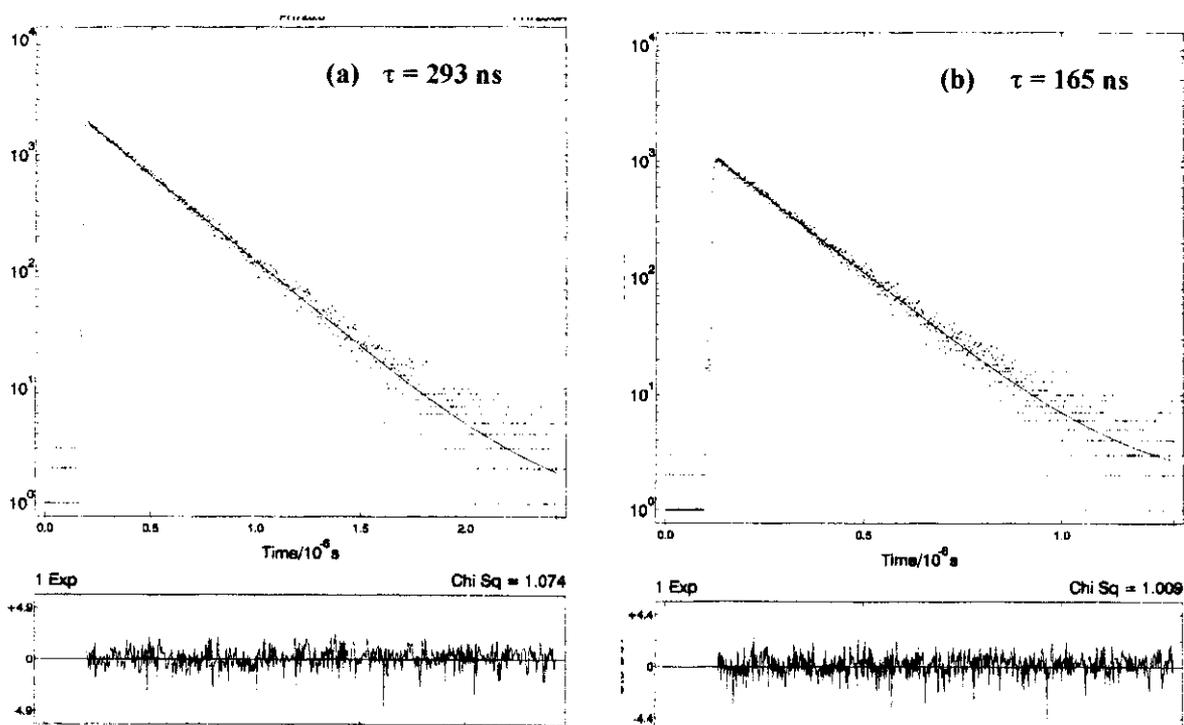


FIGURA 41. Perfiles cinéticos de la extinción de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ inmovilizado en CM-Sephadex, en presencia de tampón hidrógenoftalato 0.1 M, pH 7.25, a $(20.0 \pm 0.2^\circ\text{C})$ y $P_T = 710$ Torr ($\lambda_{\text{exc}} = 337$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 653$ nm) (a) equilibrado con Ar y (b) equilibrado con 100% CO_2 .

En la Figura 42 hemos recogido la superposición de las representaciones de Stern-Volmer correspondientes a la desactivación de la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$ inmovilizado en CM-Sephadex, en función del % CO_2 en mezclas gaseosas CO_2/Ar , obtenidas con el sensor basado en medidas de tiempos de vida y de intensidad de emisión. Estos calibrados son idénticos dentro del error experimental y siguen el mismo hábito que los obtenidos en disolución acuosa (Figura 25), si bien, a diferencia de lo que ocurre en disolución (véase apartado 3.1.3.5), la respuesta del $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$

inmovilizado al CO_2 está modulada, además, por la presencia de un segundo tampón (grupos carboxilato del Sephadex) en la capa sensible del terminal.

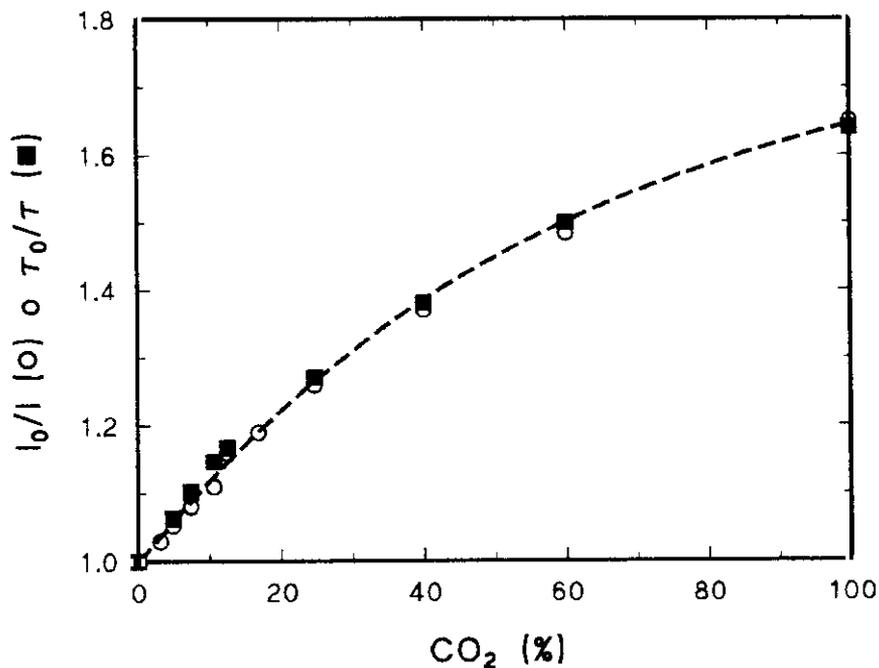


FIGURA 42. Comparación de calibrados obtenidos con los sensores de fibra óptica para CO_2 basados en medidas de intensidad de emisión y tiempos de vida de emisión de luminiscencia del $\text{Ru}(\text{pzh})_3^{2+}$ inmovilizado en CM-Sephadex. ($P_T = 710$ Torr, 20°C).

A la vista de los calibrados representados en la Figura 42, queda demostrada la posibilidad de efectuar medidas de intensidad de emisión o tiempos de vida con el sensor de fibra óptica indistintamente, según convenga en cada momento.

La señal normalizada del sensor, se ajusta a una regresión lineal en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 - 12% de CO_2 , obteniéndose la siguiente ecuación con un coeficiente de regresión lineal de 0.9991:

$$\tau_0/\tau = I_0/I = (0.013 \pm 0.001) \% \text{CO}_2 + (0.999 \pm 0.008)$$

b) Precisión y límite de detección.

La *precisión* del sistema óptico de medida basado en medidas de tiempos de vida de luminiscencia se evaluó en términos de la desviación estándar relativa (RSD) de la señal de emisión normalizada para siete determinaciones análogas de muestras con un 5, 25 y 100% de CO_2 empleadas en el calibrado con gases húmedos, obteniéndose valores de RSD igual a 1.9, 1.2 y 1.7%, respectivamente. Estos valores

son inferiores a los obtenidos con el sensor basado en medidas de intensidad de emisión (véase apartado 3.1.4.2), lo cual confirma la mayor precisión del optodo basado en medidas de tiempos de vida de emisión.

En cuanto al *límite de detección*, se calculó a partir de diez determinaciones del cociente τ_0/τ correspondiente al blanco, en este caso Ar puro, y aplicando el criterio recomendado por la IUPAC (Winefordner, 1983), resultando un valor igual al 0.4% de CO₂.

3.1.7. APLICACIÓN ANALÍTICA DEL SENSOR DE CO₂ A MEDIDAS EN FASE GASEOSA.

Para comprobar la utilidad del sensor desarrollado para la determinación de CO₂ en muestras reales se procedió al análisis de esta especie en una mezcla gaseosa N₂/CO₂ con un contenido certificado del 9.90% en el analito. Se emplearon gases saturados de vapor de agua, tanto para la obtención del calibrado como para la medida de la muestra, y se ajustó el intervalo de concentraciones comprendido entre el 0-15% de CO₂ a una regresión lineal, para la obtención de la recta de calibrado. Los resultados obtenidos (TABLA XII) demuestran que no existen diferencias significativas entre el valor obtenido con los sensores de intensidad y tiempos de vida de emisión y el valor real a un nivel de confianza del 95%.

TABLA XII. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ANÁLISIS DE UNA MEZCLA GASEOSA CERTIFICADA CON LOS OPTODOS DE CO₂. (Ru(pzth)₃²⁺ 10⁻⁴ M, tampón fosfato 0.1M, pH = 8.5, 0.5 mg mL⁻¹ de anhídrido carbónico; P_T = 711 Torr, 20 °C).

| | <i>Valor Certificado</i> | <i>Sensor I^a</i> (n = 5) | <i>Sensor II^b</i> (n = 5) |
|-------------------|--------------------------|--|---|
| % CO ₂ | 9.90 | 9.6 ± 0.4 | 10.0 ± 0.1 |

^a Sensor basado en medidas de intensidad de emisión.

^b Sensor basado en medidas de tiempos de vida de emisión.

3.1.7. APLICACIÓN ANALÍTICA DEL SENSOR DE CO₂ A MEDIDAS EN DISOLUCIÓN ACUOSA.

El optodo de CO₂ basado en medidas de intensidad de luminiscencia se ha aplicado a la determinación del contenido de bicarbonato en aguas minerales

comerciales. Para llevar a cabo los análisis se preparó una recta de calibrado con concentraciones crecientes de bicarbonato, siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 2.4.1.2 de esta Memoria. A continuación, se procedió al análisis de las muestras de agua de distinta procedencia, previa dilución de las mismas con tampón cítrico/citrato 0.1 M y pH 5.0. Los resultados obtenidos para cinco determinaciones análogas de cada muestra se recogen en la TABLA XIII. Las muestras se analizaron de forma paralela con un electrodo comercial de CO₂ (Orion), empleando las mismas condiciones experimentales que para el optodo.

TABLA XIII. DETERMINACIÓN DE HCO₃⁻ EN MUESTRAS DE AGUA MINERAL. ^a

| AGUA | V. nominal | Sensor CO₂ | Electrodo CO₂ | Dilución |
|------------------------|-------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| Fontemilla | 307.4 | 311 ± 11 | 314 ± 10 | 1:4 |
| Contrex | 384.3 | 238 ± 11 | 227 ± 5 | 1.4 |
| Fontvella | 131.1 | 132 ± 7 | 129 ± 3 | 1:2 |
| Solán de Cabras | 283.0 | 292 ± 9 | 285 ± 2 | 1:2.5 |

^a Cada resultado, expresado en ppm, es la media de 5 determinaciones con su desviación estándar.

Como se deduce de los datos recogidos en la TABLA XIII, los resultados obtenidos por ambos métodos resultan totalmente comparables a un nivel de confianza del 95%, lo que pone de manifiesto la bondad de la nueva técnica analítica puesta a punto que utiliza el sensor de fibra óptica. Únicamente para el caso de una muestra de agua (Contrex) de elevado contenido salino, se han obtenido resultados dispares por ambos métodos, y a su vez muy distintos del valor nominal, lo cual se debe, muy probablemente, a la elevada fuerza iónica de esta muestra que da lugar a diferencias de presión osmótica a ambos lados de la membrana de silicona que separa la fase sensible de la muestra y que utilizan tanto el optodo como el electrodo de CO₂.

Se descartó el empleo del optodo de CO₂ en presencia de la enzima anhidrasa carbónica para la medida de muestras líquidas, debido a la deriva de la línea base observada cuando se analizan muestras de bajo contenido iónico (el mismo efecto ha sido observado en los electrodos comerciales de CO₂). Este efecto se atribuye a la

diferente concentración de las soluciones externa (muestra) e interna (fase reactiva) teniendo en cuenta que la fase reactiva contiene el gel iónico, la enzima y un tampón muy concentrado (0.1 M). Ello provoca el paso de vapor de agua a través de la membrana de silicona (por un proceso de ósmosis), con la consiguiente dilución y deriva de la línea base.

3.1.8. BIBLIOGRAFÍA.

Batzer, H. (ed.). *"Polymeric Materials"*. Thieme, Stuttgart, 1985.

Bauer, C; Gros, G y Bartels, H. (eds.). *"Biophysics and Physiology of Carbon Dioxide"*, Springer, Berlin, 1980.

Bohr, A. *"Carbon Dioxide Activation by Metal Complexes"*. VCH, Weinheim (FRG), 1988.

Butler, J.N. *"Carbon Dioxide Equilibria and their Applications"*. Addison. Wesley Publishing Company. Reading. 1982.

Carbon Dioxide Electrode Model 95-02 Instruction Manual, Orion Research Inc, 1986.

Collison, M.E. y Meyerhoff, M.E. *Anal. Chem.*, 1990, 62, 425A.

DeGrandpre, M.D. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 331.

Demas, J.D. y DeGraff, B.A. *Anal. Chem.*, 1991, 63, 829A.

Dewar, M.J.S y Storch, D.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1985, 82, 2225.

Dogson, S.J; Tashian, R.E; Gros, G y Carter, N.D. *"The Carbonic Anhydrases"* Plenum Press, New York, 1991.

Fogt, E. J. *Clin. Chem.*, 1990, 36, 1573.

Gehrich, J.L; Lübbers, D.W; Opitz, N; Hansmann, D.R; Miller, M.M; Tusa, J.K y Yafuso, M. *IEEE. Trans. Biomed. Eng.*, 1986, BME-33, 117.

Gutfreund, H. *"An Introduction to the Study of the Enzymes"*, Blackwell, Oxford, 1967.

Halbert, S.A. *Clin. Chem.*, 1990, 36, 1581.

- Heitzmann, H.A. *Optical sensor with beads*, U.S. Patent, 4 557 900, 1985.
- Henry, R.J; Canon, D.C. y Winkelman, J.W. "Química Clínica. Bases y técnicas". 2ª edición, Ed. Jims, Barcelona, 1980.
- Hirschfeld, T; Miller, F; Thomas, S; Miller, H; Milanovich, F. y Gaver, R.W. *J. Light. Technology*, 1987, LT-5, 7, 1027.
- Ireland, J.F. y Wyatt, P.A.H. *Adv. Phys. Org. Chem.*, 1976, 12, 131.
- Jensen, M.A y Rechnitz, G.A. *Anal. Chem.*, 1979, 51, 1972.
- Juris, A; Balzani, V; Barigelletti, F; Campagna, S; Belser, P. y von Zelewski, A. *Coord. Chem. Rev.*, 1988, 84.
- Kawabata, Y; Kamichika, T; Imasaka, T. y Ishibashi, N. *Anal. Chim. Acta*, 1989, 219, 223.
- Kern, D.M. *J. Chem. Educ.*, 1960, 37, 14.
- Kirk-Othmer. *Enciclopedia of chemical technology*, vol. 4, Interscience, New York, 3rd ed., 1978, 725.
- Koller, E. (ed.) *Handbook on pH probes and enzyme substrates*, Lambda probes and Diagnostics, Graz, 1991.
- Lakowicz, J.R; Szmecinski, H. y Karakelle, M. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 272, 179.
- Leiner, M.J.P. *Anal. Chim. Acta*, 1991, 255, 209.
- Lindskog, S; Henderson, L.E; Kannan, K.K; Liljas, A; Nyman, P.O y Strandberg, B. "The Enzymes", P.D. Boyer (ed.). vol. 5, Academic Press, New York, 1971.
- Lorius, C; Jouzel, J; Raynaud, D; Hansen, J. y Le Treut, H. *Nature*, 1990, 347, 139.
- Lübbbers, D.W. y Opitz, N. *Z. Naturforsch.*, 1975, 30C, 532.
- Lübbbers, D.W; Hannebauer, F y Opitz, N. *Birth Defects Orig. Artic. Ser.*, 1979, 15, 123.
- Lübbbers, D.W. y Opitz, N. *Anal. Chem. Symp. Ser.*, 1983, 17, 609.
- Lübbbers, D.W. *Adv. Biosens.*, 1992, 2 215.
- Manuccia, T.J y Eden, J.G. *U. S. Patent 4 509 522*, 1985.

- Marr, I.L; Cresser, M.S. y Gómez, J.L. "Química Analítica del Medio Ambiente".
Editorial Universidad de Sevilla, 1990.
- Masschelein, A; Kirsch-De Mesmaeker; Willsher, Ch.J y Wilkinson, F. *J. Chem. Soc. Faraday. Trans.*, 1991, 87, 259.
- McMurray, H.N. *J. Mater. Chem.*, 1992, 2, 401.
- Miller, W.W; Yafuso, M; Yan, C.F; Hui, H.K. y Arick, S. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 1538.
- Mills, A; Chang, Q. y McMurray, H.N. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1383.
- Mills, A. y Chang, Q. *Analyst*, 1993, 118, 839.
- Mills, A. y Chang, Q. *Sens. and Actuators B*, 1994, 21, 83.
- Mills, A. y Chang, Q. *Anal. Chim. Acta*, 1994, 285, 113.
- Mills, A. y Wild, L. "Chemical, Biochemical and Environmental Fiber Sensors VII", in
Proceedings of SPIE, Munich, FRG, vol. 2508, 1995.
- Müller, B. y Hauser, P.C. *Analyst*, 1996, 121, 339.
- Munkholm, C; Walt, D.R. y Milanovich, F.P. *Talanta*, 1988, 35, 109.
- Nazeeruddin, M.K. y Kalyanasundaram, K. *Inorg. Chem.*, 1984, 28, 4251.
- Opitz, N. y Lübbers, D.W. "In Oxygen Transport to Tissue". Bruley, D.; Bicher, H.I;
Reneau, D. (eds.), Plenum: New York, 1984, vol. VI, 757.
- Opitz, N. y Lübbers, D.W. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1987, 215, 45.
- Orellana, G; Quiroga, M.L. y Braun, A.M. *Helv. Chim. Acta*, 1987, 70, 2073.
- Orellana, G; Álvarez-Ibarra, C. y Santoro, J. *Inorg. Chem.*, 1988, 27, 1025.
- Orellana, G. y Braun, A.M. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1989, 48, 277.
- Orellana, G y Moreno-Bondi, M.C, *Sensor óptico, Patente española ES 2 023 593*,
1992.
- Parker, J.W; Laksin, O; Yu, C; Lau, M.L; Klima, S; Fisher, R; Scott, Y. y Atwater, B.W.
Anal. Chem., 1993, 65, 2329.
- Peng, Z, y Merz, K.M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 2733.

- Perrin, D.D. y Dempsey, B. "Buffers for pH and Metal Ion Control". Chapman and Hall: London, 1974; 157.
- Peterson, J.I. y Goldstein, S.R. . Fiber optic pH probe, *U.S. Patent*, 4200, 110, 1980.
- Peterson, J.I; Goldstein, S.R; Fitzgerald, R.V. y Buckhold, D. K. *Anal. Chem.*, 1980, 52, 864.
- Rau, H; Frank, R y Greiner, G . *J. Phys. Chem.*, 1986, 90, 2476.
- Rochester, C.H. "Acidity Functions". Academic Press, Nueva York, 1970.
- Sarmiento, J.L. y Sundquist, E.T . *Nature*, 1992, 365, 589.
- Schulman, S.G. (ed.). "Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications". Vol. 2. John Wiley. Nueva York. 1988
- Severinghaus, J.W. y Bradley, A.F . *J. Appl. Physiol.*, 1958, 13, 515.
- Skirrow, G. y Riley, J.P. "Chemical Oceanography", 2nd ed, Vol. 12, Academic Press, London, 1975.
- Slama-Schwok, A; Feitelson, Y y Rabani, J . *J. Phys. Chem.*, 1981, 81, 2222.
- Stern, O. y Volmer, M . *Physik. Z.*, 1919, 20, 183.
- Stoker, H.S. y Seager, S.L. "Química Ambiental. Contaminación del aire y del agua". Ed. Blume, Barcelona, 1981.
- Swenson, F. "Thirtieth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy" (I.C.A.A.C.), October 1990, Atlanta.
- Szentirmay, M.N; Prieto, N.E y Martin, Ch.R . *J. Phys. Chem.*, 1985, 89, 3017.
- Tauber, H. "The Chemistry and Technology of the Enzymes". Wiley, New York, 263. 1949.
- Vurek, G.G; Feustel, P.J. y Severinghaus, J.W . *Ann. Biomed. Eng.*, 1984, 11, 499.
- Walt, D.R; Gabor, G. y Goyet, C . *Anal. Chim. Acta*, 1993, 274, 47.
- Weigl, B.H; Holobar, A; Rodríguez, N.V. y Wolfbeis, O.S. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 282, 335.
- Weigl, B.H. y Wolfbeis, O.S . *Anal. Chem.*, 1994, 66, 3323.

Weigl, B.H. y Wolfbeis, O.S. *Sens. and Actuators B*, 1995, 28, 151.

Wilks, P.A. *MBBA. Techn. Quar.*, 1988, 25, 113.

Winefordner, J.D. *Anal. Chem.*, 1983, 55, 712A.

Wolfbeis, O.S; Furlinger, E; Kroneis, F. y Marsoner, H. *Fresenius. Z. Anal. Chem.*, 1983, 314, 119.

Wolfbeis, O.S; Weis, L; Leiner, M.J.P. y Ziegler, W.E. *Anal. Chem.*, 1988, 60, 2028.

Wolfbeis, O.S. "Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors", vol. II. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1991.

Yasuda, H y Stannett, V. "Permeability coefficients", en *Polymer Handbook*, Brandrup, J e Immergut, E.H. (eds.), John Wiley & Sons, New York, 1981, III.

Zheng, Y.J y Merz, K.M. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 10498.

Zhujun, Z. y Seitz, W.R. *Anal. Chim. Acta*, 1984, 160, 305.

3.2. SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE O₂.

3.2.1. Interés analítico de la determinación de O₂.

3.2.1.1. Interés medioambiental.

3.2.1.2. Interés clínico.

3.2.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de O₂

3.2.2.1. Métodos eléctricos.

3.2.2.2. Métodos volumétricos.

3.2.2.3. Métodos ópticos.

3.2.2.4. Sensores de fibra óptica.

3.2.3. Determinación de O₂ mediante un sensor basado en medidas de luminiscencia.

3.2.3.1. Preparación de la fase sensora.

3.2.4. Optimización del procedimiento de inmovilización en gel de sílice.

3.2.4.1. Efecto de la cantidad de indicador inmovilizado.

3.2.4.2. Efecto de la cantidad de gel de sílice presente en la membrana.

3.2.5. Características analíticas.

3.2.5.1. Calibrado. Ecuación de ajuste.

3.2.5.2. Precisión y límite de detección.

3.2.6. Aplicación analítica.

3.2.6.1. Determinación de O₂ en un proceso de fermentación aerobia.

3.2.6.2. Monitorización del nivel de O₂ disuelto en el proceso de tratamiento biológico de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR).

3.2.7. Bibliografía.

3.2. SENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE OXÍGENO.

3.2.1. INTERÉS ANALÍTICO DE LA DETERMINACIÓN DE O₂.

3.2.1.1. *Interés medioambiental.*

La presencia de oxígeno disuelto es fundamental para la vida de las poblaciones animales y vegetales de cualquier medio acuático. Su supervivencia depende de la capacidad del agua para mantener ciertas concentraciones mínimas de esta sustancia vital. Los peces necesitan niveles más elevados, los invertebrados niveles intermedios y las bacterias los más reducidos. La concentración de oxígeno en una disolución saturada del gas varía con la temperatura, con la altura, y con la fuerza iónica del medio, pero el nivel mínimo no debe ser inferior a las 6 ppm para el mantenimiento de la vida en el medio acuático

La presencia de esta molécula disuelta en el agua es absolutamente necesaria para que las aguas permanezcan potables y sin olores, ya que los procesos biológicos naturales de *depuración de aguas* requieren oxígeno. Gracias al fenómeno de *autodepuración*, las aguas superficiales de las regiones con bajas densidades de población e industria no presentan, generalmente, problemas de contaminación. Por el contrario, en *zonas fuertemente urbanizadas o industrializadas*, los lagos, lagunas, ríos, etc., presentan frecuentemente una gran *carencia de oxígeno*. La falta de oxígeno en el agua superficial se origina debido a que la capacidad de reoxigenación natural se torna insuficiente a causa de vertidos industriales incontrolados o de fertilizantes procedentes de riego de terrenos agrícolas, aguas de lluvia, etc.

El estancamiento o la circulación lenta del agua cargada de materia orgánica, hace que las *bacterias aerobias* presentes en la misma, la utilicen como alimento, consumiendo el O₂ disuelto. Eventualmente, si el aporte de O₂ no es el adecuado, el agua se hace anaerobia, desarrollándose una flora bacteriana diferente, con bacterias reductoras que convierten los elementos de compuestos orgánicos en sus hidruros respectivos: CH₄, NH₃ y H₂S en lugar de especies oxidadas como CO₂, NO₃⁻ y SO₄²⁻.

Inyectar oxígeno puro en el agua en dosis adecuadas y mantener la concentración de oxígeno disuelto dentro de ciertos intervalos (valor óptimo 3 ó 4 ppm), permite conservar las condiciones aeróbicas y por lo tanto, evitar los efectos negativos ocasionados por la falta de oxígeno.

Un concepto importante cuando se habla de la depuración de aguas es la “Demanda Bioquímica de Oxígeno” (DBO), un parámetro que proporciona una estimación de la calidad del agua, con relación a su contenido en O_2 . Se define como “la cantidad de O_2 necesaria durante los cinco primeros días para descomponer la carga residual del agua, a 20 °C, bajo acción biológica de microorganismos aeróbicos”. No obstante, la medida de la DBO presenta el inconveniente de requerir tiempos largos de medida y baja reproducibilidad. En la actualidad se ha reemplazado la medida de la DBO por la prueba de la “Demanda Química de Oxígeno” (DQO) que consiste en el empleo de un poderoso agente oxidante, una disolución de $K_2Cr_2O_7$ en H_2SO_4 que acelera la reacción de oxidación finalizando la prueba en menos de 3 horas, pudiéndose relacionar el consumo de $K_2Cr_2O_7$ con la cantidad de O_2 .

3.2.1.2. Interés clínico.

Desde una perspectiva médica, la determinación en continuo de la P_{O_2} es un parámetro de importancia crítica en el tratamiento y diagnóstico de problemas *cardiorespiratorios, exámenes de pulmón, en respiración artificial y anestesiología (Kaplan et al., 1989).*

La determinación de la P_{O_2} se basa en la determinación electroquímica del O_2 que difunde a través de la membrana permeable a los gases e impermeable al paso de iones, en un tampón electrolítico que se encuentra dentro de un electrodo de Clark. En los últimos años se han desarrollado y evaluado métodos no invasivos para medir la P_{O_2} a través de la piel que han resultado muy útiles (*Huch et al., 1983*). Estos monitores transcutáneos permiten una determinación continua del estado de oxigenación de una persona, lo cual resulta fundamental en ciertas ocasiones, por ejemplo, en el control de los neonatos que sufren alteraciones respiratorias. Una pequeña proporción de los gases presentes en la sangre puede difundir desde el lecho capilar hacia la superficie de la piel. Si calentamos la superficie de la piel, permitiendo

que el flujo sanguíneo local aumente al máximo, la P_{O_2} transcutánea (P_{O_2tc}) puede correlacionarse con la P_{O_2} arterial.

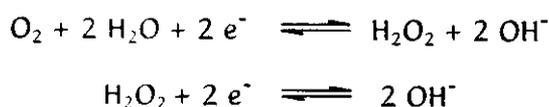
Actualmente, la determinación de la P_{O_2} transcutánea se realiza empleando electrodos en miniatura de igual diseño que los analizadores de gases. En este caso, en el interior del electrodo se dispone un elemento calefactor que mantiene la temperatura entre 42 - 43 °C reduciendo con ello el efecto del flujo sanguíneo local sobre la P_{O_2} . La exactitud de estas determinaciones será función de la vascularización de la dermis y de la actividad metabólica de las capas dérmicas y epidérmicas. Se ha detectado una falta de correlación entre las medidas de la P_{O_2tc} y los valores de la P_{O_2} arterial determinada in vitro y ocasionados por causas tales como: baja presión sanguínea, problemas de perfusión, etc. Con el fin de superar estos inconvenientes, en la última década se han realizado numerosos esfuerzos dirigidos al desarrollo de tecnologías invasivas que permitan la obtención de dispositivos *miniaturizados* para su *implante intravascular* (Eberhart et al., 1980). En este sentido, los optodos pueden convertirse, en un futuro más o menos próximo, en una alternativa real a los métodos tradicionales de análisis de gases en sangre, gracias a su pequeño tamaño, flexibilidad espacial y ausencia de conexiones eléctricas.

3.2.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE O_2 .

3.2.2.1. Métodos eléctricos.

a) Electrodo de Clark.

Se trata de un dispositivo amperométrico bipolar, integrado por un microelectrodo de Pt que sirve de cátodo y un ánodo de Ag/AgCl, sumergidos ambos en un electrolito de KCl; el sistema se separa del medio a estudiar por una membrana de Teflón[®] permeable al O_2 (véase Figura 43). Al aplicar un potencial de polarización al electrodo, el O_2 difunde a través de la membrana y se reduce en el cátodo, según la reacción:



La corriente debida a la reacción electroquímica es proporcional a la cantidad de O_2 reducido y, por lo tanto, a su concentración. La magnitud de la corriente medida viene determinada por el espesor de la membrana, la velocidad de difusión del O_2 a través de la membrana y el tamaño del cátodo. Presenta el inconveniente de que consume O_2 y se contamina fácilmente por H_2S , proteínas y diversos compuestos orgánicos por lo que posee una estabilidad limitada y requiere una frecuente recalibración.

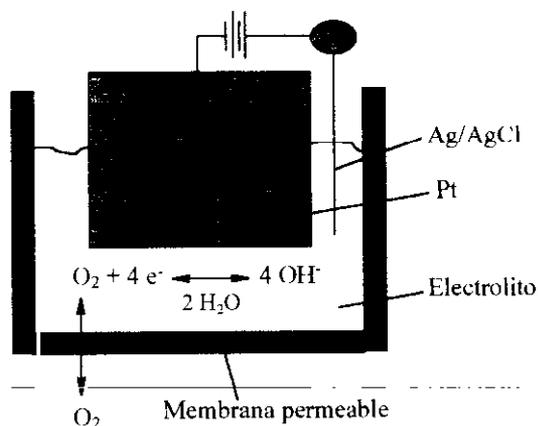
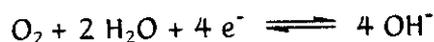


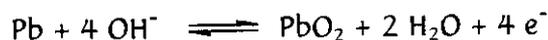
FIGURA 43. Esquema de un electrodo de Clark.

b) Célula de O_2 de Mackereth.

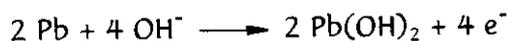
Está constituida por dos electrodos metálicos, uno de Ag y otro de Pb, inmersos en una disolución saturada de HCO_3^- separada de la muestra por una membrana de polietileno. En definitiva, se trata de una célula galvánica, que no precisa de ningún potencial externo, en la que se mide la corriente correspondiente a la muestra, a un estándar (muestra saturada de aire), y a un blanco (muestra tratada con sulfito sódico para eliminar el O_2). Las reacciones que tienen lugar en el electrodo de Ag son:



y en el electrodo de Pb:



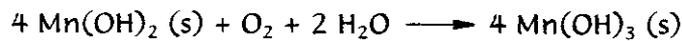
ó



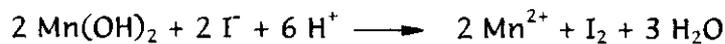
La velocidad de difusión del O₂ a través de la membrana depende generalmente de la temperatura (el error puede compensarse introduciendo un termistor en el circuito de medida y situándolo cerca de los electrodos).

3.2.2.2. Métodos volumétricos.

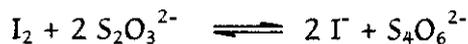
El método *iodométrico o de Winkler* (Skoog et al., 1989) supone el tratamiento de la muestra con exceso de Mn(II), yoduro potásico e hidróxido sódico. El hidróxido de Mn(II) (blanco) producido es oxidado rápidamente por el O₂ para formar Mn(OH)₃ (marrón), según la reacción:



Al acidificar, el hidróxido de Mn(II) se disuelve y oxida el I⁻ a I₂:



El I₂ es entonces valorado con una disolución patrón de tiosulfato:



El punto final de la valoración se puede detectar visualmente, utilizando almidón como indicador o bien utilizando métodos electroquímicos. El buen resultado del método depende de la rapidez y cuantitividad de la reacción con el O₂, y de la eliminación de interferencias de otras especies reductoras que puedan estar presentes en el medio, como nitrato y sulfito. Este método es *tedioso, lento y poco selectivo*.

3.2.2.3. Métodos ópticos.

La oximetría clínica ha sido el método más utilizado para medir la *saturación de O₂* en sangre (Kaplan et al., 1989) o porcentaje de hemoglobina total que ha fijado O₂. El método se basa en las diferencias observadas en los espectros de absorción de la oxihemoglobina (HgbO₂) y la desoxihemoglobina (Hgb). En general, una muestra de sangre se analiza a dos longitudes de onda diferentes, una a la que se observa una gran diferencia en la absorbancia entre la Hgb y la HgbO₂, y otra, denominada "punto isobéptico", a la cual la absorbancia es idéntica para ambas formas. La medición del punto isobéptico proporciona la cantidad total de

hemoglobina presente y la absorción a la otra λ depende de la diferencia de concentración entre las dos formas de hemoglobina.

En la actualidad, la *oximetría in vivo* se realiza utilizando una *fibra óptica* para transmitir la luz desde el oxímetro, a través de un catéter, hasta la sangre del paciente en la arteria pulmonar. En el interior de la arteria, la luz choca con la hemoglobina sanguínea (Hgb), en los glóbulos rojos; parte de la luz es reflejada y recogida de nuevo por la fibra óptica (la misma u otra distinta) y llevada al fotodetector que mide la cantidad de luz reflejada a distintas λ , enviando los resultados a un procesador.

3.2.2.4. Sensores de fibra óptica.

El desarrollo de sensores ópticos para la determinación de O_2 en continuo ha merecido un gran esfuerzo durante los últimos años debido al gran interés que representa su determinación, tanto a nivel clínico como ambiental.

Las ventajas que ofrece la utilización de los sensores de fibra óptica frente a los métodos convencionales, como el electrodo de Clark (*Hitchman, 1978*) son múltiples: la ausencia de consumo de O_2 en la medida, su inercia frente a cambios de flujo, agitación, presencia de burbujas o elevadas presiones externas, lo cual ha facilitado su empleo para determinaciones de este gas en aguas marinas o subterráneas.

a) Optodos basados en medidas de reflectancia.

Kapany y col. (*Kapany et al., 1964*) describieron el empleo de un catéter de fibra óptica para la determinación de O_2 *in vivo* en animales. Su funcionamiento se basa en el *desplazamiento de la banda de Soret* de absorción de la *hemoglobina* cuando ésta se asocia con el O_2 . Los resultados obtenidos fueron satisfactorios, si bien las curvas de calibrado medidas para distintos animales resultaban muy diferentes, responsabilizando de este fenómeno a la variabilidad de las propiedades ópticas de la sangre.

Zhujun y col. (*Zhujun et al., 1986*) construyeron otro sensor basado en este mismo principio, inmovilizando *desoxihemoglobina* en una resina de intercambio catiónico, que se sitúa en el extremo común de un haz de fibras ópticas bifurcado

utilizando una membrana de PTFE. El cociente de intensidades reflectadas a 435 y 405 nm se utiliza para medir la presión parcial de O₂ entre 20 y 100 bar. El tiempo de vida útil del dispositivo resultó ser de dos días a temperatura ambiente debido a la rápida oxidación de la hemoglobina inmovilizada. Además, su respuesta depende del pH, de la presencia de CO₂ y de otros gases oxidantes, ácidos o básicos.

Chung y col. (Chung et al., 1995) han descrito recientemente un sensor para la determinación de O₂ disuelto, basado en el empleo de *mioglobina* (Mb) encapsulada en una matriz de vidrio por el procedimiento sol-gel. El sensor mide la velocidad de cambio del espectro de absorción de la desoximioglobina encapsulada durante los 5 primeros minutos de exposición al O₂.

b) Optodos basados en medidas de luminiscencia.

La mayoría de los sensores luminiscentes para la determinación de O₂, están basados en medidas de *desactivación dinámica de la luminiscencia* (fluorescencia o fosforescencia) de un luminóforo por el O₂ molecular. El O₂ molecular desactiva muy eficazmente la fosforescencia de las moléculas orgánicas y la luminiscencia de los complejos metálicos de coordinación (Pfeil, 1971). Dependiendo de la naturaleza del sustrato, la reacción de desactivación bimolecular puede suceder por *transferencia de energía*, por *transferencia electrónica* o por ambos (Winterle et al., 1976; Lin et al., 1976).

La *transferencia de energía* es un proceso físico por el cual una molécula en estado excitado transfiere su energía de excitación a otra en estado fundamental. Desde el punto de vista de la molécula que absorbe luz, la transferencia de energía conduce a la desactivación de su estado excitado, siguiendo un proceso de Stern-Volmer. La limitación a la transferencia de energía entre una especie dadora y el O₂ es que la molécula de O₂ debe tener un estado excitado situado por debajo del nivel energético del estado excitado del dador. Además, el tiempo de vida del dador excitado electrónicamente debe ser suficientemente largo para que las dos especies puedan colisionar. Ambos requisitos se cumplen generalmente en el caso de los complejos de Ru(II) del tipo RuL₃.

Por otra parte, la *transferencia electrónica* supone el traspaso de un electrón a o desde el luminóforo, al tiempo que sucede la oxidación o reducción de otra especie

en disolución. En el caso del O_2 , el proceso que tendría lugar es una reducción, dando como resultado el anión superóxido $O_2^{\cdot-}$.

Obviamente, en el caso de los sensores basados en este principio, no se consume O_2 durante el proceso de medida, lo cual supone una gran ventaja sobre los sensores amperométricos. Los distintos fluorosensores para la determinación de O_2 descritos hasta el momento se pueden clasificar en varios grupos:

- *Sensores basados en el empleo de hidrocarburos aromáticos.* Los hidrocarburos aromáticos policíclicos representan un grupo de compuestos cuya fluorescencia es eficazmente desactivada por el O_2 (Miller et al., 1943). De todos ellos, el pireno y, en menor extensión, el ácido pirenobutírico son quizás los más atractivos, debido a que presentan tiempos de vida de emisión superiores a 100 ns. El inconveniente de estos compuestos es que tanto las λ de excitación (340 nm) como las de emisión (390/440nm) requieren la utilización de lámparas que emitan en el UV y de fibras ópticas de cuarzo para evitar pérdidas de radiación.

Bergman desarrolló en 1968 (Bergman, 1968) un fluorosensor de O_2 que emplea un hidrocarburo aromático policíclico altamente fluorescente, el fluorantreno, inmovilizado en vidrio poroso (Vycor). Cuando el reactivo se excita con luz UV, emite radiación que resulta desactivada en un 63.5% al pasar de N_2 a O_2 . El empleo de polietileno y silicona como soportes del indicador hace que la desactivación dinámica de la emisión no resulte tan efectiva como en disolución. También se han utilizado como indicadores en la construcción de sensores de oxígeno, pireno, ácido pirenobutírico (Miller et al., 1943), benzoperileno (Kroneis et al., 1983), 9,10-difenilantraceno (Shah et al., 1988) y dibutirato de perileno (Fitzgerald, 1982; Peterson et al., 1983; Peterson et al., 1984).

En general, se ha observado que el empleo de soportes para inmovilizar el indicador hace que la desactivación dinámica de la luminiscencia no sea tan efectiva como lo es en disolución. Algunos sensores con fluoróforos inmovilizados en silicona han encontrado aplicación en la construcción de catéteres invasivos (Cardiovascular Devices; Gehrich et al., 1986; Miller et al., 1987), como transductores en la determinación de metabolitos (Lübbers et al., 1975; Völk et al., 1980; Lübbers et al.,

1983) en combinación con reacciones enzimáticas en las que participan oxidasas, oxigenasas, o indirectamente, deshidrogenasas.

Una aplicación interesante de los sensores de O_2 es la determinación simultánea de este gas y un anestésico, el halotano (Wolfbeis et al., 1985) cuya interferencia en el análisis de O_2 en sangre es bien conocida. El sistema de medida empleado está compuesto por dos fibras ópticas con dos terminales sensibles diferentes. En uno de ellos se dispone una capa de indicador sensible al halotano, decaciclono disuelto en silicona o una mezcla de ftalato de dioctilo y poliisopreno y, en el otro, se sitúa una fase reactiva similar pero recubierta con politetrafluoroetileno que actúa como barrera impermeable al halotano. El sensor permite la determinación de halotano, O_2 o ambos a la vez con una precisión del $\pm 5\%$ para halotano y $\pm 3.5\%$ para O_2 , y con límites de detección de 0.1% y 0.4%, respectivamente.

Otro tipo de optodos para la determinación de O_2 , descritos en la bibliografía, que emplean hidrocarburos aromáticos polinucleares, son aquéllos basados en la *transferencia de energía* desde una molécula "dadora" (cuya fluorescencia se desactiva eficazmente por el O_2) a una especie "aceptora" (que resulta menos desactivada por este analito). Sharma y col. (Sharma et al., 1988) han descrito un sensor, basado en este principio, en el que se utiliza pireno como dador y perileno como aceptor. La banda de emisión fluorescente del primero solapa con la banda de absorción del segundo, de forma que cuando el sistema se irradia a 320 nm, se observa una intensa fluorescencia a 476 nm, donde el pireno por sí mismo no absorbe. Los autores postulan la existencia de un *exciplexo* (complejo de transferencia de carga en el estado excitado) que se desactiva por el O_2 muy eficazmente. De esta forma, se ha desarrollado un sensor de fibra óptica que incorpora los dos fluoróforos en una matriz polimérica situada en el extremo de la fibra óptica. El intervalo de respuesta del sensor es de 0-150 Torr con una precisión de 0.5 a 3 Torr y el límite de detección es 0.5 Torr de O_2 .

• *Sensores que emplean complejos metálicos.* Otro importante grupo de indicadores, usados recientemente con gran éxito en la construcción de optodos de O_2 , son los complejos luminiscentes de Ru(II) con ligandos α -diimina tales como 2,2'-bipiridina, $Ru(bpy)_3^{2+}$; 1,10-fenantrolina, $Ru(phen)_3^{2+}$ y 4,7-difenil-1,10-

fenantrolina, $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$. Concretamente, estos compuestos presentan excelentes propiedades para su empleo como indicadores sensibles al O_2 (Kalyanasundaram, 1992) entre las que podemos citar: (1) tiempos de vida elevados en disolución (0.2 - 1 ms), lo cual permite la construcción de sensores basados en la medida de este parámetro; (2) longitudes de onda de excitación y emisión en el visible, lo cual permite el empleo de fibras ópticas de plástico y fuentes de radiación baratas; y (3) grandes desplazamientos de Stokes entre la excitación y la emisión.

Se han ensayado numerosos soportes para la inmovilización de dichos compuestos de cara a la construcción de sensores de fibra óptica para la determinación de O_2 . Normalmente, los indicadores se disuelven en una matriz polimérica que actúa, no sólo como "disolvente", sino también como una barrera impermeable a ciertas especies como cationes de metales pesados o ciertos aniones que pueden desactivar la luminiscencia de los complejos de Ru(II). Un factor a tener en cuenta en la construcción de las membranas sensibles al O_2 es la baja solubilidad de los complejos de Ru(II) en un polímero hidrófobo, de forma que en las membranas preparadas utilizando estos polímeros, al cabo de cierto tiempo, se observa una cristalización de las moléculas de indicador que pueden disponerse en la superficie polimérica formando finas láminas. Por ello, en la mayoría de las membranas construidas hasta el momento, el complejo se adsorbe en gel de sílice y, posteriormente, el conjunto se dispersa en silicona (Wolfbeis et al., 1986; Bacon et al., 1987; Lippistch et al., 1988; Wolfbeis et al., 1988; Moreno-Bondi et al., 1990; Carraway et al., 1991; Sacksteder et al., 1993; Huarui et al., 1995; Hartmann et al., 1995; Holst et al., 1995). Li y col. (Li et al., 1993) han demostrado que la intensidad de luminiscencia y el grado de desactivación de los complejos de Ru por el O_2 , depende de la concentración de los mismos presente en el polímero de silicona y que, tanto el procedimiento, como los disolventes empleados durante el proceso de inmovilización, resultan críticos a la hora de evaluar la respuesta del sensor.

Por otra parte, Meier y col. (Meier et al., 1995) han propuesto un método alternativo de inmovilización que consiste en la *encapsulación* de los complejos de Ru en *zeolitas* y su posterior dispersión en polímeros de silicona. Las membranas resultantes muestran unos tiempos de respuesta aceptables (entre 6 - 10 s), son

termoresistentes y presentan una *sensibilidad y estabilidad superior* si se comparan con las membranas preparadas a partir de gel de sílice.

Recientemente, algunos autores han descrito un procedimiento para la preparación de fases sensibles al O₂ que permite la disolución directa de complejos tipo Ru(bpy)₃²⁺, Ru(phen)₃²⁺, Ru(dip)₃²⁺ en cloruro de polivinilo (PVC) (Klimant et al., 1994), acetato de celulosa (McMurray et al., 1994) o silicona (Klimant et al., 1995). En los últimos dos casos se produce la formación de pares iónicos entre el complejo seleccionado y un anión de tipo orgánico como el *tributilfosfato*, o bien un anión que presente una larga cadena alifática (tipo *dodecilsulfato* o *trimetilsililpropanosulfonato*), y que son solubles en la matriz de silicona. La respuesta al O₂ sin embargo, sigue sin ser completamente lineal ya que además del luminóforo disuelto, aparecen agregados del mismo cuyo rendimiento cuántico de emisión es menor. Si comparamos la respuesta de estas membranas con las que incorporan gel de sílice como relleno, la intensidad de emisión obtenida es mayor debido a que la concentración de indicador presente en las mismas es superior como consecuencia de su mayor solubilidad. Por otra parte, presentan *tiempos de respuesta cortos* (1 s en fase gas y 40 s en fase acuosa) y *gran estabilidad a largo plazo* (varios meses cuando se almacenan en disolución acuosa).

Algunas de estas membranas se han aplicado a la construcción de biosensores, como el desarrollado por Preininger y col. (Preininger et al., 1994) para la determinación de la *demanda bioquímica de oxígeno* (DBO). El biosensor incorpora un microorganismo, *Trichosporon cutaneum*, inmovilizado en poli(vinilalcohol) y el complejo Ru(dip)₃²⁺ como transductor de O₂ atrapado en una película de PVC. Los valores de la DBO obtenidos con el biosensor resultaron comparables en los ensayos realizados por el método convencional.

Rosenzweig y col. (Rosenzweig et al., 1995) han construido un *microsensor* de fibra óptica para la determinación de O₂ tanto en fase gaseosa como en disolución. La fase sensible del optodo está constituida por el complejo Ru(dip)₃²⁺ atrapado en un polímero de acrilamida covalentemente enlazado al extremo de una fibra óptica por polimerización fotoinducida. El sensor es completamente reversible y requiere volúmenes de muestra tan pequeños como 100 fL. Asimismo, muestra una excelente

sensibilidad, con límites de detección absolutos de 10^{-17} moles de O_2 , lo cual mejora en un factor de 10^6 los valores obtenidos con los optodos existentes hasta la fecha.

Por otra parte, también se ha estudiado la posibilidad de incorporar los complejos de Ru(II) en matrices de vidrio, utilizando la técnica del sol-gel (Matsui et al., 1991). McCraith y col. (McCraith et al., 1993; O'Keeffe et al., 1995) han utilizado esta técnica de inmovilización para desarrollar sensores de fibra óptica basados en el empleo de $Ru(bpy)_3^{2+}$ y $Ru(dip)_3^{2+}$ y medidas de onda evanescente para la monitorización de O_2 . Para el desarrollo de estos sensores resulta crítico optimizar y controlar cuidadosamente los distintos parámetros que afectan al proceso de inmovilización, ya que éstos influyen notablemente en el tamaño de poro y, con él en, la respuesta del sensor al analito.

La presencia de oxígeno en el medio afectará no sólo a la intensidad de emisión de fluorescencia de un compuesto, sino también al tiempo de vida de su estado excitado. Los tiempos de vida relativamente largos de los complejos de Ru(II) hacen posible el empleo de la espectroscopía de emisión con resolución temporal para el análisis de oxígeno empleando sensores de fibra óptica. Se han utilizado membranas sensibles al O_2 que emplean silicona como soporte y $Ru(dip)_3^{2+}$ (Bacon et al., 1984; Li et al., 1993; Draxler et al., 1995) o $Ru(bpy)_3^{2+}$ (Lippitsch et al., 1988) como indicadores. Sin embargo, la heterogeneidad del microentorno del luminóforo inmovilizado, da lugar a la aparición de decaimientos de la emisión multiexponenciales y representaciones de Stern-Volmer curvadas hacia abajo. Para explicar estos resultados, Draxler y col. (Draxler et al., 1995) proponen un nuevo modelo que considera la interacción del indicador con el entorno no uniforme originado por las regiones vecinas del polímero.

Recientemente, se ha descrito el empleo de complejos neutros de platino del tipo $[Pt(L)(CN)_2]$ ($L= 4,7$ -difeníl- $1,10$ -fenantrolina ó $4,4'$ -di-*tert*-butil- $2,2'$ -bipiridina) para la construcción de sensores de oxígeno (Lee et al., 1993; Li et al., 1992). El espectro de emisión de estos compuestos en una membrana de silicona presenta un único máximo para bajas concentraciones de analito, apareciendo un segundo pico para elevadas concentraciones del mismo, debido a la formación de dímeros. Estas membranas son muy estables y no se observa degradación fotoquímica. Asimismo, Xu y col. (Xu et al., 1996) sugieren el empleo de complejos polipiridílicos de Os(II)

como indicadores sensibles al O₂, en lugar de los complejos de Ru(II). Aunque los primeros presentan tiempos de vida inferiores a los segundos, lo cual origina una menor sensibilidad al O₂ de los sensores correspondientes; sin embargo los complejos de Os(II) presentan bandas de absorción más desplazadas hacia el rojo con respecto a sus análogos de Ru(II), lo cual permite el empleo de láseres de diodo de alta potencia y bajo coste como fuentes de excitación. Además, los complejos de Os presentan una estabilidad fotoquímica superior.

Alternativamente, se han descrito en la bibliografía sensores luminiscentes para la determinación de O₂ basados en la desactivación de la *fosforescencia* a temperatura ambiente.

Zakharov y col. (Zakharov et al., 1989; Zakharov et al., 1990) han descrito el empleo de una serie de luminóforos (tripaflavinas, acrilflavinas y acridinas) inmovilizados sobre gel de sílice, celulosa o intercambiadores iónicos, para la construcción de sensores fosforescentes para O₂. Desafortunadamente, la mayoría de estos colorantes son fotolábiles y trazas de agua o amonio interfieren en su respuesta, desactivando de modo prácticamente total su fosforescencia. Para conseguir sensores de O₂ más sensibles basados en la desactivación de la fosforescencia de estos compuestos es necesario trabajar a temperaturas del orden de -70 °C o inferiores, lo cual es extremadamente tedioso y limita el campo de aplicación de estos dispositivos.

Díaz-García y col. (Díaz-García et al., 1995) han preparado un sensor fosforescente a temperatura ambiente que muestra una excelente sensibilidad para el O₂ en fase gaseosa, aunque su empleo en disolución acuosa está limitado por los largos tiempos de respuesta y la baja sensibilidad que presenta. Asimismo, se ha estudiado la posibilidad de utilizar complejos metálicos de Ferrón (Al(III), Ga(III), In(III), Nb(V) y Zr(IV)) y oxinatos de plomo para la construcción de sensores ópticos para O₂ (Pereiro-García et al., 1991; Liu et al., 1994), ya que estos compuestos emiten fosforescencia a temperatura ambiente cuando se inmovilizan sobre un soporte sólido o se estabilizan en medios organizados en disolución (micelas, vesículas).

El indicador fosforescente Eritrosina B, ha sido utilizado por algunos autores como material sensible al O₂ (Badía et al., 1995). Las fases sensoras, constituidas por el indicador inmovilizado covalentemente sobre una resina funcionalizada con grupos

amino, han resultado particularmente adecuadas para la determinación de O₂ en fase gaseosa y a concentraciones muy bajas. El sensor presenta un límite de detección de 0.6 ppm, uno de los más bajos descritos hasta la fecha.

Las metaloporfirinas (concretamente Pt y Pd-porfirinas) también se han utilizado con éxito en la construcción de sensores para O₂ (Papkovsky et al., 1991; Papkovsky et al., 1995; Hartman et al., 1996) que, a su vez, se han aplicado como transductores en la construcción de biosensores (Papkovsky et al., 1991; Papkovsky et al., 1993; Papkovsky, 1995b). Los complejos de Pt-porfirina presentan largos tiempos de vida de fosforescencia y grandes separaciones entre las longitudes de onda de excitación y emisión máximas (más de 100 nm). Por otra parte, no se observa fluorescencia en la región del espectro VIS-NIR, por lo que se hace más sencilla la monitorización de la señal fosforescente.

c) Sensores quimioluminiscentes.

Freeman y col. (Freeman et al., 1981) han desarrollado un sensor basado en la quimioluminiscencia originada por la oxidación de los **tetraaminoetilenos** que carecen de grupos aromáticos, la cual es directamente proporcional a la presión parcial de O₂. En el dispositivo empleado para las determinaciones, la señal analítica se obtiene al difundir el O₂ a través de una membrana de teflón y reaccionar con el reactivo quimioluminiscente, una solución al 10% en hexano de la 1,1',3,3'-tetraetil-2,2'-biimidazolina. El límite de detección para O₂ en fase gaseosa es de 1 ppm y los tiempos de respuesta son del orden de 10 - 20 s.

Otros sensores quimioluminiscentes hacen uso del reactivo luminol, el cual se ha inmovilizado en un hidrogel como paso previo a la construcción de un sensor para la determinación de O₂ y NO₂ (Collins et al., 1995). El sensor es capaz de detectar niveles de O₂ de hasta 2.4 ppm.

En resumen, los últimos avances realizados en el diseño de nuevos sensores de fibra óptica para O₂ permiten obtener las siguientes conclusiones:

1. Los complejos de Ru(II), especialmente el Ru(dip)₃²⁺ han demostrado ser los mejores indicadores para la monitorización de este analito, debido a sus bandas intensas de **absorción y emisión en el visible, largos tiempos de vida y elevada**

constante de Stern-Volmer para la desactivación del estado excitado por el O₂. Finalmente, presentan elevada fotoestabilidad.

2. La *silicona* es el polímero más adecuado para la obtención de las membranas sensibles, debido a su elevada permeabilidad y solubilidad al analito, así como su estabilidad físico-química y su biocompatibilidad.

3. El proceso de *desactivación bimolecular* entre el estado excitado del indicador y el O₂ es esencialmente *dinámico* tanto en presencia como en ausencia de material de relleno sobre el que se adsorbe el indicador.

4. La *sensibilidad* de las membranas depende de la *composición* exacta y *forma de preparación* de las fases sensibles obtenidas con el mismo indicador y soporte polimérico.

5. El *mecanismo* exacto de la *desactivación* de los compuestos de coordinación de Ru(II) por el O₂ molecular no se conoce con precisión.

El trabajo realizado en esta Tesis Doctoral en sensores de fibra óptica para O₂ se ha centrado, a la vista de los resultados recogidos en la bibliografía, en los siguientes puntos:

a) Estudio sistemático del efecto del *material de relleno* adicionado a la *silicona*, sobre las características fotofísicas del indicador y su desactivación bimolecular por el O₂. Existe una gran disparidad en los diferentes trabajos publicados sobre el tema, respecto a la composición de las membranas y el papel jugado por los distintos componentes en la sensibilidad final al O₂.

b) Estudio del *mecanismo de desactivación* del complejo con el O₂ en medio (micro)heterogéneo estableciendo una correlación con su comportamiento en medio homogéneo.

c) Obtención de un *sensor de fibra óptica* para O₂ para la realización de medidas, tanto en fase gaseosa como en medio acuoso, que sea *estable, robusto, sensible y de respuesta rápida* para su aplicación a muestras reales, donde los electrodos de O₂ plantean problemas.

3.2.3. DETERMINACIÓN DE O₂ MEDIANTE UN SENSOR BASADO EN MEDIDAS DE LUMINISCENCIA.

3.2.3.1. Preparación de la fase sensora.

a) Propiedades espectroscópicas del Ru(dip)₃²⁺ en disolución.

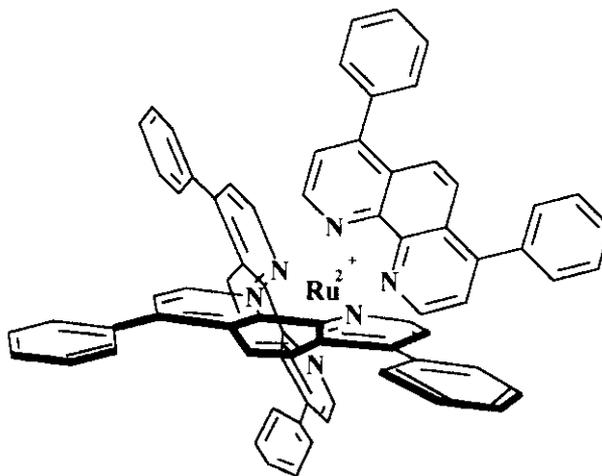


FIGURA 44. Estructura tridimensional del complejo Ru(dip)₃²⁺.

El complejo tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), abreviadamente Ru(dip)₃²⁺, posee unas características muy adecuadas para su utilización como indicador en la construcción de optodos de O₂. Entre ellas podemos citar las siguientes: (1) un elevado tiempo de vida del estado excitado (5 μs); (2) una constante de desactivación bimolecular por el O₂ elevada ($k_q = 2.4 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Bacon et al., 1987); y (3) una mayor hidrofobicidad que otros complejos de Ru utilizados como indicadores en sensores de O₂ (Carraway et al., 1991). Todo ello, hace que sea uno de los complejos polipiridílicos de Ru(II) más empleados en la construcción de sensores de O₂.

En la Figura 45 se muestran los espectros de excitación y emisión, sin corregir, de una disolución de Ru(dip)₃²⁺ 10⁻⁵ M en cloroformo, equilibrada al aire y a temperatura ambiente.

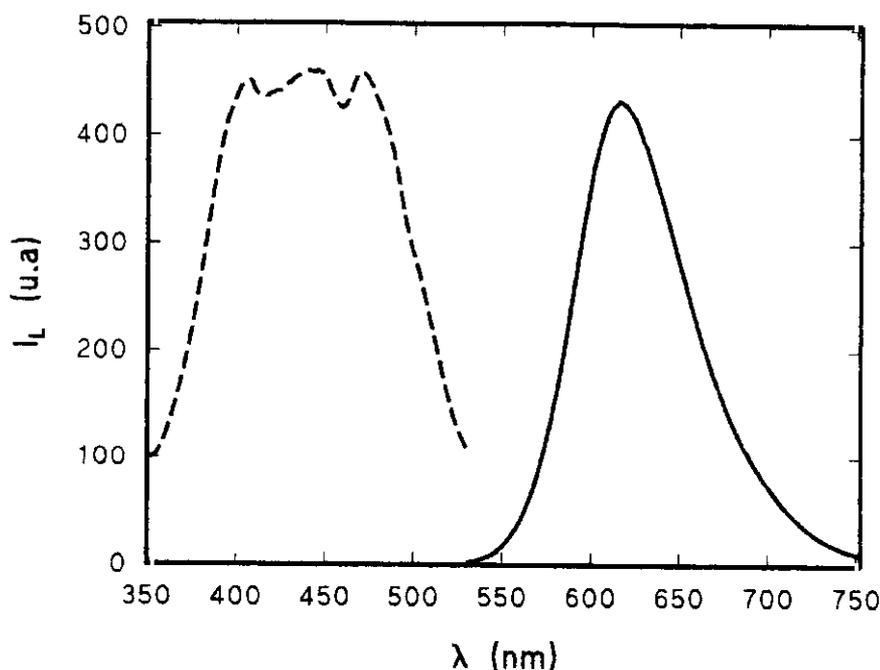


FIGURA 45. Espectros de excitación ($\lambda_{em} = 620$ nm) y de emisión ($\lambda_{exc} = 460$ nm, filtro en emisión a 530 nm) del $Ru(dip)_3^{2+}$ en cloroformo, equilibrado al aire.

b) Elección del soporte polimérico para la inmovilización del indicador.

Se estudiaron distintos tipos de materiales de relleno para inmovilizar el indicador (*gel de sílice, gel de sílice modificada C₁₈ y CPG*), con el fin de comprobar cual de ellos permitía obtener membranas que presentasen una mayor sensibilidad e intervalo de respuesta frente al analito. Los soportes con el indicador inmovilizado se se dispersan en silicona, extendiéndose posteriormente hasta obtener membranas de espesor definido. Este polímero ha demostrado ser uno de los más adecuados para la construcción de sensores de O₂, como se mencionó en el apartado 3.2.2.4, gracias a su elevada *permeabilidad y solubilidad* a este gas (Wolfbeis, 1991), así como a sus excelentes propiedades *ópticas y mecánicas*, que permiten preparar con él membranas muy finas y resistentes. Sin embargo, las siliconas comerciales incorporan en su formulación *gel de sílice* como carga para favorecer su curado y resistencia. Diversos autores han observado (Klimant et al., 1992), que la presencia de *gel de sílice* tiene un efecto muy importante sobre la *sensibilidad* frente al O₂ de las membranas obtenidas con complejos metálicos. Por tanto, resulta muy importante para la construcción del optodo, conocer exactamente la cantidad de carga adicionada al polímero, desestimándose, por esta razón, el empleo de siliconas comerciales, para la construcción de los sensores, ya que la cantidad de carga adicionada en sus

formulaciones es un secreto de patente. Todo ello nos ha llevado a utilizar una silicona no comercial, sin carga de gel de sílice, preparada especialmente para este fin.

La Figura 46 muestra los espectros de emisión (sin corregir), correspondientes al $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ inmovilizado en los distintos soportes y disperso el conjunto en silicona.

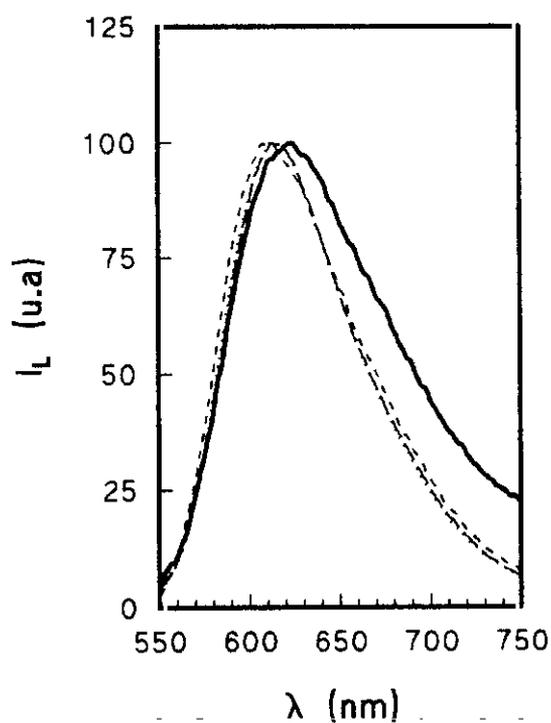


FIGURA 46. Espectros de emisión normalizados, (sin corregir por la respuesta instrumental y corregidos por el blanco) de las membranas de silicona que contienen $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ adsorbido en: silicona libre de gel de sílice (—), CPG (· · ·), gel de sílice C_{18} (---), gel de sílice (— · —) ($\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$). T = 20 °C.

La emisión luminiscente de los complejos polipiridílicos de Ru(II) puede verse afectada significativamente por los cambios producidos en la polaridad del microentorno y/o el carácter dador/aceptor del medio. Este hecho se debe a importantes variaciones producidas en la distribución electrónica de carga de los mismos tras la excitación (Carraway et al., 1991). Sin embargo, y a pesar de todos los factores mencionados anteriormente, la luminiscencia del $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ es poco sensible a la naturaleza del soporte utilizado en la inmovilización (ver Figura 46). Este hecho se debe a la presencia en la molécula del complejo de 6 anillos de fenilo que ejercen un efecto de pantalla sobre el luminóforo, protegiéndole de las posibles perturbaciones del microentorno (Carraway et al., 1991).

Los calibrados de Stern-Volmer correspondientes a las membranas sensibles de $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ construidas en presencia de los distintos soportes son los que aparecen en la Figura 47.

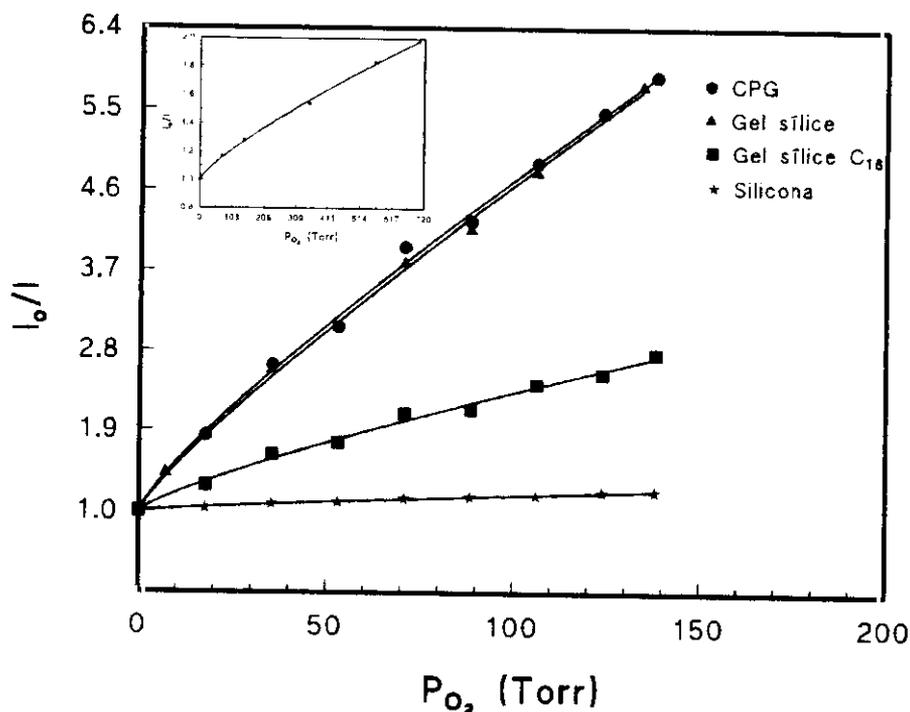


FIGURA 47. Calibrados de Stern-Volmer de membranas sensibles al O_2 preparadas a partir de $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ adsorbido en diferentes soportes y disperso en silicona ($\lambda_{\text{exc}} = 460 \text{ nm}$, λ_{em} al máximo de emisión correspondiente; relación indicador/soporte 1:375 p/p; relación soporte/silicona 1:4 p/p). CPG (●), gel de sílice (▲), gel de sílice C₁₈ (■), silicona sin soporte (★). Figura insertada: Calibrado de O_2 correspondiente a la membrana de silicona sin soporte, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0 - 100% O_2 . T = 20 °C.

Para la misma cantidad de indicador inmovilizado (indicador/soporte 1:375 (p/p), el comportamiento de las distintas membranas en su respuesta hacia el O_2 se correlaciona bien con la naturaleza y polaridad del soporte sólido, obteniéndose la mayor sensibilidad hacia el analito para las membranas construidas a partir de gel de sílice y CPG. Este fenómeno refuerza la idea, descrita por otros autores (Carraway et al., 1991), de que la desactivación de la emisión luminiscente por el O_2 molecular ocurre fundamentalmente por la difusión del gas hacia la superficie del soporte sólido (al menos en aquellos sólidos porosos que adsorben O_2 y otros gases); por tanto, cuanto mayor es el número de grupos polares presentes en el mismo (gel de sílice > CPG > C₁₈ > silicona), mayor es su afinidad por el O_2 y mayor es la eficacia del proceso de desactivación.

Cuando la adsorción de O_2 por parte del soporte sólido es pequeña o nula (caso de las membranas de gel de sílice C_{18} y silicona sin soporte), la sensibilidad de la membrana indicadora hacia el analito se ve reducida de forma drástica (Figura 47). En consecuencia, tanto la gel de sílice modificada C_{18} , como la silicona sin carga resultan soportes poco adecuados para la inmovilización del complejo y su posterior aplicación al desarrollo de membranas sensibles al O_2 .

Xu y col. (Xu et al., 1994) han demostrado recientemente que es posible obtener una elevada respuesta hacia el O_2 inmovilizando el complejo $Ru(dip)_3^{2+}$ en una matriz de poli(dimetilsiloxano) sin carga de gel de sílice (con cocientes de I_0/I de 10 para una $P_{O_2} = 140$ Torr). Nuestros resultados no son comparables con los obtenidos por estos autores, lo cual se debe, fundamentalmente, al diferente procedimiento utilizado en la preparación de las membranas. En su caso, se procede en primer lugar al curado de las membranas (con y sin carga) y a la posterior adsorción del complejo a partir de una disolución en cloruro de metileno. De esta forma, la cantidad de complejo inmovilizado es considerablemente menor que la obtenida con nuestro procedimiento, que consiste en dispersar por completo el indicador en la silicona antes de proceder al curado de la membrana. La mayor concentración de indicador en la membrana da lugar a la existencia de una mayor cantidad de complejo (ya sea adsorbido o precipitado) que no es accesible al O_2 , cuya luminiscencia no es desactivada por el analito. Asimismo, al aumentar la cantidad de complejo inmovilizado aumentará la probabilidad de que se produzca la autodesactivación de la luminiscencia del $Ru(dip)_3^{2+}$ por *transferencia de energía*. Ambos factores dan lugar a una disminución en la sensibilidad de la respuesta hacia el O_2 .

Por otra parte, en los calibrados de Stern-Volmer obtenidos con las distintas membranas (Figura 47) se observa, en todos los casos, una desviación de la linealidad, incluso para la membrana preparada a partir de silicona en ausencia de soporte sólido (ver inset Figura 47). Este hecho, observado por otros autores, (Sacksteder et al., 1993; Xu et al., 1994; Hartman et al., 1995) se atribuye a la naturaleza microheterogénea del medio en el que se encuentra el luminóforo, de forma que moléculas de $Ru(dip)_3^{2+}$ inmovilizadas en *posiciones no equivalentes* muestran distinta *accesibilidad* al O_2 , con lo que la constante de Stern-Volmer resultante será el

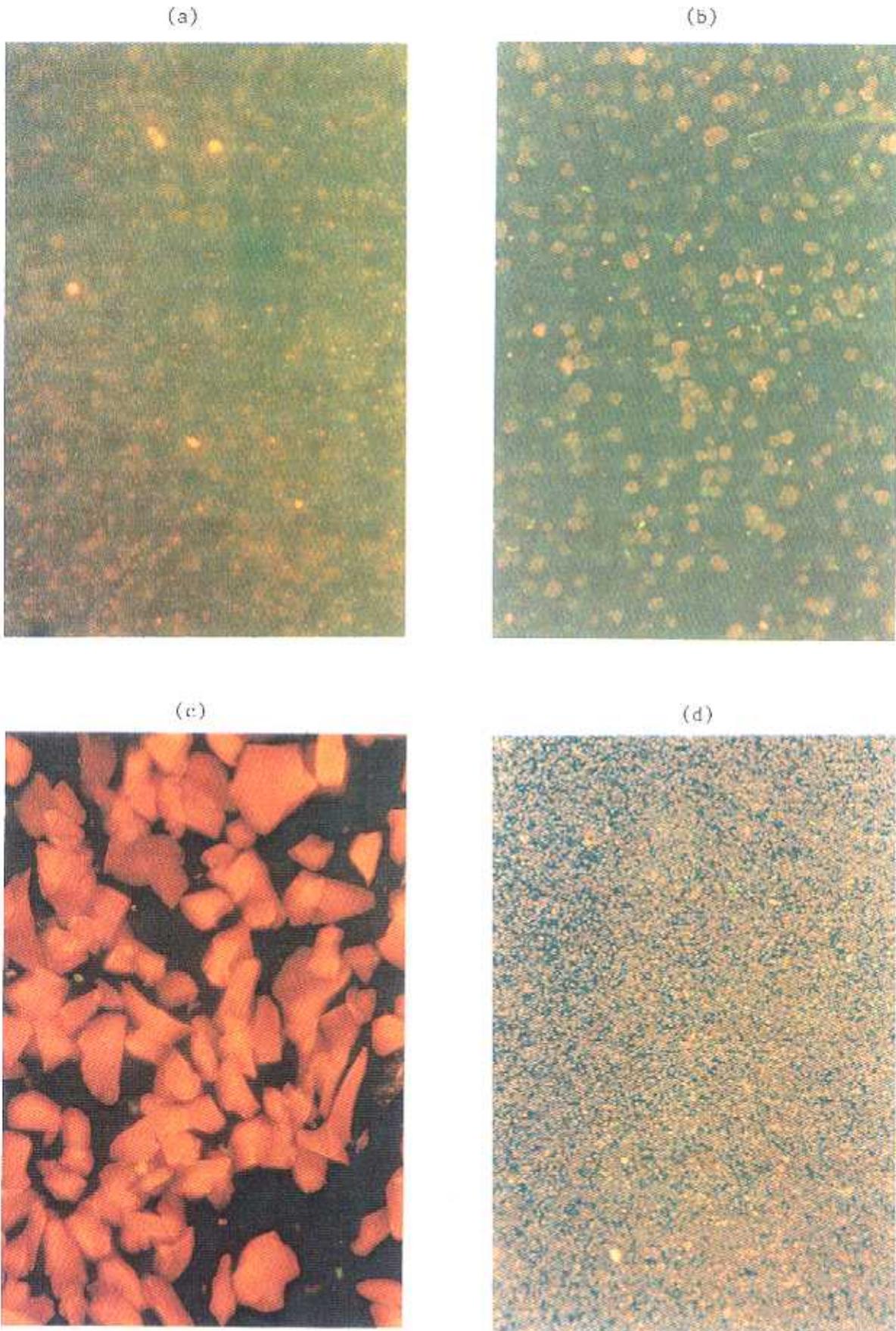


FIGURA 48. Microscopia de fluorescencia del Ru(dip)₃²⁺ inmovilizado en (a) sílica (40 aumentos). (b) gel de sílice C₁₈ (10 aumentos); (c) CPG (10 aumentos) y (d) gel de sílice (10 aumentos).



promedio ponderado de las distintas constantes obtenidas en cada caso (Demas et al., 1981). Este efecto se comprueba a partir del estudio del tiempo de vida de emisión del complejo inmovilizado, ya que en todas las ocasiones se han obtenido decaimientos multiexponenciales que son el reflejo de la existencia de moléculas de complejo en distintos entornos.

El análisis mediante microscopía de fluorescencia de las distintas membranas, nos ha proporcionado datos reveladores acerca de la *homogeneidad* de las mismas, así como de la posible *crystalización* o *agregación* del indicador, cuando éste se inmovilizó directamente en sílice. Así, a partir de estos estudios se concluye (véase Figura 48) que las membranas preparadas en presencia de gel de sílice, a pesar de su heterogeneidad, resultan más uniformes que las obtenidas con CPG, debido al menor tamaño de partícula. Por otra parte, se comprueba la existencia de agregados en la membrana de $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ inmovilizado directamente en la sílice en ausencia de soporte, lo cual explicaría la curvatura del calibrado de Stern-Volmer y la pequeña respuesta hacia el O_2 (Xu et al., 1994). Asimismo, un cierto desorden espacial en la estructura del polímero podría contribuir a este efecto (Hartmann et al., 1995).

3.2.4. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE INMOVILIZACIÓN EN GEL DE SÍLICE.

3.2.4.1. Efecto de la cantidad de indicador inmovilizado.

Para estudiar el efecto de la concentración de indicador sobre la respuesta del sensor, se prepararon membranas con una cantidad constante de gel de sílice (75 mg), y se varió la cantidad de complejo inmovilizado sobre la misma (Figura 49).

El incremento de la sensibilidad del optodo, al aumentar la cantidad de indicador presente en las membranas, puede explicarse considerando principalmente dos efectos:

1) La existencia de cierta contribución de procesos de *desactivación estática* de la luminiscencia, al aumentar la cantidad de complejo inmovilizado en la gel de sílice para la misma concentración de O_2 (véase esquema 6).

2) Puede ocurrir que las *posiciones menos accesibles* al O_2 sean las primeras en ocuparse por el complejo, debido a su distinta hidrofobicidad. De acuerdo con esto,

la sensibilidad al O_2 sería inferior a menor concentración de $Ru(dip)_3^{2+}$ inmovilizado, lo que explicaría la menor respuesta obtenida con estas membranas.

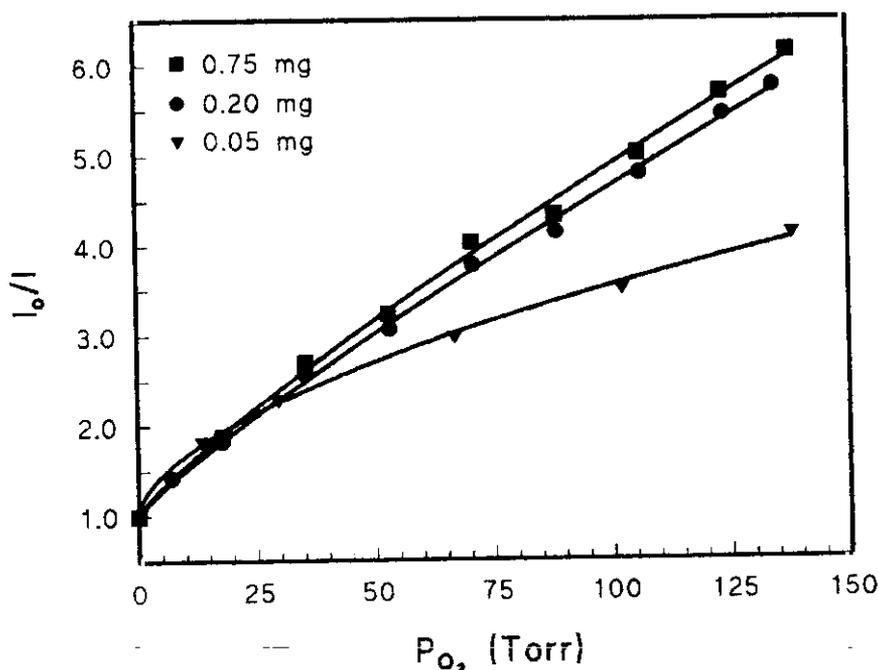
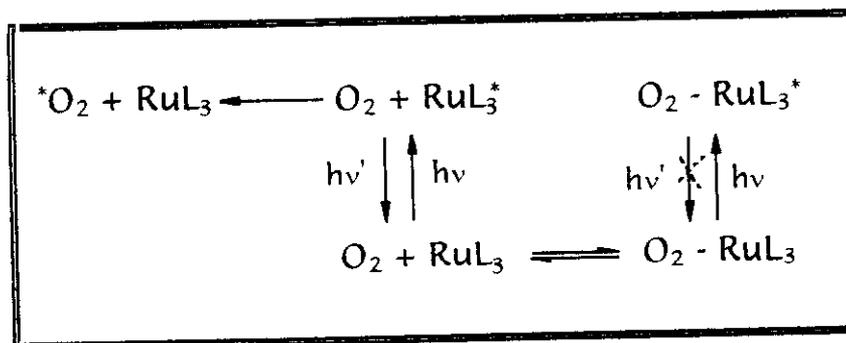


FIGURA 49. Efecto de la cantidad de $Ru(dip)_3^{2+}$ inmovilizado en 75 mg de gel de sílice, sobre la respuesta del sensor al O_2 . ($\lambda_{exc} = 460$ nm, $\lambda_{em} = 613$ nm; relación gel de sílice/silicona 1:4): 0.75 mg (■), 0.20 mg (●), 0.05 mg (◆). $T = 20$ °C



ESQUEMA 6. Desactivación de la luminiscencia de un complejo de tipo RuL_3 por el O_2 .

3.2.4.2. Efecto de la cantidad de gel de sílice presente en la membrana.

Se prepararon distintas membranas sensibles, manteniendo constante la proporción indicador/gel de sílice (1:375 p/p) y variando la cantidad de gel de sílice incorporada a la silicona.

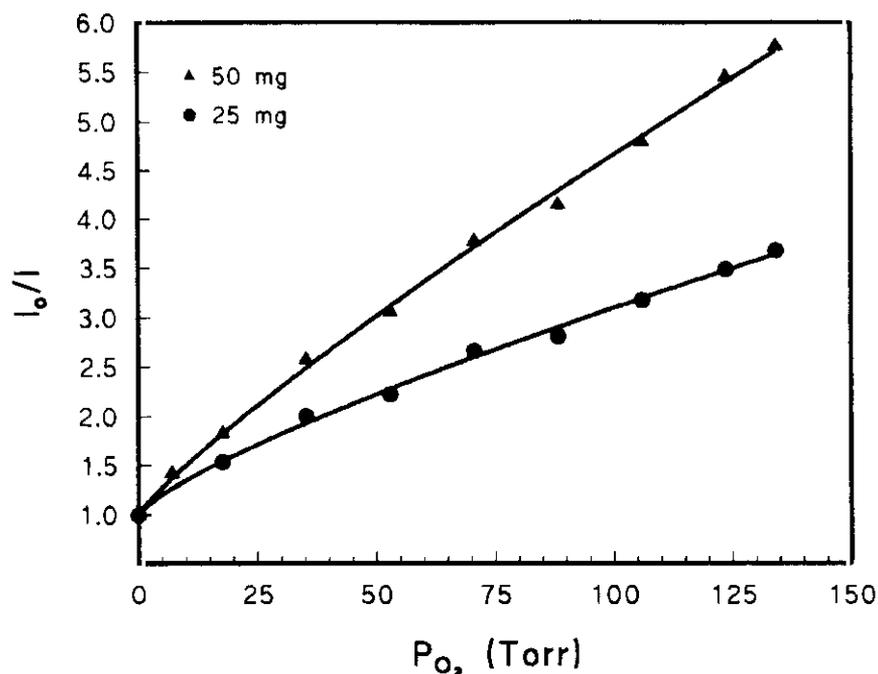


FIGURA 50. Efecto de la cantidad de gel de sílice presente en la membrana, sobre la respuesta del sensor de O_2 ($\lambda_{exc}= 460$ nm, $\lambda_{em}= 613$ nm) a una relación constante indicador/gel de sílice (1:375, p/p) y a una relación variable de gel de sílice/silicona: 50 mg/0.2 g (▲), 25 mg/0.2 g (●). $T = 20$ °C

Como se observa en la Figura 50, un aumento de la cantidad de gel de sílice presente en la membrana origina un incremento de la sensibilidad de ésta frente al analito, ya que aumenta la cantidad de O_2 que puede ser adsorbido por el soporte. Por tanto, ésta es una variable que debe ser controlada con sumo cuidado.

El proceso de desactivación de los complejos de Ru(II) por el O_2 , se ha demostrado que se produce entre partículas coadsorbidas (Demas et al., 1981). Al aumentar la cantidad de gel de sílice presente en la membrana aumentará, por tanto, la cantidad de O_2 adsorbida por la misma, si bien el volumen de este gas adsorbido por gramo de adsorbente será el mismo para una presión parcial y una temperatura determinadas. Según esto, la velocidad del proceso de desactivación sería la misma independientemente del contenido en gel de sílice presente en la membrana, puesto que en todos los casos la relación gel de sílice/indicador se ha mantenido constante.

No obstante, si la velocidad del proceso de adsorción/desorción es mayor que la velocidad de desactivación del estado excitado del complejo de Ru, cabría la posibilidad de que el O_2 migrara de una partícula a otra aumentando, en un momento dado, la

concentración efectiva del analito, lo cual se traduciría en un aumento de la eficacia de desactivación.

3.2.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

3.2.5.1. Calibrado. Ecuación de ajuste.

Como resultado de la falta de linealidad observada en los calibrados de Stern-Volmer obtenidos con las membranas en presencia de gel de sílice (véase Figuras 49 y 50), se procedió a la búsqueda de un modelo matemático que fuera capaz de predecir la respuesta del sensor hacia el O₂.

En la bibliografía han aparecido numerosas ecuaciones de ajuste para los optodos de O₂; sin embargo Carraway y col. (*Carraway et al., 1991b*) concluyen, a partir de experimentos realizados con complejos polipiridílicos de Ru adsorbidos en gel de sílice, que el modelo que mejor predice la respuesta del sensor es el que considera únicamente la *desactivación dinámica de la luminiscencia* por el O₂ adsorbido. En este modelo no se tiene en cuenta ni la contribución de la posible desactivación estática de la luminiscencia, ni las colisiones con las moléculas de O₂ en fase gaseosa.

Se obtiene un buen ajuste de los datos experimentales correspondientes a los calibrados mostrados en las Figuras 49 y 50 si se utiliza como modelo una isoterma de adsorción de Freundlich para calcular la concentración de O₂ adsorbido en la superficie del soporte (40).

$$I_0/I = 1 + K_{sv}[O_2]_{ads} = 1 + K_{sv} [O_2]_{adsM} \alpha P^{1/n} = 1 + m P^{1/n} \quad (40)$$

donde $[O_2]_{adsM}$ es la máxima concentración de analito presente en la superficie del soporte (presumiblemente una monocapa) para una temperatura y tipo de gel de sílice determinada, P es la presión de equilibrio en fase gaseosa, α engloba a una serie de constantes, n es un parámetro empírico relacionado con la magnitud del proceso de adsorción de O₂ y K_{sv} es la constante de Stern-Volmer. En la TABLA XIV se recogen los valores de los parámetros obtenidos tras el ajuste de los datos experimentales correspondientes a los calibrados de las Figuras 49 y 50 (en función de la cantidad de indicador y de gel de sílice presentes en la membrana sensible) a una ecuación de tipo (40).

TABLA XIV. PARÁMETROS DE AJUSTE A LA ISOTERMA DE ADSORCIÓN DE FREUNDLICH (ecuación 40) DE LOS DATOS EXPERIMENTALES OBTENIDOS CON EL SENSOR DE O₂. (Figuras 49 y 50).

| Indicador/Gel de sílice, (p/p) | Gel de sílice, mg ^b | m, Torr | 1/n | r |
|--------------------------------|--------------------------------|---------|------|-------|
| 1:375 | 25 | 0.06 | 0.78 | 0.998 |
| 1:375 | 50 | 0.07 | 0.86 | 0.999 |
| 1:100 | 50 | 0.08 | 0.84 | 0.999 |
| 1:1500 | 50 | 0.18 | 0.58 | 0.999 |

^b Disperso en 0.2 g de sílica.

3.2.5.2. Precisión y límite de detección.

Para evaluar la *precisión* del sistema se seleccionó una membrana con la siguiente composición: relación indicador/gel de sílice 1:375 (p/p) y gel de sílice/silicona 1:2.6 (p/p). La precisión se calcula en términos de la desviación estándar relativa para 5 determinaciones análogas de muestras empleadas en el calibrado con gases con un contenido en O₂ de 10, 55 y 70%, obteniéndose valores de 0.9, 1.1 y 3.0 %, respectivamente.

El *límite de detección* se calculó a partir de 10 determinaciones del cociente I_o/I correspondiente al blanco, en este caso Ar puro, y aplicando el criterio recomendado por la IUPAC (Winefordner, 1983), tomando como I_o la media de 10 determinaciones del blanco y como I, 10 lecturas diferentes del mismo, obteniéndose un valor para el límite de detección que corresponde a 0.3 Torr de O₂.

3.2.6. APLICACIÓN ANALÍTICA.

3.2.6.1. Determinación de O₂ en un proceso de fermentación aerobia.

La determinación del O₂ consumido durante un proceso de *fermentación láctica* tiene un elevado interés, ya que este parámetro se encuentra directamente relacionado con el crecimiento bacteriano producido en el medio y, por consiguiente, puede ser una indicación del deterioro de la leche. El crecimiento de dichas colonias provoca el deterioro de la leche por la acumulación de ácido láctico, en el caso de haber sido mantenida a temperatura ambiente, y por la acción de las proteasas y

lipasas extracelulares producidas por las bacterias tolerantes al frío (psicotrofas), si ha sido refrigerada. Considerando la gran complejidad de una muestra como la leche, en la que se producen innumerables reacciones secundarias, que dan origen a múltiples subproductos de reacción durante el proceso de fermentación, se optó por iniciar los estudios empleando un medio de cultivo menos complejo, constituido por las bacterias *Pseudomonas Fluorescens*.

Para realizar las medidas se ha empleado un espectrofotómetro portátil de fibra óptica, que dispone de una sonda en cuyo extremo se sitúa un terminal roscado que contiene la membrana sensible al O₂. Este equipo dispone de una lámpara de tungsteno-halógeno que emite radiación de forma continua, lo cual podría suponer un serio inconveniente para mediciones a tiempos largos (días), ya que aumenta la posibilidad de fotodescomposición del indicador y por tanto limitando la aplicación del optodo a aquellas situaciones que no requieran períodos de medida muy prolongados. Para superar esta limitación, se adaptó un "cortador de haz" en el canal de excitación del equipo que permitía reducir considerablemente el tiempo de iluminación del reactivo inmovilizado.

a) Calibrado en disolución.

Con objeto de calibrar el sensor de O₂, para ser utilizado posteriormente en las medidas en un fermentador piloto, se procedió a diseñar una mini-cuba en la que se reproducen las condiciones de medida del sistema real (Figura 51).

La membrana de O₂ seleccionada para realizar los experimentos responde a la siguiente composición: relación indicador/gel de sílice 1:375 (p/p) y gel de sílice/silicona 1:2.6 (p/p). Dicha membrana se introduce en una pieza tubular de acero inoxidable que posteriormente se acopla al terminal roscado de la fibra óptica. De esta forma, el optodo se sumerge en el interior de la mini-cuba que contiene un medio de cultivo cuya composición se detalla en la TABLA XV y que se encuentra termostatizada a 7 °C, la misma temperatura utilizada posteriormente en el sistema real. En esta disolución se burbujan de forma continua hasta el equilibrio, mezclas de gases con distinto contenido en O₂ (0 - 20%). A continuación se registran los espectros de emisión del complejo Ru(dip)₃²⁺ inmovilizado en la membrana, tomándose como referencia (I_R) la señal obtenida a $\lambda = 480$ nm, que es independiente de la

concentración de analito en el medio, para compensar la posible deriva de la lámpara. En la Figura 52 se ha representado el cociente $(I_0/I_R)/(I/I_R)$ en función del porcentaje de O_2 en mezclas O_2/Ar , burbujeado en la disolución ($P_T = 713.20$ Torr). Los datos experimentales se ajustan a una ecuación del tipo $(I_0/I_R)/(I/I_R) = 1 + m[O_2]^b$, como ya mencionamos en el apartado 3.2.5.1. El valor de I_0 correspondiente a la señal en ausencia del analito, se obtuvo sumergiendo el terminal sensible en una disolución saturada de sulfito sódico.

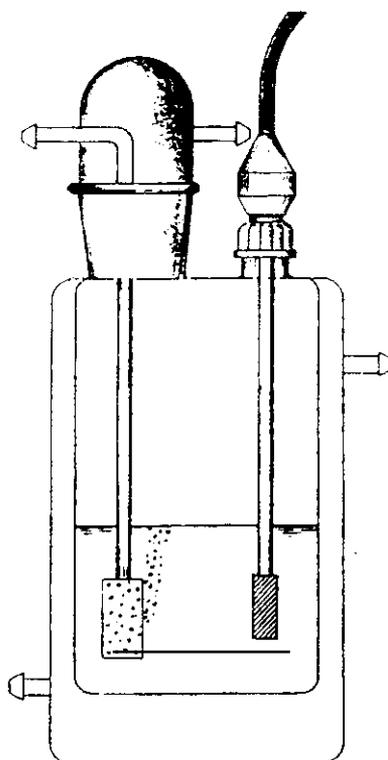


FIGURA 51. Mini-cuba empleada para el calibrado del optodo de O_2 en disolución acuosa.

TABLA XV. COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO EMPLEADO PARA CALIBRAR EL OPTODO DE O_2 .

| | | |
|----------------|----------|----------|
| $MgSO_4$ | 0.2 g/L | |
| NH_4Cl | 0.65 g/L | |
| K_2HPO_4 | 0.86 g/L | |
| $CaCl_2$ | 1% | pH = 7.0 |
| Ácido pirúvico | 11 g/L | |
| Tampón BES | 10.7 g/L | |

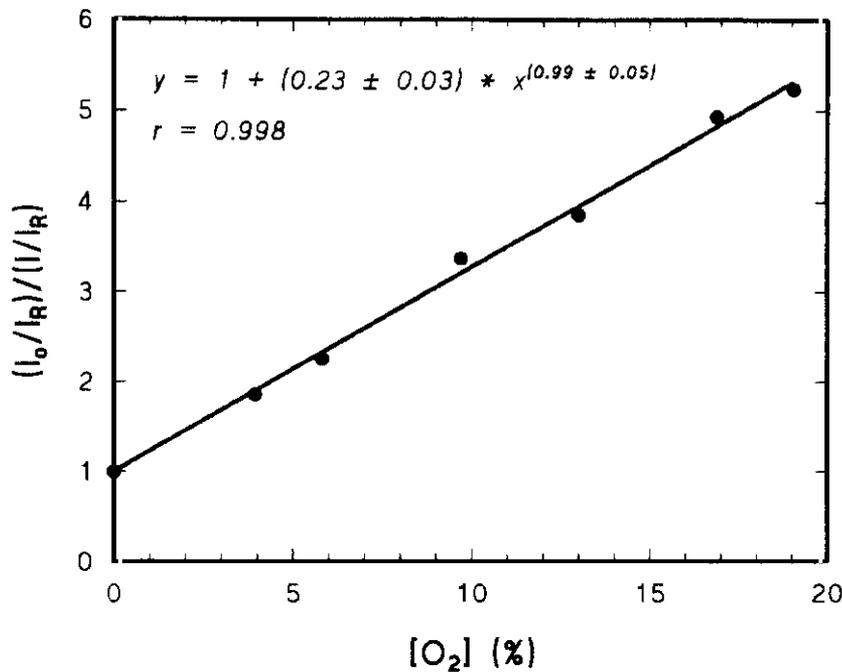


FIGURA 52. Calibrado del sensor de O₂ realizado en una mini-cuba que contiene el medio de cultivo (filtro de banda ancha 400 nm, filtro de corte en emisión 475 nm, P_T = 713.20 Torr, T = 7 °C). El ajuste de los datos experimentales responde a una ecuación del tipo: $(I_0/I_R)/(I/I_0) = 1 + m[O_2]^b$

b) Medidas en un fermentador piloto.

Una vez calibrado, el optodo para la monitorización de O₂, se esterilizó con una corriente de óxido nítrico introduciéndose, a continuación, en una cuba de fermentación de 2 litros de capacidad, a través de un puerto de acero provisto de una junta tórica. El fermentador se rellenó con un cultivo de bacterias *Pseudomonas Fluorescens* en el medio indicado en la TABLA XV. Durante todo el proceso de medida, la temperatura del fermentador se mantuvo a 7 °C. La cuba lleva incorporado un electrodo de Clark comercial que permite medir la variación de la concentración de O₂ en la disolución durante el proceso de fermentación. A medida que progresa el crecimiento de la colonia de bacterias, se produce una disminución de la concentración de O₂ en el medio, como se puede apreciar en la Figura 53, donde se representan las respuestas obtenidas con ambos sensores (electroquímico y óptico) durante un período de incubación de 72 horas.

En la Figura 54 se ha representado la recta de regresión obtenida al comparar las respuestas proporcionadas por el electrodo de Clark y el sensor de fibra óptica entre las 24 y las 72 horas de incubación. La ecuación de la recta es: $y = (0.90 \pm 0.1) x + (0.1 \pm 0.3)$; $r = 0.998$, lo cual indica que la pendiente y la ordenada en el origen no

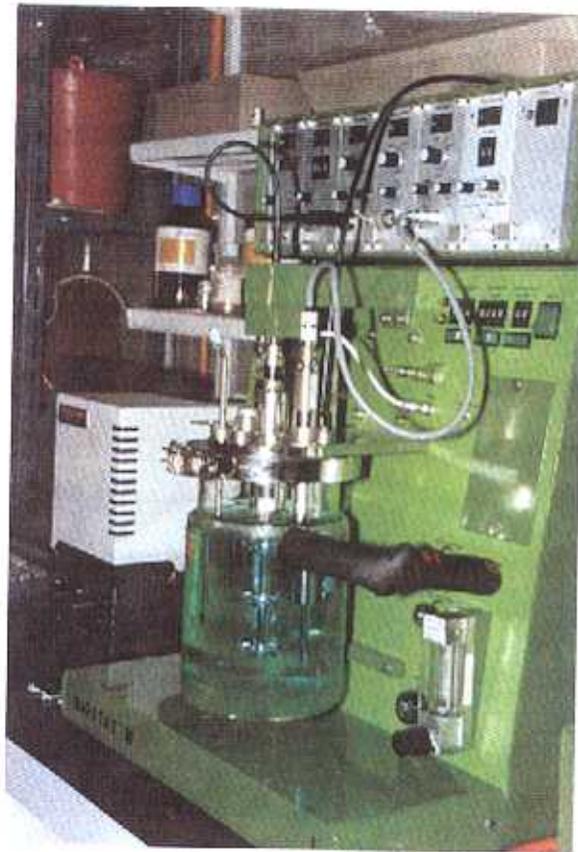


FIGURA 55. Detalle de la cuba de fermentación y del dispositivo de medida.

difieren significativamente, a un nivel de probabilidad del 95%, de los valores "ideales" de 1 y 0, respectivamente. Por tanto, no existen diferencias significativas entre ambos métodos.

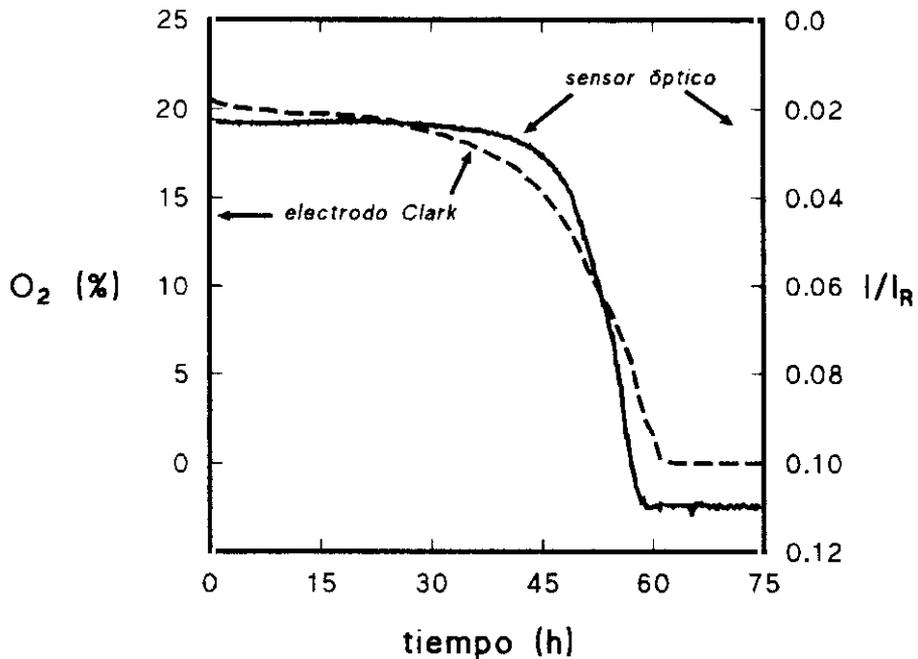


FIGURA 53. Respuesta del electrodo de Clark y del sensor de fibra óptica sumergidos en un cultivo de bacterias *Pseudomonas Fluorescens*, en la cuba de fermentación en función del tiempo de incubación, $T = 7^{\circ}\text{C}$.

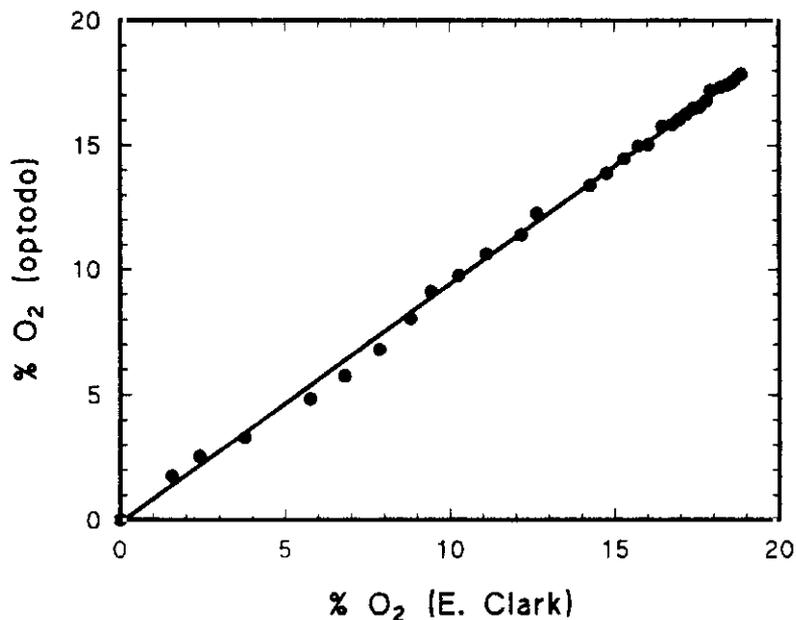


FIGURA 54. Comparación de las respuestas del electrodo de Clark y del sensor de fibra óptica a la variación del contenido en O₂ en el fermentador durante un período de incubación de 75 horas. La línea que une los puntos corresponde a la recta de ajuste por mínimos cuadrados.

3.2.6.2. Monitorización del nivel de O_2 disuelto en el proceso de tratamiento biológico de una estación depuradora de aguas residuales (E.D.A.R.).

Los procesos de tratamiento biológico de una EDAR suponen la *degradación o metabolización* de la *materia orgánica* presente en el agua residual mediante la actuación de microorganismos (Belhateche., 1995). El O_2 disuelto juega un papel fundamental en estos procesos, ya que es imprescindible para la eliminación eficaz de la materia orgánica existente en el efluente urbano, mediante la acción de las bacterias aerobias presentes en el tanque de aireación. Por esta razón, la monitorización continua, en tiempo real e *in situ* de la concentración de esta especie química (2 - 4 mg/L) es uno de los capítulos más importantes en el contexto del control del proceso biológico de una EDAR. Una falta de información al respecto puede repercutir tanto en la *calidad del tratamiento* (con efluentes fuera de normativas) como en el *consumo de energía* de la planta (menor o mayor del requerido).

El *control coherente* de la *aireación* y, por tanto, de los niveles de O_2 disuelto en la balsa de tratamiento biológico de una EDAR, puede proporcionar no solamente un tratamiento más eficaz del agua residual, sino que además permite conseguir un sustancial ahorro económico dentro del conjunto de puntos comprendidos en la explotación de la planta depuradora. En la actualidad, está ampliamente divulgado el sistema de control de energía por medio de la monitorización en continuo de las medidas de O_2 disuelto y la generación de las correspondientes señales de control a partir de la superación de uno o dos puntos de consigna previamente programados. Los niveles programados de O_2 disuelto permiten mantener al reactor biológico en un umbral (entre 2 - 2.5 ppm) impidiendo que descienda a valores de deficiencia de O_2 y, asimismo, tampoco se permite que la concentración de O_2 supere valores que pudieran representar un derroche de energía.

En la práctica, el criterio que se sigue en una EDAR para conseguir el máximo ahorro de energía es situar el nivel de aireación en una posición tal que la capacidad de tratamiento se esté desarrollando con suficiente margen como para que no quede sorprendida por una repentina sobrecarga (depende del tipo de EDAR) y, por otro lado, que tampoco esté excesivamente holgada de capacidad de tratamiento.

Los sensores electroquímicos de oxígeno utilizados actualmente en estaciones EDAR en todo el mundo, si bien gozan de suficiente precisión, adolecen de un corto tiempo de vida (por las condiciones particulares de trabajo a las que se ven sometidos) y de moderada fiabilidad en la respuesta, lo que obliga a una constante calibración y a su sustitución frecuente. Dadas las excelentes características (en cuanto a precisión y robustez) mostradas por el optodo de O_2 descrito en la presente Memoria, así como la disposición en el grupo de investigación de un instrumento portátil para la medida con senderos de fibra óptica, decidimos realizar una serie de medidas preliminares de la concentración de oxígeno disuelto en el tanque de tratamiento biológico de una estación depuradora de aguas residuales. Para ello, hemos contado con el generoso ofrecimiento del Canal de Isabel II de Madrid, que ha puesto a nuestra disposición para el ensayo la EDAR de *Soto de Gutiérrez* situada en las proximidades de Madrid y que recoge las aguas residuales de los términos municipales de S. Martín de la Vega, Ciempozuelos y Valdemoro.

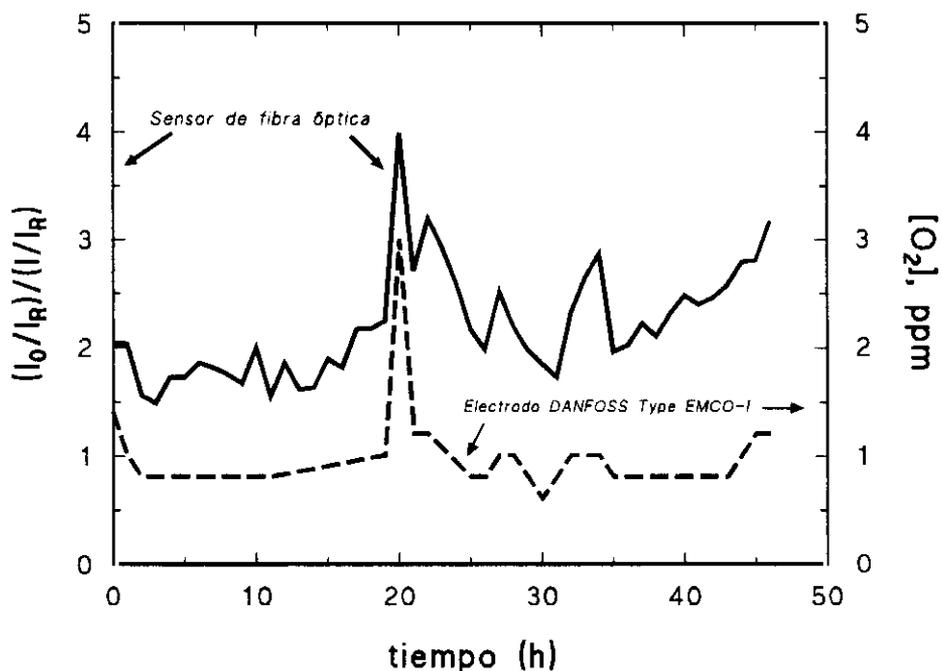


FIGURA 56. Comparación entre las medidas de oxígeno realizadas con el sensor de fibra óptica en continuo (—), y las tomadas por los operarios de la EDAR “Soto de Gutiérrez” (Madrid) utilizando un electrodo de oxígeno comercial (-----).

Al igual que en el caso del fermentador, las medidas con el optodo de O_2 se llevaron a cabo registrando los espectros de emisión del complejo $Ru(dip)_3^{2+}$ inmovilizado en la membrana, tomando como referencia (I_p) la señal obtenida a $\lambda = 480$ nm,

que resulta independiente de la respuesta del sensor, para compensar la posible deriva de la lámpara. La I_0 , correspondiente a la señal en ausencia de O_2 , se obtuvo introduciendo el sensor de fibra óptica en una disolución saturada de sulfito sódico. Los resultados obtenidos con el optodo de O_2 se han comparado con los proporcionados utilizando un electrodo de O_2 comercial (electrodo Danfoss type EMCO-I) con el que normalmente se realizan las medidas de los niveles de O_2 disuelto en la estación depuradora, obteniéndose la representación que muestra la Figura 56 para un período de medida de 48 horas.

Como se observa en la gráfica, las medidas preliminares realizadas utilizando el sensor luminiscente de fibra óptica resultan muy prometedoras, ya que se observa comportamiento muy similar en las respuestas obtenidas con ambos sensores. Sin embargo, de cara a la utilización *in situ* del sensor de fibra óptica, se han de resolver algunos problemas relacionados con las fluctuaciones de temperatura, sobre todo entre el día y la noche, que pueden originar cambios en la señal luminiscente del complejo de rutenio. Actualmente se está trabajando en el desarrollo de una sonda óptica de temperatura que, una vez integrada en el terminal sensible en combinación con el optodo de O_2 permita corregir estas variaciones.

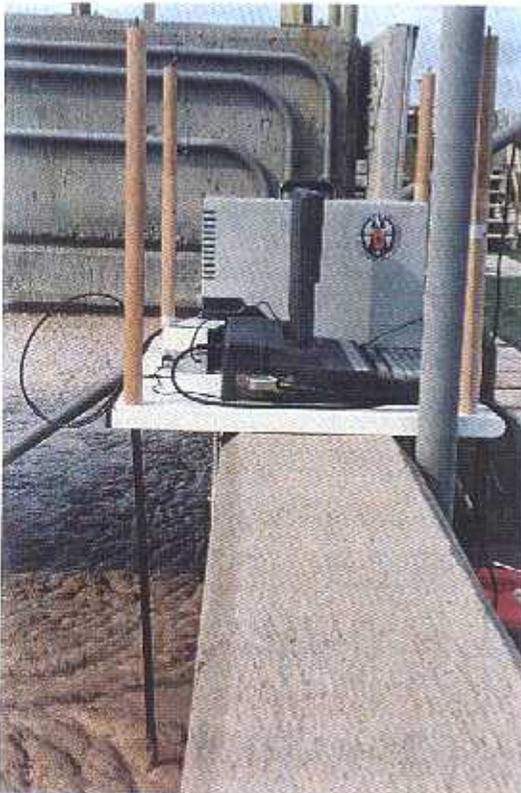


FIGURA 57. Detalle del terminal sensible y del montaje experimental utilizado en las medidas con el sensor de fibra óptica en la balsa de tratamiento biológico de una depuradora.

3.2.7. BIBLIOGRAFÍA.

- Bacon, J.R y Demas, J.N. *Anal. Chem.*, 1984, 56, 62.
- Bacon, J.R y Demas, J.N. *Anal. Chem.*, 1987, 59, 2780.
- Badía, R; Díaz-García, M.E y Sanz-Medel, A. *Mikrochim. Acta*, 1995, 121, 51.
- Belhateche, D.H. *Chemical Engineering Progress*, August 1995, 32.
- Bergman, I. *Nature*, 1968, 218, 396.
- Cardiovascular Devices, Inc., 2801 Barranca Rd., Irvine, CA 92714.
- Carraway, E.R; Demas, J.N; DeGraff, B.A y Bacon, J.R. *Anal. Chem.*, 1991a, 63, 337.
- Carraway, E.R; Demas, J.N; DeGraff, B.A. *Langmuir*, 1991b, 7, 2991.
- Chung, K.E; Lan, E.H; Davidson, M.S; Dunn, B.S; Valentine, J.S y Zink, J.I. *Anal. Chem.*, 1995, 67, 1505,
- Collins, G.E y Rose-Pehrsson, S.L. *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2224.
- Demas, J.N y Bacon, J.R; *Anal. Chem.*, 1981, 59, 2780.
- Draxler, S; Lippistch, M.E; Klimant, I; Kraus, H y Wolfbeis, O.S. *J. Phys. Chem.*, 1995, 99, 3162.
- Díaz-García, M.E; Pereiro-García, R y Velasco-García, N. *Analyst*, 1995, 120, 457.
- Eberhart, R.C y Weigelt, J.A. *Crit. Care. Med.*, 1980, 8, 418.
- Fitzgerald, R.V. *U.S.Patent* 363 425, 1982.
- Freeman, T.F y Seitz, W.R. *Anal. Chem.*, 1981, 53, 98.
- Gehrich, J.L; Lübbers, D.W; Opitz, N; Hansmann, D.R; Miller, W.W; Tusa, J.K y Yafuso, M. *IEEE. Trans. Biomed. Eng.*, 1986, 33, 117.
- Hartmann, P; Leiner, M.J.P y Lippistch, M.E. *Sens. and Actuators B*, 1995, 29, 251.
- Hartmann, P y Trettnak, W. *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2615.
- Hitchman, M.L. "Measurement of Dissolved Oxygen", John Wiley & Sons, New York, 1978.
- Holst, G.A; Köster, T; Voges, E y Lübbers, W.D. *Sens. and Actuators B*, 1995, 29, 231.

- Huarui, H; Fraatz, R.J; Leiner, M.J.P; Rehn, M.M y Tusa, J.K. *Sens. and Actuators B*, 1995, 29, 246.
- Huch, R y Huch, A. "Continuous transcutaneous blood gas monitoring", New York, 1983, Marcel Dekker, Inc.
- Janata, J y Bezegh, A. *Anal. Chem.*, 1988, 60, 62R.
- Kalyanasundaram, K. "Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes", Academic Press, London, 1992.
- Kapany, N.S y Silvertrust, N. *Nature*, 1964, 204, 138.
- Kaplan, L.A y Pesce, A.G (ed.). "Química Clínica. Teoría, análisis y correlación". Editorial Médica Panamericana, 1989.
- Klimant, I y Leiner, M.J.P. *Abstracts of the 1st European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors*, Graz, Austria, 15-18 April, 1992.
- Klimant, I; Belser, P y Wolfbeis, O.S. *Talanta*, 1994, 41, 1985.
- Klimant, I y Wolfbeis, O.S. *Anal. Chem.*, 1995, 67, 3160.
- Kroneis, H.W y Marsoner, H.J. *Sens. and Actuators B*, 1983, 4, 587.
- Lee, W.W, Wong, K.Y y Li, M.X. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 255.
- Li, X.M y Wong, K.Y. *Anal. Chim. Acta.*, 1992, 262, 27.
- Li, X.M; Ruan, F. Ch y Wong, K.Y. *Analyst*, 1993, 118, 298.
- Lin, C.T y Sutin, N. *J. Phys. Chem.*, 1976, 80, 97.
- Lippitsch, M.E; Pusterhofer, J; Leiner, M.J.P y Wolfbeis, O.S. *Anal. Chim. Acta.*, 1988, 205, 1.
- Liu, Y.M; Pereiro-García, R; Valencia-González, M.J; Díaz-García, M.E y Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 836.
- Lübbbers, D.W y Opitz, N. *Z. Naturforsch.*, 1975, 30c, 532.
- Lübbbers, D.W y Opitz, N. *Sens. and Actuators B*, 1983, 3, 641.
- McMurray, H.N; Douglas, P; Busa, C y Garley, M.S. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 1994, 80, 283.

- Matsui, K; Sasaki, K y Takahashi, N . *Langmuir*, 1991, 2866.
- McCraith, B.D; McDonagh, C.M; O'Keeffe, G; Keyes, E.T; Vos, J.G; O'Kelly, B y McGilp, J.F. *Analyst*, 1993, 118, 385.
- Meier, B; Werner, T; Klimant, I y Wolfbeis, O.S. *Sens. and Actuators B*, 1995, 29, 240.
- Miller, J.A y Bauman, C.A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, 65, 1540.
- Miller, W.W; Yafuso, M; Janch, F; Hui, H.K y Arick, S. *Clin. Chem.*, 1987, 25, 99.
- Moreno-Bondi, M.C; Wolfbeis, O.S; Leiner, M.J.P y Schaffar, B.P. *Anal. Chem.*, 1990, 62, 2377.
- O'Keeffe, G; McCraith, B.D; McEvoy, A.K; McDonagh, C.M y McGilp, J.F. *Sens. and Actuators B*, 1995, 29, 226.
- Papkovsky, D.B; Olah, J; Troyanovsky, I.V; Sadovsky, N.A; Rummyantseva, V.D; Mironov, A.F; Yaropolov, A.I y Savitsky, A.P. *Biosens. & Bioelectronics*. 1991a, 7, 199.
- Papkovsky, D.B; Savitsky, A.P; Yaropolov, A.I, Ponomarev, G.V; Rummyantseva, V.D y Mironov, A.F. *Biomed. Sci.*, 1991b, 2, 63.
- Papkovsky, D.B; Olah, J y Kurochkin, I.N. *Sens. and Actuators B*, 1993, 11, 525.
- Papkovsky, D.B; Ponomarev, G.V, Trettnak, W y O'Leary, P. *Anal. Chem.*, 1995a, 67, 4117.
- Papkovsky, D.B. *Sens. and Actuators B*, 1995b, 29, 213.
- Pereiro-García, R; Liu, Y.M; Díaz-García, M.E y Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1759.
- Peterson, J.L; Fitzgerald, R.V y Buckhold, D.K. *U.S. Patent 396 055*, 1983.
- Peterson, J.L; Fitzgerald, R.V y Buckhold, D.K . *Anal. Chem.*, 1984, 56, 62.
- Pfeil, A. *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, 93, 5395.
- Preininger, C; Klimant, I y Wolfbeis, O.S . *Anal. Chem.*, 1994, 66, 1841.
- Rosenzweig, Z y Kopelman, R . *Anal. Chem.*, 1995, 2650.
- Sacksteder, L.A; Demas, J.N y DeGraff, B.A ; *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3480.

- Shah, R; Margerum, S.C y Gold, M . *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, 1988, 906, 65.
- Sharma, A y Wolfbeis, O.S . *Appl. Spectroscopy*, 1988, 42, 1009.
- Skoog, D.A y West, D.M . "Química Analítica". Mc. Graw-Hill, 4ª ed., Madrid, 1989.
- Völk, K.P; Opitz, N y Lübbers, D.W . *Fresenius. Z. Anal. Chem.*, 1980, 301, 162.
- Winefordner, J.D . *Anal. Chem.*, 1983, 55, 712A.
- Winterle, J.S; Kliger, D.S y Hammond, G.S . *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, 98, 3719.
- Wolfbeis, O.S; Posch, H.E y Kroneis, H.W . *Anal. Chem.*, 1985, 57, 2556.
- Wolfbeis, O.S. *Mikrochim. Acta*, 1986, III, 359.
- Wolfbeis, O.S y Leiner, M.J.P. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, 1988, 906, 42.
- Wolfbeis, O.S. "Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors", Vol. I y II. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1991.
- Xu, W; McDonough, R.C; Langsdorf, B; Demas, J.N y DeGraff, B.A. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 4133.
- Xu, W; Kneas, K.A; Demas, J.N y DeGraff, B.A . *Anal. Chem.*, 1996, 68, 2605.
- Zhakarov, I.A; Grishaeva, T.I. *Zh. Prikl. Khim. (Leningrad)*, 1989, 62, 2376.
- Zhakarov, I.A; Grishaeva, T.I; Barsdin, V.V; Kurtutsea, O.N y Kozlov, V.V. *Otkrytiya Izobret*, 1990, 15, 143.
- Zhujun, Z y Seitz, W.R . *Anal. Chem.*, 1986, 58, 220.

3.3. BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE.

3.3.1. Papel biológico e importancia clínica del colesterol.

3.3.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de colesterol.

3.3.2.1. Métodos analíticos químicos y enzimáticos para la determinación de colesterol.

3.3.2.2. Biosensores.

3.3.3. Preparación de la fase sensora.

3.3.3.1. Elemento biológico: colesterol oxidasa.

3.3.3.2. Soporte enzimático. Acoplamiento al transductor de oxígeno.

3.3.4. Optimización de las condiciones experimentales de medida del sistema de inyección en flujo.

3.3.4.1. Estudio del efecto de la velocidad de flujo y del volumen de inyección.

3.3.5. Estudio de la influencia de la disolución portadora en la respuesta del biosensor.

3.3.5.1. Estudios preliminares.

3.3.5.2. Selección del medio idóneo para las determinaciones. Optimización mediante la aplicación del método SIMPLEX.

3.3.6. Características analíticas.

3.3.6.1. Calibrado e intervalo de linealidad.

3.3.6.2. Precisión y límite de detección.

3.3.6.3. Estudio de interferencias.

3.3.6.4. Estabilidad operacional.

3.3.7. Aplicación analítica.

3.3.8. Bibliografía.

3.3. BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE.

Una vez estudiado y caracterizado el sensor de O_2 , el siguiente paso en nuestro estudio ha sido su acoplamiento con elementos biológicamente activos, concretamente con *enzimas* de tipo *oxidasa*, para el desarrollo de *biosensores en flujo*. En este contexto, se ha diseñado y caracterizado un sistema para la determinación de *colesterol libre*, utilizando como elemento de reconocimiento molecular la enzima *colesterol oxidasa*.

3.3.1. PAPEL BIOLÓGICO E IMPORTANCIA CLÍNICA DEL COLESTEROL.

Los lípidos son biomoléculas insolubles en agua que presentan una solubilidad elevada en disolventes orgánicos como, por ejemplo, el cloroformo. Estos compuestos tienen diferentes funciones biológicas: sirven como moléculas combustibles, como almacenes de energía altamente concentrada y como componentes de las membranas. Los lípidos que aparecen como constituyentes de las membranas son el *colesterol*, los *fosfolípidos* y los *glicolípidos*.

El colesterol es probablemente uno de los lípidos más estudiados del organismo humano y su determinación, uno de los análisis más frecuentemente utilizados en el diagnóstico de las perturbaciones del metabolismo graso (Willet, 1994; Yalpani, 1996). Es un tipo de lípido o grasa compleja, cuyo nombre sistemático es 5-colest-en-3-ol, y que presenta la siguiente estructura:

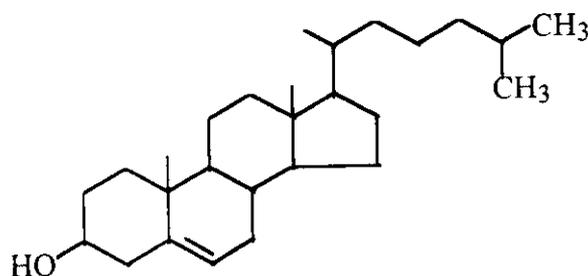


FIGURA 57. Estructura de la molécula de colesterol.

Se trata de un componente esencial de todas las células animales e interviene en la formación de hormonas esteroideas, vitamina D y los ácidos biliares. Sin embargo, en determinadas situaciones debidas principalmente a factores externos como la *dieta* o a *factores genéticos*, el nivel de colesterol en sangre puede aumentar por encima de los valores deseables (hasta 200 mg/dL), incrementándose de forma considerable el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares.

Los valores de colesterol en sangre dependen de muchos factores: la *edad*, el *sexo*, la *actividad física* y, de forma muy importante, la *dieta*. Si hay que establecer un límite superior alto, debemos decir que para un adulto de 40 años la cifra de colesterol total en sangre no debe sobrepasar las cantidades de 200 a 220 mg/dL, ya que, a partir de este valor está demostrado que aumenta el riesgo de enfermedad arterioesclerótica coronaria. De hecho, hoy día, ya se acepta que las cifras entre 200 y 240 mg/dL deben tratarse siguiendo la dieta adecuada. Para valores superiores, además de la dieta, deben emplearse agentes farmacológicos que rebajen las cifras de colesterol.

TABLA XVI. VALORES DE REFERENCIA DE COLESTEROL EN SUERO ^a.

| <i>Clasificación</i> | <i>Colesterol total (mg/dL)</i> | <i>LDL Colesterol (mg/dL)</i> |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| Niveles deseables | < 200 | < 130 |
| Niveles frontera | 200 - 239 | 130 - 159 |
| Niveles de alto riesgo | ≥ 240 | ≥ 160 |

^a (Zak et al., 1990; Noble, 1993)

Las principales fuentes del colesterol sanguíneo son las siguientes:

- Dos terceras partes proceden de nuestro propio organismo a partir de la síntesis intracelular, fundamentalmente en el hígado.
- Una tercera parte proviene de la ingesta de grasas saturadas y colesterol en la dieta.

La molécula de colesterol es *insoluble* en la sangre, por lo tanto, para su transporte en el plasma sanguíneo y distribución en el organismo es necesario solubilizarlo mediante las debidas “cubiertas” o “envolturas” proteicas. Estos compuestos de colesterol y grasas rodeadas por cubiertas de proteínas se denominan *lipoproteínas*. Dentro de ellas, la proporción de ambos componentes puede variar notablemente pudiendo clasificarse en los siguientes grupos:

- Lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), con pocas proteínas, colesterol alto y sobre todo muy alto contenido en triglicéridos, un tipo de grasa muy pernicioso que favorece el desarrollo de la arteriosclerosis.

- Lipoproteínas de baja densidad (LDL), con moderada cantidad de proteínas y todavía alto contenido colesterol y otras grasas. La lipoproteína LDL es la forma habitual de suministro de colesterol a los tejidos.

- Lipoproteínas de alto peso y densidad (HDL), con gran cantidad de proteínas y, en general, moderado o bajo contenido de colesterol y grasas. Su función es captar colesterol de la célula y transportarlo hasta el hígado para desde allí, ser eliminado a través de la bilis.

Las causantes del daño arterial son las VLDL y las LDL que provocan o conducen a la *arteriosclerosis*. Por contra, las de alta densidad (HDL), previenen o evitan el desarrollo de esta enfermedad. Se trata de los ya conocidos tipos de colesterol: el “*pernicioso*” y el “*benefactor*”. Cuando determinamos, sin especificar, el colesterol sanguíneo, nos referimos al nivel de colesterol total indiscriminadamente es decir, sin detallar los distintos tipos ligados a las distintas proteínas.

Las enfermedades coronarias son la primera causa de mortalidad en los países occidentales e industrializados, siendo responsables de un elevado índice de absentismo laboral, invalidez, así como de un elevado coste socio-económico (Fortman et al., 1993). En Estados Unidos y otros países avanzados, tras ímprobos esfuerzos en campañas de educación sanitaria, de prevención y alerta sobre los factores de riesgo, la curva de incidencia ha experimentado un claro y continuo declinar con marcado retroceso en el número de casos. Sin embargo, las enfermedades coronarias aún persisten como importantísima causa de padecimiento, incapacidad y muerte. Diversos estudios epidemiológicos, han permitido demostrar la relación existente entre ciertos

factores de riesgo cardiovasculares y el desarrollo de arteriosclerosis. Entre estos factores de riesgo se encuentran los siguientes:

- **Hiperlipidemias.** Niveles altos de colesterol y grasa en sangre son la principal causa de las cardiopatías coronarias.
- **Hipertensión arterial.** Se puede prevenir a través del bajo consumo de sal, la disminución de peso, el ejercicio físico y el tratamiento farmacológico si fuera necesario.
- **Tabaco.** Produce diversos efectos nocivos sobre el sistema cardiovascular que conducen al desarrollo de arteriosclerosis, como el vaso-espasmo arterial persistente y la disminución de los niveles de HDL.
- **Diabetes.**
- **Obesidad.** Disminuye los niveles de HDL y aumenta los de triglicéridos.
- **Sedentarismo.** Disminuye los niveles de HDL y predispone a la obesidad.
- **Sexo.** La mujer antes de la menopausia tiene menor riesgo cardiovascular por la protección hormonal, debido a que los estrógenos disminuyen los niveles de LDL y aumentan los de HDL.
- **Edad avanzada.**
- **Factores genéticos y hereditarios .**

3.3.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COLESTEROL.

3.3.2.1. *Métodos analíticos químicos y enzimáticos para la determinación de colesterol.*

Dada su extraordinaria importancia en medicina clínica, conocida desde hace tiempo, el colesterol es, sin duda, alguna el lípido del organismo humano que ha sido estudiado con mayor profundidad, habiéndose descrito multitud de métodos para su determinación. El conocimiento de la química involucrada en los diversos métodos de análisis de colesterol, así como, el reconocimiento de sus limitaciones resultan de fundamental importancia en la selección del método más adecuado para su empleo en

el laboratorio. Con mucha frecuencia, las consideraciones realizadas tienen en cuenta factores como simplicidad, velocidad, conveniencia y, por otro lado, exactitud y precisión. En la actualidad, prosiguen las investigaciones en muchos laboratorios para encontrar técnicas más rápidas, factibles de automatizar, que proporcionen una mayor exactitud y permitan trabajar con menores volúmenes de muestra.

Los métodos para análisis de colesterol recogidos en esta revisión bibliográfica pueden clasificarse en dos grandes grupos:

- Métodos químicos o clásicos .
- Métodos enzimáticos.

a) Métodos químicos.

En la bibliografía se han descrito multitud de métodos para la determinación de colesterol (*Kaplan et al., 1989; Zak et al., 1990*) pero, esencialmente, están basados en modificaciones de alguna de las siguientes reacciones, conocidas desde hace tiempo:

- Reacción de *Liebermann-Burchard*.
- Reacción *ácido-sal férrica*.
- Reacción *ácido p-toluensulfónico (p-TSA)*.

Generalmente se establecen diferencias entre procedimientos de una única etapa y de varias etapas (TABLA XVII). Estos últimos conllevan la *extracción y aislamiento* del colesterol y la correspondiente reacción indicadora, mientras que, en los procedimientos que transcurren en un solo paso no es necesaria una preparación previa de la muestra. Los métodos de *una sola etapa* no poseen, evidentemente, la *especificidad* característica de los de extracción (pueden generarse errores positivos y/o negativos debido a la presencia de proteínas, vitaminas A, C y D, turbidez y diferencias de cromogenicidad del colesterol libre y los ésteres de colesterol), pero su ventaja es que el procedimiento de ejecución es *sencillo y rápido* con escasa manipulación de la muestra y por lo tanto son adecuados para la *automatización*.

Respecto a los métodos de *varias etapas*, se pueden clasificar en 3 grupos atendiendo al número de etapas a las que se ve sometida la muestra durante el tratamiento previo:

TABLA XVII. MÉTODOS QUÍMICOS PARA EL ANÁLISIS DE COLESTEROL EN SUERO.

| MÉTODO | CLASIFICACIÓN | PRINCIPIO | USO | COMENTARIOS |
|-----------------------------------|-----------------------|--|--------------|---|
| 1. <i>Liebermann-Burchard</i> | De 1, 2, 3 ó 4 etapas | Extracción del colesterol y reacción con ácido sulfúrico y anhídrido acético para formar ácido colestahexaeno sulfónico (A_{max} , 410 nm); precipitación de colesterol no esterificado con digitonina, medición del colesterol remanente y cálculo de colesterol libre: Total- Esterificado = Libre. | Muy común | * Mayor intensidad de color para colesterol esterificado que para colesterol libre. * Requiere un control riguroso de las condiciones experimentales. |
| 2. <i>Ácido-sal de hierro</i> | De 2 etapas | Condiciones de reacción similares a método 1, pero se añade Fe^{3+} para dar catión tetraenílico (A_{max} , 563 nm). | No frecuente | * Más sensible que el método de L-B. * Colesterol libre y esterificado dan el mismo color. * Interferencia de la bilirrubina. |
| 3. <i>Ácido p-toluensulfónico</i> | De 3 etapas | Idem método 2; el p-TSA reacciona con derivado de colesterol para formar cromóforo (A_{max} , 550nm). | Infrecuente | * Más simple que el procedimiento de L-B. * Colesterol libre y esterificado dan el mismo color. * La bilirrubina interfiere de forma significativa. |

- *Métodos de dos etapas.* Suponen la extracción previa del colesterol en fase orgánica y posterior medida mediante la reacción indicadora correspondiente. Este pretratamiento elimina muchos *cromógenos inespecíficos* que pueden interferir en el ensayo.

- *Métodos de tres etapas.* Estos procedimientos incluyen, además de la extracción del colesterol, una etapa de saponificación que hidroliza los ésteres de colesterol. Con ello se consigue una *extracción más completa* en ciertos disolventes así como una *mayor especificidad* en la determinación ya que, en este caso, la reacción coloreada tiene lugar con una única variedad de colesterol.

- *Métodos de cuatro etapas.* Estos métodos además de las ya mencionadas etapas de *extracción, saponificación y desarrollo del color*, incluyen una etapa de *precipitación* del colesterol con digitonina, la cual forma un complejo de tipo 1: 1 con el analito. Sin embargo, la precipitación con digitonina no garantiza la especificidad de la determinación por cuanto los estanoles, que integran aproximadamente un 5% de los esteroides séricos, también precipitan con este reactivo.

Los métodos químicos han sido ampliamente utilizados en test de rutina (*Malavolti et al., 1985*), pero debido a la baja especificidad y a la necesidad, en muchas ocasiones, de realizar pretratamientos de las muestras, se han sustituido rápidamente por métodos de tipo enzimático.

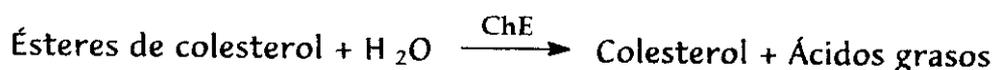
b) Métodos enzimáticos.

En la actualidad, podemos decir que los métodos enzimáticos para la determinación de colesterol han reemplazado a los métodos químicos o clásicos. Tanto es así que con su mayor utilización y estudio, los métodos enzimáticos pueden llegar a convertirse en los métodos de referencia preferidos en las determinaciones de colesterol por varias razones:

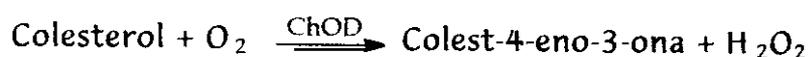
- El procedimiento enzimático transcurre en una sola etapa y, por tanto, puede ser automatizado.
- A diferencia de los métodos químicos, no emplean reactivos corrosivos.
- Son métodos prácticamente libres de interferencias, gracias a la especificidad de las enzimas.

- Satisfacen los criterios de exactitud y precisión exigidos.

Los métodos enzimáticos para colesterol utilizan en una primera etapa la colesterol esterasa (ChE) para hidrolizar los ésteres de colesterol presentes en el suero, dando colesterol libre y ácidos grasos libres.



En una segunda etapa, se utiliza la enzima colesterol oxidasa (ChOD) que en presencia de oxígeno oxida el colesterol (libre más el generado en la etapa anterior) a Colest-4-eno-3-ona y peróxido de hidrógeno.



En esta reacción, la concentración de colesterol puede determinarse indirectamente mediante el seguimiento del consumo de oxígeno o la producción de peróxido de hidrógeno.

3.3.2.2. Biosensores.

Las reacciones catalizadas por las enzimas colesterol esterasa (ChE) y colesterol oxidasa (ChOD) (véase apartado 3.3.2.1.b) constituyen la base de los métodos enzimáticos para el análisis de colesterol (Allain et al., 1974; Huang et al., 1975) y, por tanto, también de los biosensores.

En la bibliografía, se proponen distintos esquemas de detección de este analito empleando biosensores. Algunos se basan en la monitorización del consumo de oxígeno y otros en la medida del H_2O_2 , producido durante la reacción enzimática catalizada por la colesterol oxidasa. Ambos analitos se pueden cuantificar empleando métodos electroquímicos o métodos ópticos, lo que ha dado lugar al desarrollo de biosensores eléctricos y biosensores ópticos.

a) Biosensores electroquímicos.

Se han descrito diversos sistemas para la determinación de colesterol basados en la utilización de electrodos enzimáticos, tanto en sistemas en flujo continuo como en dispositivos tipo sonda (TABLA XVIII). En la mayoría de los casos, se mide el H_2O_2 generado en la reacción de la ChOD por medio de un electrodo convencional de Pt

(Karube et al., 1982; Masoom et al., 1985; Dong et al., 1993; Trettnak et al., 1993, Yao et al., 1994; Besombes et al., 1995).

TABLA XVIII. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA ANÁLISIS DE COLESTEROL APARECIDOS EN LA BIBLIOGRAFÍA.

| <i>Analito</i> | <i>Medio Medida</i> | <i>Detección</i> | <i>Intero. Lineal (mg/dL)</i> | <i>Referencia</i> |
|-------------------------|--|---|-----------------------------------|-----------------------------|
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 8, 50 mM; 5% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 100 - 400 | Karube et al., 1982 |
| <i>Colesterol Libre</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 4% Triton; 5% isopropanol | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0.2 - 80 | Masoom et al., 1985 |
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 7.5, 0.1 M; 2% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0.1 - 270 | Yao et al., 1988 |
| <i>Colesterol Libre</i> | Tampón Britton- Robinson; 5% Triton; 4% alcohol isoamílico/10% isopropanol | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 2.0 - 173 | Dong et al., 1993 |
| <i>Colesterol total</i> | Ácido cítrico-fosfato ácido pH = 7 | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0.077 - 38 | Motonaka et al., 1993 |
| <i>Colesterol Libre</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 1% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0.2 - 9 | Trettnak et al., 1993 |
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 6.8, 10 mM; 0.2% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0 - 39 | Crumbliss et al., 1993 |
| <i>Colesterol Libre</i> | Glicina pH = 8.8, 0.1 M; 1% Triton; etanol | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 2.3 - 192 | Markas et al., 1994 |
| <i>Colesterol Libre</i> | Fosfato pH = 7.5, 0.1 M; 0.75% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 5 - 200 | Yao et al., 1994 |
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 0.35% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0.038 - 5.8 | Charpentier et al., 1995 |
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 0.05% Triton | Amperométrica (H ₂ O ₂) | 0.77 - 5.8 | Besombes et al., 1995 |
| <i>Colesterol total</i> | Cloroformo/Hexano (1:1) | Amperométrica (O ₂) | 0 - 192 | Hall et al., 1991 |

En otros casos, se han utilizado electrodos específicos para el H₂O₂ que incorporan la enzima peroxidasa (HRP), la cual cataliza la reacción de descomposición

del H_2O_2 , generando una corriente eléctrica en el electrodo (Yao et al., 1988, Crumbliss et al., 1993; Charpentier et al., 1995). Sin embargo, estos biosensores son poco selectivos ya que la oxidación del H_2O_2 en los electrodos convencionales requiere la aplicación de potenciales elevados y, por tanto, la presencia de otras especies electroactivas en el medio puede originar interferencias.

La incorporación de mediadores redox en la composición del electrodo, incrementa la selectividad de estos dispositivos, ya que aceleran la oxidación del H_2O_2 . En estos casos, la concentración de colesterol se determina monitorizando la corriente originada por la reoxidación del mediador (Markas et al., 1994; Motonaka et al., 1993).

Aunque la mayoría de los electrodos enzimáticos para colesterol se basan en la detección amperométrica del H_2O_2 (ya que, generalmente su medida plantea menos problemas), también se han descrito algunos sistemas basados en la detección del O_2 consumido en la reacción de oxidación del colesterol catalizada por la colesterol oxidasa (Hall et al., 1991). En este caso, el electrodo para el análisis de colesterol opera en medio orgánico (hexano-cloroformo), donde no existen problemas de precipitación del analito.

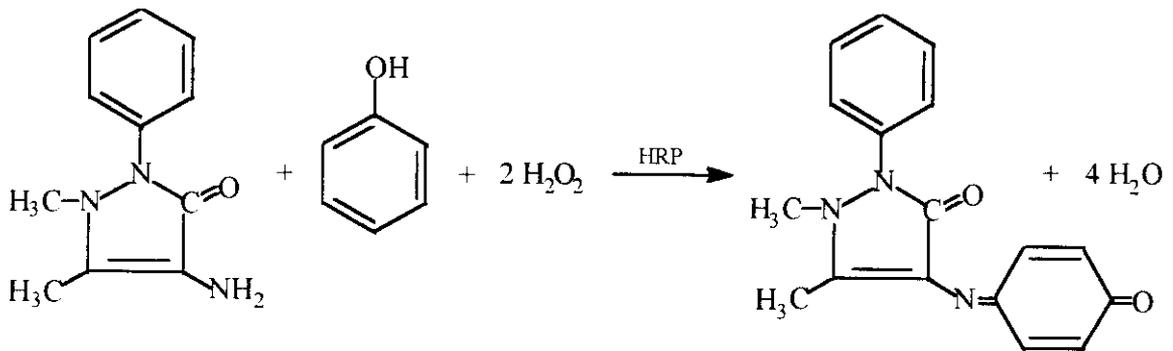
b) Biosensores ópticos: Biorreactores y Biosensores de fibra óptica

Bajo la denominación de *biorreactores* se incluyen dispositivos, tanto para la determinación de colesterol libre, como colesterol total que incorporan las enzimas ChOD y ChE inmovilizadas y empaquetadas en una microcolumna o reactor enzimático integrado a su vez en un sistema de flujo.

Al igual que en el caso de los electrodos enzimáticos para colesterol, el sistema de detección más empleado consiste en la monitorización del H_2O_2 , en este caso por métodos ópticos, fundamentalmente *espectrofotométricos* y *luminiscentes* (véase TABLA XIX).

Se han utilizado diferentes reacciones en las que interviene el H_2O_2 dando lugar a un cromóforo como reacciones indicadoras para la determinación indirecta de colesterol. Así, por ejemplo, Fernández-Romero y col. (Fernández-Romero et al., 1987) han propuesto un método para la determinación de colesterol total en suero basado en las reacciones catalizadas por la ChE y ChOD y la consiguiente detección

espectrofotométrica del H_2O_2 , empleando la *reacción de Trinder*, que constituye la base de los test enzimáticos de rutina actualmente disponibles en el mercado para el análisis de colesterol. A continuación se muestra un esquema de la reacción indicadora.



En este caso, la reacción entre el H_2O_2 , la 4-aminofenazona y el fenol, da lugar a un derivado de imina que puede ser detectado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 500 nm.

Por otra parte, Braco y col. (Braco et al., 1992) han desarrollado un sistema de análisis en flujo en medio orgánico, el cual incorpora un reactor con las enzimas ChOD y HRP coinmovilizadas sobre vidrio de poro controlado (CPG). La detección se lleva a cabo espectrofotométricamente. Al oxidarse (en presencia de HRP) la *p*-anisidina disuelta en el portador se origina un compuesto coloreado que absorbe a 458 nm.

Krug y col. (Krug et al., 1994) han empleado el sistema indicador formado por el 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) para el desarrollo de un método FIA para el análisis de colesterol total. En este caso, el H_2O_2 procedente de la oxidación enzimática del colesterol reacciona con el ABTS, en presencia de la enzima peroxidasa, dando lugar a un catión radical metaestable que absorbe a 423 nm. Aunque el catión sufre *dismutación*, ésta es demasiado lenta y no afecta a las medidas cinéticas basadas en estudios de la velocidad inicial.

A pesar de ser los más utilizados, los métodos *espectrofotométricos* basados en la detección del H_2O_2 presentan el inconveniente de la irreversibilidad de las reacciones indicadoras, las cuales dan lugar a un cromóforo que no puede ser regenerado. Por esta razón, el indicador se emplea normalmente en disolución, ya

que, en caso contrario si se procede a la inmovilización del mismo, el sensor servirá para un único uso.

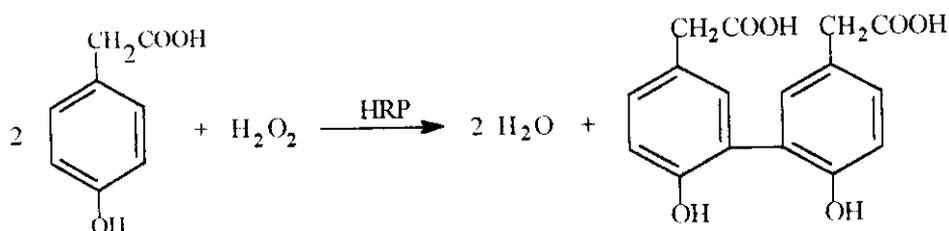
TABLA XIX. CARACTERÍSTICAS DE LOS BIOSENSORES ÓPTICOS PARA ANÁLISIS DE COLESTEROL DESCRITOS EN LA BIBLIOGRAFÍA.

| <i>Analito</i> | <i>Medio Medida</i> | <i>Detección</i> | <i>Intero. Lineal (mg/dL)</i> | <i>Referencia</i> |
|-------------------------------|--|--|----------------------------------|--------------------------------|
| <i>Colesterol libre/total</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 3.85% Triton; 12.8% isopropanol | Espectrofotom. (H ₂ O ₂) | 20 - 192 (C.L) 38 - 308 (C.T) | Krug et al., 1992 |
| <i>Colesterol libre</i> | 10 ⁻³ M <i>p</i> -anisidina/tolueno | Espectrofotom. (H ₂ O ₂) | 0.38 - 7.0 | Braco et al., 1992 |
| <i>Colesterol total</i> | Tris-HCl pH = 7, 0.5 M; 4% Triton; 10% isopropanol | Espectrofotom. (H ₂ O ₂) | 1 - 30 | Fdez-Romero et al., 1987 |
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 4% Triton; 13% isopropanol | Espectrofotom. (H ₂ O ₂) | 4 - 33 | Krug et al., 1992 |
| <i>Colesterol libre</i> | Fosfato pH = 7, 0.1 M; 4% Triton; 10% isopropanol | Fluorescencia (O ₂) | 7.7 - 115 | Trettnak et al., 1990 |
| <i>Colesterol total</i> | Fosfato pH = 8, 0.5 M; 1.5% Brij-35; 10% isopropanol | Fluorescencia (H ₂ O ₂) | 0.2 - 10 | Fdez-Romero et al., 1987 |
| <i>Colesterol libre</i> | Hexano/Cloroformo 5% (v/v) | Fosforescencia (O ₂) | 2 - 154 | Valencia-González et al., 1994 |
| <i>Colesterol libre</i> | Borato pH = 7, 2 mM; 3% Triton | Quimioluminisc. (H ₂ O ₂) | 0 - 24 | Petersson et al., 1986 |
| <i>Colesterol libre</i> | Borato pH = 8, 0.1 M; 0.4% Triton | Quimioluminisc. (H ₂ O ₂) | 9.6 x 10 ⁻⁴ - 0.96 | Blum et al., 1987 |

Por otra parte, también se han descrito algunos sistemas basados en la detección del H₂O₂ mediante medidas de fluorescencia/fosforescencia. Así por ejemplo, Fernández-Romero y col. (Fernández-Romero et al., 1987) proponen un sistema constituido por un reactor enzimático (ChE y ChO inmovilizadas en CPG) integrado en un sistema de análisis en flujo y detección fluorimétrica del H₂O₂ producido. El ácido *p*-hidroxifenilacético forma, en presencia del H₂O₂, un *dímero fluorescente* con una estructura rígida cuyo máximo de emisión está situado a 415 nm. Pero, al igual que mencionamos en el caso de los métodos espectrofotométricos,

se trata de una reacción irreversible, por lo que el indicador ha de emplearse en disolución, limitando la aplicabilidad del dispositivo resultante.

La reacción que tiene lugar responde al siguiente esquema:



En este sentido, el empleo de métodos de detección basados en medidas de desactivación de la fluorescencia por el O₂ podría superar algunas de estas limitaciones por las ventajas inherentes que presenta esta técnica, ya que, los procesos de desactivación de luminiscencia *no* originan cambios estructurales de la molécula del fluoróforo y, por tanto, es posible la *regeneración* del mismo. Otra alternativa podría ser la monitorización de los cambios en la fluorescencia intrínseca de la enzima ChOD durante su interacción con el sustrato. Sin embargo, aunque la ChOD es una *flavoproteína*, ésta presenta una *fluorescencia muy débil* (Kenney et al., 1979) por lo que las medidas basadas en este principio dan lugar a una pobre sensibilidad y no son muy útiles de cara a su aplicación en la construcción de biosensores.

Valencia-González y col. (Valencia-González et al., 1994) han sido los primeros en describir un sistema en flujo para análisis de colesterol basado en medidas de fosforescencia. El dispositivo consta de un reactor enzimático o minicolumna que contiene la enzima ChOD inmovilizada por adsorción sobre vidrio de poro controlado. El O₂ consumido durante la oxidación enzimática del colesterol, se detecta a través de los cambios en la señal de fosforescencia de un quelato metálico sensible al O₂ que se encuentra inmovilizado sobre una resina de intercambio aniónico. El biosensor, que opera en medio orgánico (hexano/cloroformo) se ha aplicado con éxito al análisis de colesterol en muestras de alimentos.

Petersson y col. (Petersson et al., 1986) han desarrollado un sistema de análisis en flujo miniaturizado con detección quimioluminiscente para la determinación de colesterol libre entre otros analitos de interés clínico. Para ello, han empleado la reacción descrita por primera vez por Albrecht en 1928 (Albrecht et al.,

1928) en la que el luminol es oxidado por el H_2O_2 (en presencia de un catalizador) produciéndose una momentánea emisión de luz (quimioluminiscencia) a 425 nm. En este caso, el reactor enzimático relleno con la ChOD inmovilizada en CPG y empaquetada en una microcolumna de PVC, se acopla dentro de un sistema FIA de microcircuitos integrados que también incorpora la válvula de inyección y el detector. El sistema resulta especialmente atractivo para aplicaciones clínicas por su *elevada sensibilidad y frecuencia de análisis* (90 muestras por hora), *portatibilidad simplicidad y bajo coste*.

Blum y col. (Blum et al., 1987) también han aprovechado la *elevada sensibilidad* que proporciona la reacción quimioluminiscente de oxidación del luminol por el H_2O_2 (en presencia de HRP), como sistema de detección para el análisis de colesterol libre. La inmovilización de la enzima peroxidasa (HRP) se lleva a cabo sobre *membranas de poliamida preactivadas* (tipo Biodyne®), mientras que la enzima ChOD se emplea en disolución. El dispositivo resultante muestra una excelente sensibilidad al analito, obteniéndose calibrados con un intervalo de linealidad comprendido entre 2.5×10^{-8} - 2.5×10^{-5} M para un tiempo de integración de 150 s. No obstante, el sistema presenta una *precisión baja* (8%) si se compara con los valores requeridos en los ensayos clínicos de colesterol (3%) (Koch et al., 1988) y, a pesar de su excelente sensibilidad, se observa una *emisión luminiscente de fondo* debida al luminol que incrementa los límites de detección alcanzados.

Por otra parte, Mike y col. (Mike et al., 1992) han empleado la enzima colesterol oxidasa junto con bis-(2,4,6-triclorofenil) oxalato (TCPO) como sustrato para la detección quimioluminiscente del H_2O_2 producido durante la oxidación enzimática del colesterol. El dispositivo está compuesto por un sistema de análisis en flujo donde se integra una minicolumna que contiene ChOD inmovilizada covalentemente sobre CPG. El inconveniente del método reside en que el Triton X-100, presente en las disoluciones para facilitar la interacción entre el analito y la enzima, puede contener cantidades significativas de *peróxidos complejos* originados durante la fotooxidación (Chang et al., 1980; Ashani et al., 1980). Estos reaccionan con el TCPO, dando lugar a un notable aumento de la emisión de fondo que *enmascara* la señal analítica (especialmente para bajas concentraciones de colesterol). Los autores proponen un método para eliminar esta interferencia que consiste en

trabajar a una temperatura de 37 °C ya que, de esta forma, se acelera la cinética de la reacción entre el TCPO-H₂O₂ reduciendo considerablemente el ruido debido a la interacción TCPO-Triton X-100.

En los últimos años, también se han adaptado las medidas enzimáticas de colesterol a la tecnología de fibra óptica, apareciendo los primeros optodos enzimáticos para este analito. Aunque existen contados ejemplos en la bibliografía, podemos destacar el desarrollado por Trettnak y col. (Trettnak et al., 1990) que consiste en la determinación en continuo de colesterol libre, utilizando un optodo de O₂ como transductor. La membrana enzimática está constituida por ChOD inmovilizada covalentemente en nylon. Los cambios en el nivel de O₂ que se producen durante la reacción enzimática se siguen mediante la desactivación de la fluorescencia de una molécula sensible al O₂ (*decaciclono*) inmovilizada en una membrana de silicona y dispuesta en el extremo de una fibra óptica. El sensor muestra un intervalo dinámico comprendido entre 0.2 - 3 mM, el cual incluye los valores de interés clínico. Sin embargo, los tiempos de respuesta (7 - 12 minutos) son relativamente elevados debido, fundamentalmente, a la necesaria difusión del analito y del O₂ desde/hacia la membrana sensible.

Otro dispositivo de fibra óptica es el descrito por Krug y col. (Krug et al., 1992a) capaz de determinar *selectivamente* colesterol libre y colesterol total mediante *dos optodos independientes* (uno con ChOD y otro con ChE y ChOD coinmovilizadas en una membrana de nylon y situadas en el extremo de una fibra óptica). El terminal de fibra óptica se introduce en una célula de flujo que contiene HRP y el compuesto 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) y la concentración de colesterol se determina mediante medidas cinéticas correspondientes a la aparición de un producto coloreado generado en la oxidación enzimática del ABTS por el H₂O₂, completándose la medida en 2 minutos.

Estos mismos autores, (Krug et al., 1992b) han desarrollado un sistema de análisis por inyección en flujo que permite el análisis de colesterol libre y colesterol total mediante un sensor de fibra óptica. El sistema está constituido por dos reactores de vidrio (situados uno a continuación del otro), que contienen las enzimas ChE y ChOD inmovilizadas sobre vidrio derivatizado con grupos alquilamino. En primer lugar, los ésteres de colesterol atraviesan el reactor donde se sitúa la ChE y son

hidrolizados a colesterol libre y ácidos grasos. A continuación, el colesterol libre es oxidado por la ChOD en el segundo reactor y el H_2O_2 generado durante la reacción es detectado espectrofotométricamente a través de fibras ópticas. El sensor presenta un intervalo dinámico comprendido entre $0.5 - 0.8 \text{ mmol L}^{-1}$ y la frecuencia de análisis es de 60 y 30 muestras por hora para colesterol libre y total, respectivamente.

3.3.3. PREPARACIÓN DE LA FASE SENSORA.

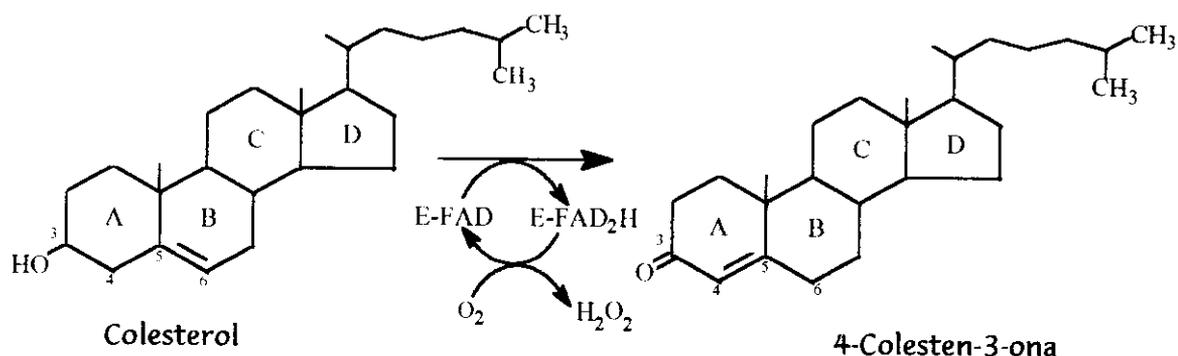
Una de las aplicaciones más interesantes de los sensores de O_2 es su utilización como transductores en reacciones enzimáticas catalizadas por oxidasas (Wolfbeis, 1991), entre las que se encuentra la *colesterol oxidasa* (ChOD). La estructura del biosensor se compone generalmente de una capa enzimática, que se dispone sobre el transductor químico, (véase apartado 2.2.2) y un indicador sensible al O_2 permite determinar el consumo de este analito producido en la reacción catalizada por la ChOD, que se relaciona con la concentración de colesterol presente en la muestra. Éste ha sido el principio en que se fundamenta el biosensor de fibra óptica para la determinación de colesterol libre descrito a continuación.

Tradicionalmente, la determinación enzimática de colesterol se lleva a cabo en medio acuoso, donde el colesterol es muy poco soluble, por lo que es necesario emplear mezclas hidroalcohólicas, en combinación con agentes tensioactivos, para favorecer la solubilización del mismo y aumentar la actividad de la enzima colesterol oxidasa. Todos los autores coinciden en este hecho, sin embargo, no existe un criterio único a la hora de establecer la composición óptima de las disoluciones de medida (TABLAS XIX y XX). En este contexto, y con objeto de evaluar la influencia de la composición de las disoluciones de colesterol sobre la respuesta del biosensor y su funcionamiento, se ha llevado a cabo el estudio que se describe detalladamente en las secciones posteriores.

3.3.3.1. Elemento biológico: *colesterol oxidasa*.

La enzima *colesterol oxidasa* (3β -hidroxiesteroide oxidasa) (E.C.1.1.3.6) cataliza la oxidación e isomerización de los Δ^5 -eno- 3β -hidroxiesteroides para dar los correspondientes Δ^4 -3-cetoesteroides. En esta etapa de oxidación interviene el grupo prostético FAD de la enzima, el cual es reoxidado por el oxígeno molecular.

La reacción enzimática que tiene lugar es la que se representa en el siguiente esquema, utilizando colesterol como sustrato:



El sitio activo de la enzima está localizado en una cavidad próxima al anillo de flavina y se encuentra rodeado por residuos hidrófobos. El grupo FAD se encuentra justamente en la base de esa cavidad en el interior de la cual se alojan 13 moléculas de agua, imprescindibles para el mantenimiento de la actividad enzimática.

Aunque la enzima muestra un amplio intervalo de especificidades para esteroides, la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 3 β es esencial para su actividad, ya que se ha demostrado que los 3 α -hidroxiesteroides no son oxidados por la ChOD (Smith et al., 1975; Inouye et al., 1982).

También se ha observado que algunos esteroides que no presentan un doble enlace en el carbono 5 del anillo, son susceptibles de ser oxidados por la colesterol oxidasa; sin embargo, la mayor actividad es la mostrada para su sustrato natural, el colesterol.

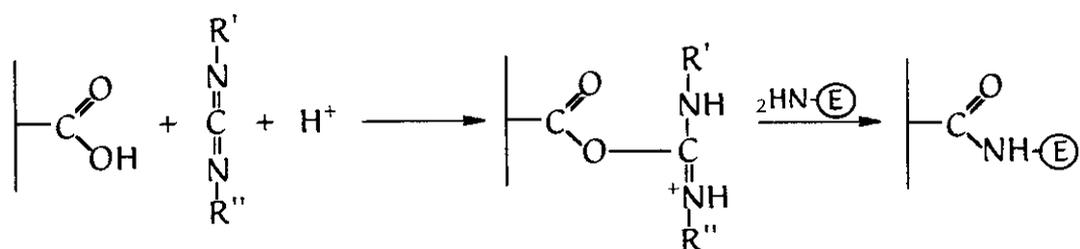
3.3.1.2. Soporte enzimático. Acoplamiento al transductor de O₂.

La inmovilización enzimática para la construcción del biosensor se llevó a cabo sobre carbón activo (apartado 2.3.3). Se trata de un material utilizado en multitud de aplicaciones (principalmente como adsorbente, soporte catalítico y en la fabricación de electrodos) debido, fundamentalmente, a su estructura microcristalina y porosa.

La unidad estructural básica del carbón activo se asemeja en muchos aspectos a la estructura del grafito puro. La naturaleza química de su superficie viene

determinada por el tipo y número de enlaces con ciertos *heteroátomos* (especialmente O₂), cuya presencia en la matriz del carbón activo se debe fundamentalmente a la materia prima empleada o al proceso seguido en la fabricación del mismo. La presencia de estos *heteroátomos*, determina en gran medida las *propiedades* (*adsorbentes, electroquímicas, catalíticas, ácido-base, redox*, entre otras) y la *reactividad química* de este material.

Para llevar a cabo la unión covalente de la enzima al soporte sólido es necesario activar el carbón activo con objeto de generar en su superficie los grupos funcionales adecuados para dicha inmovilización. En primer lugar, las partículas de grafito se someten a una etapa previa de oxidación (por calentamiento en presencia de aire) con el fin de generar *grupos carboxilo* en su superficie, los cuales reaccionarán posteriormente con la *carbodiimida* y finalmente con los grupos *amino* de la enzima, de acuerdo al siguiente esquema de reacción:



De forma general, el *acoplamiento* entre el elemento biológico (*enzima*) y el sensor de O₂ (*transductor*) puede llevarse a cabo de dos formas diferentes: la primera consiste en una disposición que asegure el *contacto directo* entre ambos componentes (*biosensores*) y la segunda supone la utilización de *reactores enzimáticos* insertados en un sistema de flujo que permite su conexión con el transductor. Asimismo, en el caso de los biosensores existen diversas posibilidades de acoplar los dos componentes. Una de ellas consiste inmovilizar conjuntamente en la *misma membrana* el transductor y la enzima obteniéndose una fase sensible a ambas especies. La otra posibilidad es construir *biosensores híbridos* en los que los componentes son inmovilizados por separado siguiendo distintos procedimientos, acoplándose posteriormente para obtener la fase biosensora.

En nuestro caso, el *acoplamiento* de la ChOD al transductor de O₂ se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Schaffar y col. (*Schaffar et al., 1990*),

según el cual la enzima se *entrecruza* con glutaraldehído sobre la superficie del sensor de O_2 . Con este fin, sobre la membrana de silicona, que contiene la gel de sílice con el complejo $Ru(dip)_3^{2+}$ inmovilizado, recientemente extendida y, por tanto, aún sin "curar", se deposita una capa de carbón activo que actúa a modo de aislante óptico y a su vez, adsorbe la enzima que finalmente se entrecruza con glutaraldehído. El terminal sensible así obtenido contiene en la misma membrana el transductor y la enzima con lo que se consigue disminuir notablemente los tiempos de respuesta y aumentar la reproducibilidad de las medidas. El esquema descrito para ilustrar el proceso que tiene lugar en la fase sensible se muestra en la Figura 58. En el apartado 2.4.3 se describe detalladamente el procedimiento experimental para la realización de las medidas, una vez dispuesta la membrana sensible en el extremo de la fibra óptica en la célula de flujo. En todos los casos se empleó una $\lambda_{exc} = 460$ nm y una $\lambda_{em} = 620$ nm, midiéndose la altura de los picos FIA obtenidos en función de la concentración de analito inyectada en el sistema.

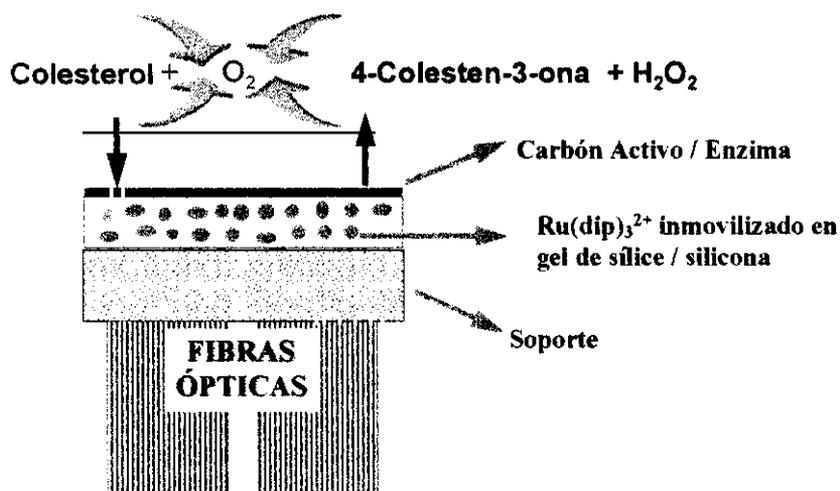


FIGURA 58. Sección transversal de la fase sensible del sensor de fibra óptica para la determinación de colesterol libre.

3.3.4. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES DE MEDIDA DEL SISTEMA DE INYECCIÓN EN FLUJO.

3.3.4.1. Estudio del efecto del caudal y del volumen de inyección.

Para realizar el estudio del caudal óptimo de muestra para obtener una respuesta máxima con el optodo, se ensayaron distintas velocidades de bombeo correspondientes a caudales comprendidos entre $0.14 - 0.90 \text{ mL min}^{-1}$.

Se comprueba que la respuesta obtenida para una disolución 3 mM de colesterol, resulta máxima para un caudal de 0.14 mL min^{-1} (Figura 59), valor que se empleó para la realización de todas las determinaciones. Las menores respuestas obtenidas al aumentar la velocidad de flujo se atribuyen a la disminución del tiempo de residencia del bolo de muestra inyectado en el interior de la célula de flujo donde se sitúa la membrana enzimática, por lo que la reacción enzimática se produce en menor extensión y las medidas son menos reproducibles. Lógicamente, las menores velocidades de flujo originan la dispersión del bolo de muestra y el ensanchamiento de los picos, dando lugar a mayores tiempos de respuesta.

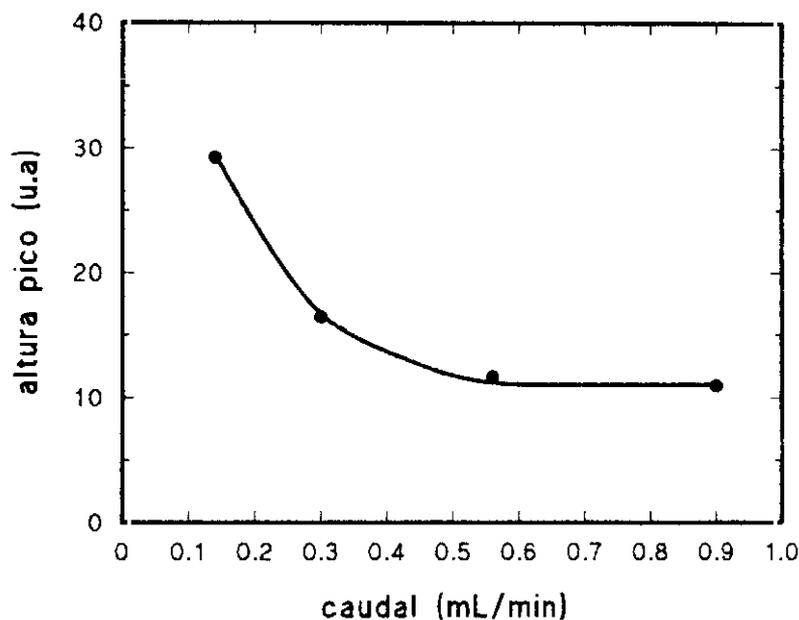


FIGURA 59. Efecto del caudal sobre la respuesta del biosensor a una concentración 3 mM de colesterol libre en tampón fosfato 0.3 M , $\text{pH} = 8.0$ (en presencia de un 10% de isopropanol y 4% de Triton X-100), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Asimismo, se estudió el efecto del volumen de muestra inyectado (entre 300-500 μL) sobre la altura del pico FIA obtenido. Los resultados mostrados en la Figura 60 indican que la respuesta obtenida para una disolución 3 mM de colesterol, resulta constante y máxima para volúmenes de inyección de 500 μL , por lo que se seleccionó este valor para posteriores experimentos.

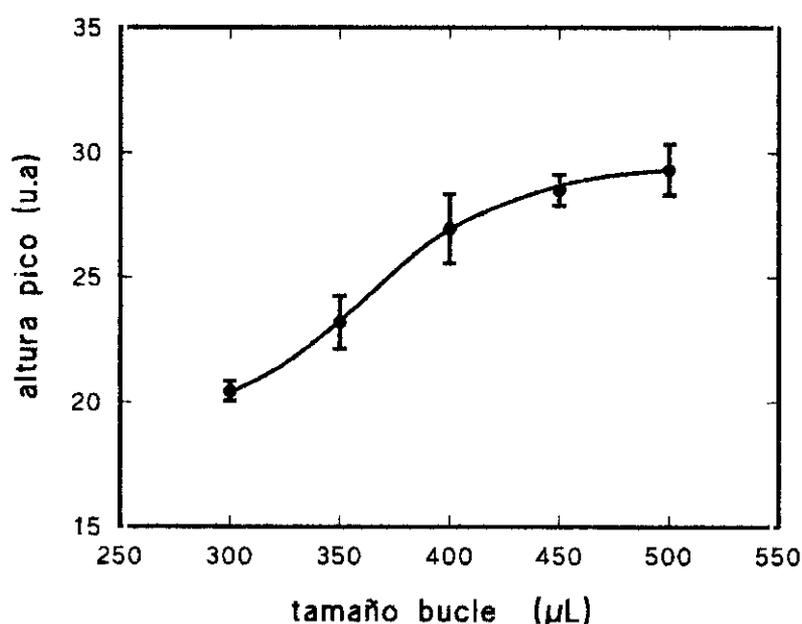


FIGURA 60. Efecto del volumen de muestra inyectado sobre la respuesta del biosensor a una concentración 3 mM de colesterol libre en tampón fosfato 0.3 M, pH = 8.0 (en presencia de un 10% de isopropanol y 4% de Triton X-100), T = 25 °C.

3.3.5. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA DISOLUCIÓN PORTADORA EN LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR.

3.3.5.1. Estudios preliminares.

a) Influencia del pH.

Tanto el pH como la temperatura son dos variables críticas que ejercen un marcado efecto sobre la actividad enzimática. Cuando se inmoviliza una enzima el pH óptimo de trabajo puede no ser el mismo que cuando se encuentra libre en disolución. Además, el pH óptimo de funcionamiento va a depender también del tipo de inmovilización. Con el fin de determinar el pH óptimo para la realización de las medidas con el sensor de colesterol se varió el pH de la disolución reguladora utilizada como portador, fosfato 0.3 M (entre pH 7.00 - 8.25). Se inyectó a continuación una

disolución de colesterol 2 mM, evaluándose la variación de la altura de los picos FIA obtenidos en función del pH. Los resultados se muestran en la Figura 61.

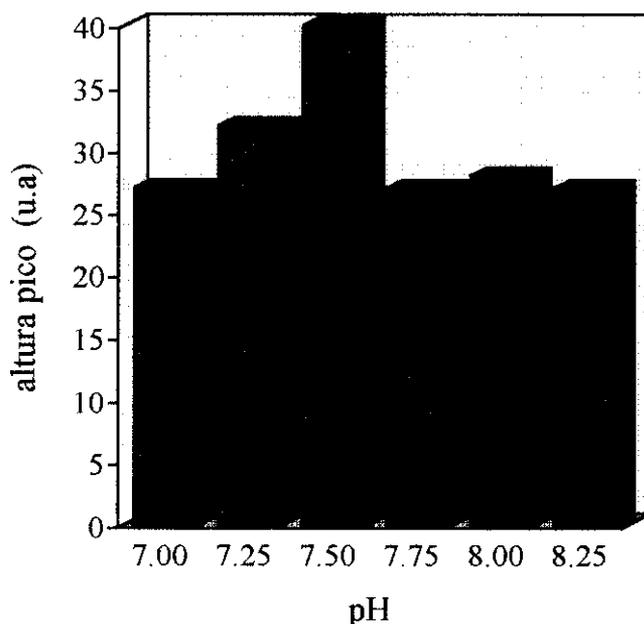


FIGURA 61. Efecto del pH en la respuesta del biosensor a una disolución de colesterol libre 2 mM en una disolución reguladora de fosfato 0.3 M (en presencia de un 10% de isopropanol y 4% de Triton X-100) T = 25.0 °C.

Se comprueba que el pH óptimo de respuesta se sitúa a 7.50, disminuyendo notablemente la altura de los picos FIA obtenidos en los valores extremos del intervalo estudiado. Este desplazamiento hacia medios ligeramente más alcalinos del pH óptimo para el funcionamiento de la enzima, respecto al valor observado en disolución (pH 7.0; *Noma et al., 1976*), se puede atribuir al proceso de inmovilización debido al cual, se genera un microentorno más ácido alrededor de la enzima inmovilizada sobre las partículas de carbón activo, que el correspondiente a la disolución, de forma que si al rebajar el pH del portador, su actividad disminuye notablemente.

b) Influencia de la temperatura.

Al igual que el pH, la temperatura provoca un efecto importante sobre la actividad enzimática. Las enzimas, en medio acuoso, tienen una temperatura óptima de funcionamiento que suele oscilar entre 30 - 40 °C, superada la cual la enzima comienza a inactivarse. Además, en el caso del biosensor que nos ocupa, la

luminiscencia del $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ (al igual que ocurre con la mayoría de los complejos polipiridílicos de Ru; *Demas et al., 1991*) también se ve afectada por la temperatura, disminuyendo a medida que ésta aumenta. Por lo tanto, la temperatura de trabajo elegida resultará del compromiso entre la actividad enzimática y la respuesta del transductor de O_2 .

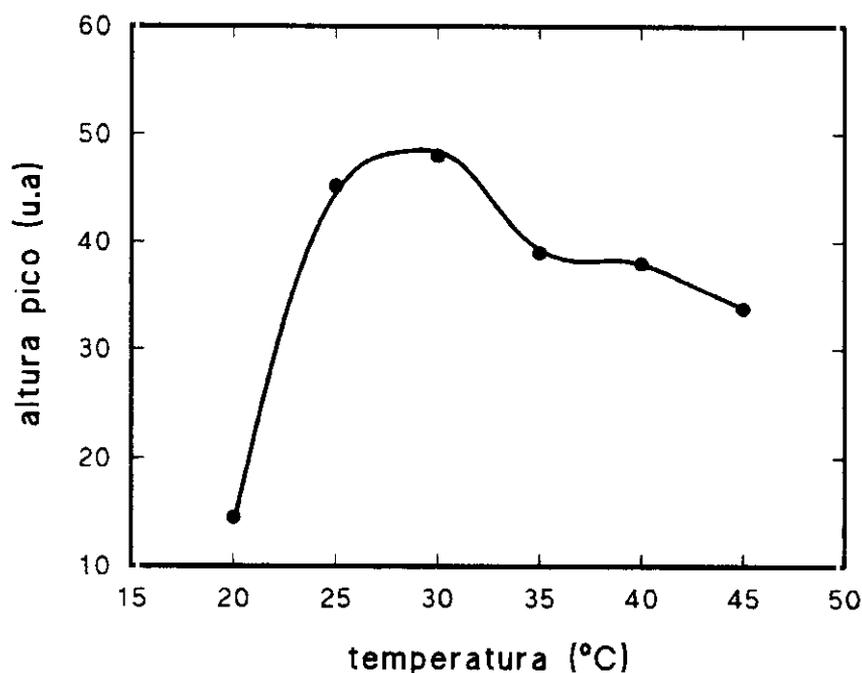


FIGURA 62. Influencia de la temperatura sobre la respuesta del biosensor frente a una disolución de colesterol libre 2 mM en una disolución reguladora de fosfato 0.3 M (en presencia de un 10% de isopropanol y 4% de Triton X-100). (Cada punto corresponde al valor medio de tres determinaciones análogas).

Como se aprecia en la Figura 62, la temperatura óptima para la enzima inmovilizada ha resultado ser de unos 30 °C. Este valor es ligeramente inferior al descrito en la bibliografía para la enzima ChOD en disolución (37 °C; *Huang et al., 1975; Motonaka et al., 1993*).

c) Efecto de la composición de la disolución portadora.

Desde un punto de vista práctico, uno de los problemas que se plantean en el análisis de colesterol es su *baja solubilidad* en medio acuoso, que generalmente es subsanada mediante la adición de *agentes tensoactivos* (como el Triton X-100) o de un pequeño volumen de *alcohol isopropílico* para favorecer el proceso de solubilización. Además, el tensoactivo Triton X-100 es un conocido activador de la

enzima ChOD, ejerciendo una doble función: aumenta la actividad enzimática (en ausencia del mismo, la actividad de la ChOD se reduce en un 70%) y, al mismo tiempo, incrementa la estabilidad de las disoluciones de ChOD (Huang et al., 1975; Karube et al., 1982; Bergmeyer et al., 1983). Por todo ello, es de esperar que la combinación de estas dos variables interdependientes (%Triton X-100 (p/v), % isopropanol (v/v)), que juegan un papel clave en la emulsificación del sustrato y/o en la actividad enzimática (Blum et al., 1987), tenga un efecto importante sobre la respuesta del biosensor. Algunos autores (Fernández-Romero et al., 1987; Trettnak et al., 1990; Krug et al., 1994), han sugerido que el empleo de un 4%(p/v) de Triton X-100 y un 10% (v/v) de isopropanol en la disolución portadora resulta óptimo para el funcionamiento de la colesterol oxidasa inmovilizada; sin embargo la gran dispersión de valores y diversidad de medios de medida encontrados en la bibliografía (ver TABLAS XIX y XX), nos ha llevado a analizar la posibilidad de llevar a cabo una *optimización simultánea* de estas variables mediante el empleo del método SIMPLEX. A continuación, se describe el procedimiento utilizado y los resultados obtenidos.

3.3.5.2. Selección del medio idóneo para las determinaciones. Optimización mediante la aplicación del método SIMPLEX.

En cualquier proceso de *optimización* se pretende conseguir la mejor solución, entre todas las posibles, para el sistema en estudio. La estrategia habitual para la optimización es la llamada “*prueba y error*”, en la cual se mantienen todos los factores a estudiar constantes mientras se varía uno de ellos, hasta encontrar un óptimo para dicho factor. Fijado éste, se varía secuencialmente cada uno de los factores restantes, encontrándose *óptimos individuales*. Sin embargo, este método no es el más apropiado, especialmente en aquellos casos en que se produzcan *interacciones* entre los distintos factores que afectan a la respuesta del sistema, hecho, por otra parte, bastante frecuente en el campo experimental.

Así, surge la necesidad de utilizar otras estrategias de optimización que varíen más de un factor a la vez, como pueden ser los *métodos simplex* desarrollados por Spendley y col. (Spendley et al., 1962) y más tarde modificados por Nelder y col. (Nelder et al., 1965), que constituyen uno de los grupos de procedimientos más

ampliamente utilizados en la optimización de métodos analíticos por su relativa sencillez y probada eficacia (Rózycki, 1993).

Un *simplex* es una figura geométrica constituida por $k+1$ vértices, siendo K el número de factores a estudiar. Las coordenadas de cada vértice vienen determinadas a través de cada una de las experiencias que se van realizando en el proceso de optimización. Para la construcción del *simplex* inicial, se estudia la respuesta del sistema en estas $k+1$ experiencias, descartándose aquel punto que proporcione la peor respuesta. Este punto se sustituye por su simétrico respecto al centro de gravedad del resto de los puntos, y con ellos se forma un nuevo *simplex*. El procedimiento se repite en sucesivos pasos hasta que se alcanza la zona del óptimo, cuando la respuesta que se obtenga sea satisfactoria.

Este procedimiento, conocido como “*simplex de tamaño fijo*”, ha sido después matemáticamente modificado por los “*simplex de tamaño variable*”, en los cuales se realizan expansiones o contracciones del tamaño del *simplex*, según se observe la buena o mala dirección en que éste se va desplazando en el espacio de respuesta, con objeto de alcanzar el máximo con un menor número de experiencias (Betteridge et al., 1985).

En nuestro caso, y para evitar una excesiva complejidad de los experimentos, se seleccionaron tres variables interdependientes (% Triton X-100 (p/v), % isopropanol (v/v) y concentración de la disolución reguladora de fosfato) para llevar a cabo una optimización simultánea tipo *simplex*. La respuesta a optimizar es la altura del pico FIA para una concentración de colesterol 3 mM. El método utilizado ha sido el denominado *simplex super-modificado* (Deming et al., 1973; Morgan et al., 1974) que permite evaluar de forma más rápida (con un menor número de experimentos) la respuesta óptima. Para aplicar dicho método se ha recurrido al programa COPS.² El método *simplex super-modificado* se basa en una búsqueda secuencial del óptimo, partiendo de una situación inicial definida a partir de unos valores iniciales de las variables y un paso, que es un indicador del “tamaño del *simplex*”. En nuestro caso, el valor de las *condiciones iniciales* y el *tamaño del simplex* (TABLA XX) se han determinado a partir de experiencias previas en las que se investigaron los intervalos de influencia de las distintas variables en la respuesta analítica. De esta forma, los

² COPS: Elsevier Scientific Software, Amsterdam.

intervalos en los que se consideró esta influencia son: 2 - 4% (p/v) para Triton X-100, (5 - 15% v/v) para isopropanol y (0.20 - 0.40 M) para la concentración del tampón.

TABLA XX. CONDICIONES DEL SIMPLEX INICIAL.

| VÉRTICE | [Triton], % | [Fosfato], M | [Isopropanol] % | Respuesta \pm (s), (u.a) |
|---------|-------------|--------------|-----------------|----------------------------|
| 1 | 2.5 | 0.22 | 6.0 | 19 (1) |
| 2 | 3.0 | 0.23 | 6.6 | 21 (1) |
| 3 | 2.6 | 0.27 | 6.6 | 22 (1) |
| 4 | 2.6 | 0.23 | 8.4 | 22 (1) |

Después de completar los experimentos correspondientes a los 4 vértices iniciales, los valores de las respuestas obtenidas se introducen en el programa del simplex. El punto correspondiente a la peor respuesta obtenida es rechazado y sustituido por su simétrico respecto al centro de gravedad del resto de los puntos, y con ellos se construye un nuevo simplex.

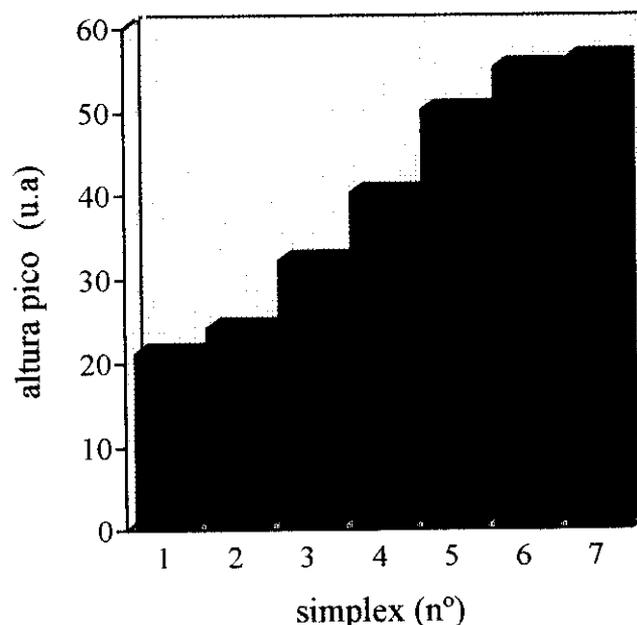


FIGURA 63. Evolución de la respuesta promedio obtenida con el biosensor frente a una disolución de colesterol libre 3 mM en función del n° de simplexes realizados.

El valor óptimo se obtuvo después de completar 6 simplexes (que corresponde a un total de 12 experimentos), como se muestra en la Figura 63 donde se ha representado la evolución de la respuesta promedio en función del número de simplexes realizados. En las condiciones óptimas encontradas, que corresponden a un 2.6% de Triton X-100, 11% de isopropanol y 0.30 M de tampón fosfato a pH 7.50, se ha obtenido una altura de pico de 65 ± 2 para una concentración de analito 3 mM, lo cual supone un incremento en la señal analítica de 3 veces con respecto al valor obtenido en las condiciones de partida (TABLA XX). Estos datos corroboran la eficacia de este método de optimización y su aplicabilidad a este tipo de análisis. Una vez seleccionado el medio idóneo para llevar a cabo las determinaciones se procedió, a continuación, a evaluar las características analíticas del biosensor de fibra óptica.

3.3.6. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

3.3.6.1. Calibrado e intervalo de linealidad.

Los perfiles de respuesta para diferentes concentraciones de colesterol, así como el calibrado obtenido con el biosensor se muestran en la Figura 64.

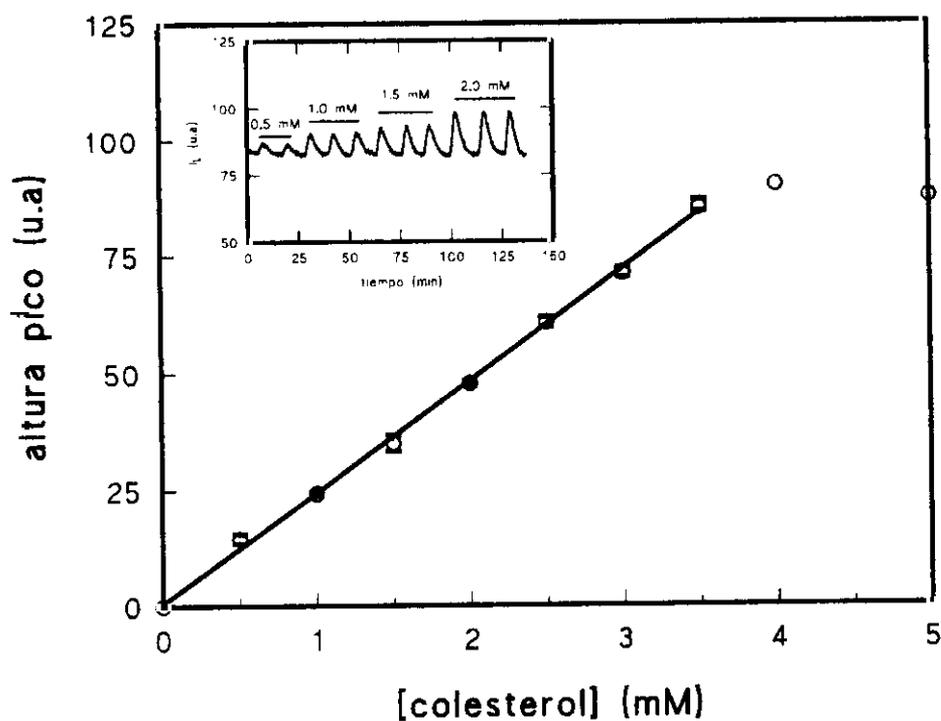


FIGURA 64. Calibrado del biosensor a pH = 7.50, T = 30 °C. (Cada punto corresponde al valor medio de tres inyecciones de muestra). Figura insertada: Perfiles de respuesta del biosensor frente a disoluciones de concentración variable de colesterol.

La línea base corresponde a la señal obtenida en presencia de una disolución reguladora de fosfato 0.30 M y pH 7.50 que contiene un 2.6% de Triton X-100 y un 11% de alcohol isopropílico. En estas condiciones se obtiene un cierto valor de la intensidad de emisión de luminiscencia, correspondiente al contenido de oxígeno en la disolución portadora. Cuando se inyecta la muestra que contiene colesterol en la corriente portadora, se produce la difusión del analito en la fase enzimática y la posterior reacción estequiométrica con el O₂ presente en el medio. Esto da lugar a una variación de la presión parcial de O₂ en el interior de la membrana sensible y, por tanto, se produce un aumento de la señal luminiscente del complejo Ru(dip)₃²⁺ que es registrado como un pico transiente, cuya altura será proporcional a la concentración de colesterol, siempre y cuando se cumpla que (Völkl et al., 1989):

1. El O₂ se encuentra disponible en exceso.
2. La concentración de la enzima es tal que la *velocidad* de la *catálisis* es *proporcional* a la *concentración* de sustrato.
3. Los *productos* de la reacción se encuentran en *equilibrio* de *difusión* con el medio a medir.

A partir de una cierta concentración de colesterol (4 mM en nuestro caso), que depende de la actividad de la enzima, no se produce un aumento de la señal de fluorescencia obtenida, aunque aumente la concentración del mismo. Este hecho se debe a que, una vez que se alcanza una concentración de colesterol tal que la enzima consume todo el O₂ presente en el medio, por mucho que aumente la concentración del analito, la señal no puede incrementarse más, ya que estamos trabajando en defecto de O₂. Como se muestra en la Figura 64, la respuesta del biosensor es lineal entre 0.15 y 3.5 mM de colesterol libre y viene definida por la siguiente ecuación: $h = (24.0 \pm 0.5) [\text{colesterol}] + (1 \pm 1)$ ($r = 0.9990$), donde h es la altura del pico FIA y la concentración de colesterol viene expresada en mmol L⁻¹. Este intervalo incluye, por otra parte, los valores clínicos de interés [0.54 - 2.41 mM] (Tietz, 1987; Zak et al., 1990).

3.3.6.2. Precisión y límite de detección.

La *precisión* del biosensor se evaluó en términos de la desviación estándar relativa (RSD) correspondiente a 8 inyecciones de una disolución de colesterol 2 mM, obteniéndose un valor de un 4%.

colesterol, incluso a niveles de concentración muy superiores a los encontrados en muestras de suero.

TABLA XXI. EFECTO DE DISTINTAS ESPECIES INTERFERENTES SOBRE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR A UNA DISOLUCIÓN DE COLESTEROL LIBRE 2 mM EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE MEDIDA (2.6% Triton X-100, 11% isopropanol, fosfato 0.30 M, pH 7.50, 30 °C).

| <i>Interferente</i> | <i>Anal:Interf.</i> | <i>Sens. relativa.⁽¹⁾ (%)</i> |
|------------------------|---------------------|--|
| <i>Ácido ascórbico</i> | 1:1 | 100 |
| | 1:5 | 155 |
| <i>Urea</i> | 1:5 | 103 |
| | 1:10 | 94 |
| <i>Glucosa</i> | 1:5 | 101 |
| | 1:10 | 97 |
| <i>Hemoglobina</i> | 1:0.05 | 97 |
| <i>Creatinina</i> | 1:5 | 97 |
| | 1:10 | 95 |
| <i>Bilirrubina</i> | 1:0.1 | 104 |
| | 1:0.05 | 93 |

⁽¹⁾ Expresada como la relación de las señales correspondientes al colesterol en presencia del interferente y al colesterol en ausencia de interferente.

3.3.6.4. Estabilidad operacional.

Para comprobar la *estabilidad* del biosensor con el tiempo se realizaron determinaciones de muestras de distinta concentración de colesterol en función del tiempo transcurrido desde la fabricación del sensor y se evaluó la variación de la pendiente de los calibrados obtenidos. Los resultados representados en la Figura 65, demuestran que la respuesta del biosensor permanece prácticamente constante durante el tiempo ensayado (más de dos meses) con una respuesta lineal descrita por la ecuación $h = (23.6 \pm 0.6) [\text{colesterol}] + (1 \pm 1)$, ($r = 0.9990$). Durante el tiempo

Como criterio para calcular el *límite de detección*, se ha aplicado el método sugerido por la IUPAC (Hasebe et al., 1975):

$$L.D = 3 S_b/m$$

donde m es la pendiente del calibrado lineal obtenido y S_b es la desviación estándar (en alturas) obtenida para el blanco. Debido a que los picos FIA correspondientes a una disolución del blanco no se distinguían de la señal obtenida para la línea base, el límite de detección se ha calculado tomando como estimador de S_b el obtenido para una concentración 0.2 mM de colesterol libre, próxima a la concentración menor del intervalo de linealidad del optodo. De esta forma se obtuvo un valor para el límite de detección que resultó ser de 0.15 mM.

3.3.6.3. Estudio de interferencias.

Con vistas a la posible aplicación del biosensor desarrollado a muestras de interés clínico o biológico (e.g sangre o suero sanguíneo), el estudio de interferencias se llevó a cabo estudiando el efecto de aquellas sustancias mencionadas en la bibliografía como potenciales interferentes en la determinación de colesterol, que suelen estar presentes en muestras de suero o sangre y que pueden afectar a la actividad de la ChOD o bien al sensor de O_2 , utilizado como transductor de la reacción enzimática. Los resultados obtenidos se recogen en la TABLA XXI, donde se ha representado la sensibilidad relativa del biosensor hacia una disolución 2 mM de colesterol en las condiciones de medida optimizadas previamente (disoluciones equilibradas al aire, pH 7.50 y 30 °C) y en presencia de las diferentes especies. Cada valor representa la media de tres inyecciones.

Únicamente el ácido ascórbico (cuando está presente en relaciones superiores a 1:1) interfiere en la cuantificación del colesterol con el biosensor de fibra óptica. La interferencia positiva observada en presencia de ácido ascórbico se debe sin duda al poder *reductor* de este compuesto, el cual es fácilmente oxidado por el O_2 disuelto presente en las disoluciones. Sin embargo, otros autores (Fernández-Romero et al., 1987) han comprobado que no supone una limitación para la determinación del analito en muestras de suero, probablemente debido a la rápida oxidación que experimenta este compuesto por el O_2 dando lugar a productos que no interfieren en el análisis. El resto de las sustancias ensayadas no interfieren en la determinación de

que no se utilizó, el sensor se mantuvo a 4 °C sumergido en tampón fosfato 0.1 M y a pH 7.5.

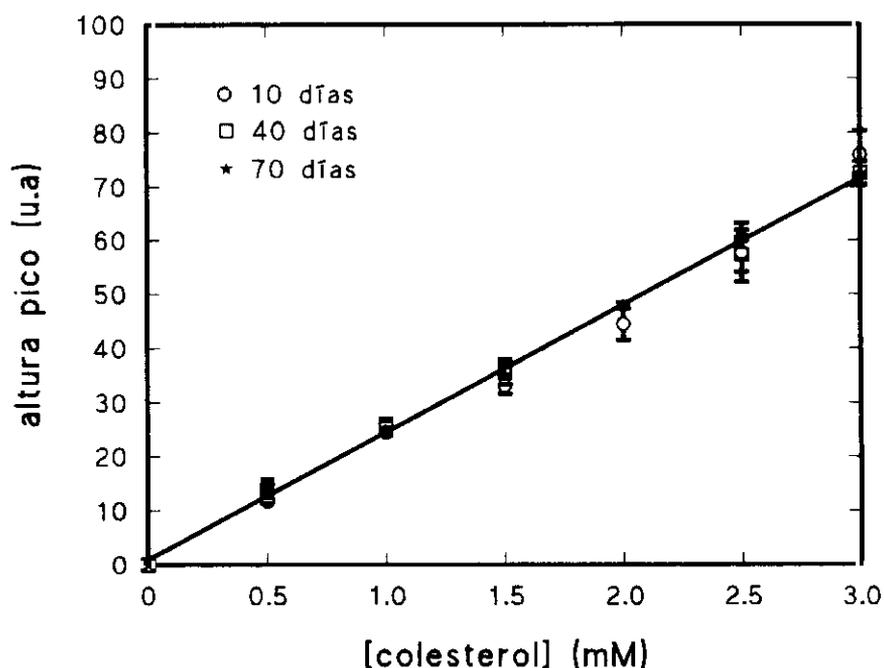


FIGURA 65. Curvas de calibrado para el biosensor de colesterol: ○10 días; □40 días y ★70 días después de su preparación.

Asimismo, cuando se evaluó la respuesta del biosensor hacia una disolución estándar de colesterol 2 mM durante un período de tiempo prolongado (tres meses), se observó que, después de un total de 100 inyecciones, el optodo continúa siendo operativo, aunque la altura de los picos FIA obtenidos disminuyó aproximadamente en un 30%.

Los resultados demuestran, por tanto, la *gran estabilidad a largo plazo y vida útil* del biosensor bajo las condiciones óptimas de trabajo, ya que, continúa operativo después de más de dos meses de medida, sin mostrar ninguna señal de fotodescomposición del complejo de rutenio empleado como indicador de O₂ o inactivación total de la enzima.

3.3.7. APLICACIÓN ANALÍTICA.

Con el fin de comprobar la utilidad del biosensor desarrollado para la determinación de colesterol en muestras reales, se procedió a analizar el contenido de este analito en muestras de suero certificado. Se eligieron para ello dos muestras de

suero comerciales, *Precilip*[®] y *Precinorm L*[®]. Las muestras de suero liofilizado fueron reconstituidas con 3 mL de la disolución portadora y, a continuación, se inyectaron directamente (sin diluir) en el sistema de análisis en flujo a través de un filtro de disco de membrana (Millipore, 0.25 μm) para evitar la posible obturación de la válvula de inyección.

Para llevar a cabo los análisis, se preparó una recta de calibrado con concentraciones crecientes de colesterol y se calculó directamente a partir de éste el contenido en colesterol para 5 determinaciones análogas de cada muestra, obteniéndose los resultados que aparecen en la TABLA XXII. Paralelamente, una de las muestras se analizó aplicando el método de adiciones estándar para comprobar la existencia de efecto matriz. La comparación de las pendientes proporcionadas por el método de adiciones estándar y el calibrado directo (véase TABLA XXII), demuestra que no existen diferencias significativas entre ambas a un nivel de probabilidad del 95%, por tanto, se puede concluir que no se produce efecto matriz. Por ello, es posible analizar las muestras de suero directamente sin necesidad de pretratamiento.

Como se deduce de los valores recogidos en la TABLA XXII, los resultados obtenidos con el biosensor resultan totalmente comparables con los valores certificados para un nivel de significación del 95%, lo que pone de manifiesto la aplicabilidad práctica del optodo desarrollado para el análisis de colesterol en muestras de suero.

TABLA XXII. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL LIBRE EN MUESTRAS DE SUERO CERTIFICADO CON EL BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA.

| | <i>A. estándar</i> ⁽¹⁾ , mM | <i>Calibrado</i> ⁽²⁾ , mM | <i>Valor certificado</i> |
|---------------------------------|---|---|--------------------------|
| <i>Precinorm</i> [®] L | 1.2 \pm 0.2 | 1.1 \pm 0.2 (n = 5) | 1.0 \pm 0.2 |
| <i>Precilip</i> [®] | ----- | 1.0 \pm 0.1 (n = 5) | 1.1 \pm 0.2 |

⁽¹⁾ Pendiente: 26 \pm 2.

⁽²⁾ Pendiente: 24.0 \pm 0.6.

3.3.8. BIBLIOGRAFÍA.

- Albrecht, H.O. *Z. Phys. Chem.*, 1928, 136, 321.
- Allain, Ch.C; Poon, L.S; Chan, C.S.G; Richmond, W y Fu, P.C. *Clin. Chem.*, 1974, 20, 470.
- Ashani, Y y Catravas, G.N. *Anal. Biochem.*, 1980, 109, 55.
- Bergmeyer, H.U (ed.); Grassl, M y Walter, H.E. "Methods of Enzymatic Analysis". 3^{er} ed. VCH, Weinheim, W. Germany-Deerfield Beach, FL. 1983.
- Besombes, J.L; Cosnier, S; Labbé, P; Reverdy, G. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 317, 275.
- Betteridge, D; Wade, A.P y Howard, A.G. *Talanta*, 1985, 32, 709.
- Blum, L.J; Plaza, J.M y Coulet, P.R. *Anal. Lett.*, 1987, 20, 317.
- Braco, L; Darós, J.A; de la Guardia, M. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 129.
- Crumbliss, A.L; Stonehuerner, J.G; Henkens, R.W; Zhao, J; O'Daly, J.P; *Biosensors and Bioelectronics*, 1993, 8, 331.
- Chang, H.W y Bock, E. *Anal. Biochem.*, 1980, 104, 112.
- Charpentier, L; El Murr, N. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 318, 89.
- Demas, J.D. y DeGraff, B.A. *Anal. Chem.*, 1991, 63, 829A.
- Dong, S; Deng, Q; Cheng, G. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 279, 235.
- Fernández-Romero, J.M; Luque de Castro, M.D; Valcárcel, M. *Clin. Chim. Acta*, 1987, 167, 97.
- Fortman, S.P y Maron, D.J. *Sci. Am.*, 1993, 8, 1.
- Hall, G.F; Turner, A.P.F. *Anal. Lett.*, 1991, 24, 1375.
- Hasebe, K y Osteryoung, J. *Anal. Chem.*, 1975, 47, 2412.
- Huang, H; Kuan, J.W y Guilbault, G.G. *Clin. Chem.*, 1975, 21, 1605.
- Inouye, Y; Taguchi, K; Fuji, A; Ishimaru, K; Nakamura, S y Nomi, R. *Chem. Pharm. Bull.* 1982, 30, 951.

- Kaplan, L.A y Pesce, A.G (ed.). "Química Clínica. Teoría, análisis y correlación". Editorial Médica Panamericana, 1989.
- Karube, Y; Hara, K; Matsuoka, H; Suzuki, S. *Anal. Chim. Acta*, 1982, 139, 127.
- Kenney, W.C; Singer, T.P; Fukuyama, M y Miyake, Y. *J. Biol. Chem.*, 1979, 254, 4689.
- Koch, D.D; Hassemer, D.J; Wiebe, D.A y Laessig, R.H. *JAMA*, 1988, 260, 2552.
- Krug, A; Suleiman, A.A; Guibault, G.G. *Anal. Chim. Acta*, 1992a, 256, 263.
- Krug, A; Suleiman, A.A; Guibault, G.G; Kellner, R. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992b, 14, 313.
- Krug, A; Göbel, R; Kellner, R. *Anal. Chim. Acta*, 1994, 287, 59.
- Malavolti, N.L; Pilosof, D y Nieman, T.A. *Anal. Chim. Acta*, 1985, 174, 199.
- Markas, A; Gilmartin, T; Hart, J.P. *Analyst*, 1994, 119, 2331.
- Masoom, M; Townshend, A. *Anal. Chim. Acta*, 1985, 174, 293.
- Mike, J.H y Cleland, T.J. *Anal. Chim. Acta*, 1992, 259, 73.
- Motonaka, J; Faulkner, L.R. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3258.
- Nelder, J.A y Mead, R. *Computer, J.*, 1965, 7, 308.
- Noble, D. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 1037.
- Noma, A y Nakayama, K. *Clin. Chem.*, 1976, 22, 336.
- Petersson, B.A; Hansen, E.H y Ruzicka, J. *Anal. Lett.*, 1986, 19, 649.
- Rózycki, C. *Chem. Anal.*, 1993, 38, 381.
- Schaffar, B.P.H y Wolfbeis, O.S. *Biosensors*, 1990, 5, 137.
- Smith, A.G y Brooks, C.J.W. *Biochem. Soc. Trans.*, 1975, 3, 675.
- Spendley, W; Hext, G.R y Himsforth, F.R. *Technometrics*, 1962, 4, 441.
- Tietz, N.W. "Fundamentals of Clinical Chemistry". 3rd ed. Saunders, Philadelphia, 1987.
- Trettnak, W; Wolfbeis, O.S. *Anal. Biochem.*, 1990, 184, 124.
- Trettnak, W; Lioni, I; Mascini, M. *Electroanalysis*, 1993, 5, 753.

Valencia-González, M.J; Díaz-García, M.E. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 2726.

Völkl, K.P; Opitz, N y Lübbers, D.W. *Fres. Z. Anal. Chem.*, 1989, 301, 162.

Willet, W.C. *Science*, 1994, 264, 22.

Wolfbeis, O.S. "Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors", vol. I y II. CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1991.

Yalpani, M. *Chemistry & Industry*, 1996, 5, 85.

Yao, T; Wasa, T. *Anal. Chim. Acta*, 1988, 207, 319.

Yao, T; Satomura, M; Nakahara, T. *Anal. Chim. Acta*, 1994, 296, 271.

Zak, B y Artiss, J.D. *Microchem. J.*, 1990, 41, 251.

3.4. BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE COLINA y/o FOSFATIDILCOLINA.

3.4.1. Interés analítico de la determinación de fosfolípidos que contienen colina.

- 3.4.1.1. Interés clínico
- 3.4.1.2. Interés alimentario.

3.4.2. Revisión bibliográfica de los métodos analíticos para la determinación de fosfolípidos que contienen colina.

- 3.4.2.1. Métodos analíticos químicos y enzimáticos.
- 3.4.2.2. Sensores de fibra óptica o sensores electroquímicos.

3.4.3. Preparación de la fase sensora.

- 3.4.3.1. Elemento biológico: colina oxidasa y fosfolipasa-D.
- 3.4.3.2. Inmovilización enzimática y acoplamiento al sensor de O₂.
- 3.4.3.3. Optimización de la cantidad de enzima inmovilizada.

3.4.4. Determinación de colina mediante el empleo del biosensor.

- 3.4.4.1. Estudio del efecto del caudal y del volumen de inyección.
- 3.4.4.2. Estudio de la influencia de la disolución portadora en la respuesta del biosensor.
- 3.4.4.3. Influencia de la temperatura.
- 3.4.4.4. Características analíticas.
- 3.4.4.5. Estabilidad operacional.

3.4.5. Determinación de fosfatidilcolina mediante el empleo del biosensor.

- 3.4.5.1. Influencia de la composición del medio de reacción
- 3.4.5.2. Efecto del tiempo de incubación.
- 3.4.5.3. Características analíticas.

3.4.6. Aplicación analítica.

3.4.7. Bibliografía.

3.4. BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA.

Como mencionamos en el apartado 3.3, los fosfolípidos son lípidos abundantes en todas las membranas biológicas. Se trata de derivados del glicerol, o bien, de la esfingosina. Los primeros se denominan *fosfoglicéridos*; éstos están constituidos por un esqueleto de glicerol, dos cadenas de ácidos grasos (que suelen contener un número par de átomos de carbono, entre 14 y 24) y un alcohol fosforilado. Los alcoholes comunes de los fosfoglicéridos son la *colina*, *serina*, *etanolamina*, *glicerol* e *inositol*. En los fosfoglicéridos, los grupos hidroxilo en los carbonos C-1 y C-2 del glicerol están esterificados por dos grupos carboxilo de dos cadenas de ácido graso. El grupo hidroxilo del C-3 del esqueleto del glicerol se esterifica con ácido fosfórico y, posteriormente, el grupo fosfato se esterifica con el grupo hidroxilo de uno de los alcoholes mencionados anteriormente.

Los principales fosfoglicéridos son la *fosfatidilcolina*, la *fosfatidilserina* y la *fosfatidiletanolamina*. La *esfingomielina*, es otro tipo de fosfolípido cuya columna vertebral es la esfingosina en lugar del glicerol. El grupo hidroxilo primario de la esfingosina está esterificado a la fosforilcolina y su conformación se asemeja a la de la fosfatidilcolina.

Los fosfolípidos son componentes de todas las células animales y vegetales. Están presentes en abundancia en el cerebro, corazón, riñón, huevos, soja, etc..

3.4.1. INTERÉS ANALÍTICO DE LA DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS QUE CONTIENEN COLINA.

3.4.1.1. Interés clínico.

La fosfatidilcolina, conocida popularmente con el nombre de *lecitina*, cuya fórmula estructural se representa en la Figura 66, es el principal representante de los fosfolípidos que contienen colina; se encuentra en la mayoría de las membranas de organismos superiores y es el fosfolípido mayoritario (68 - 73%) en el suero y plasma.

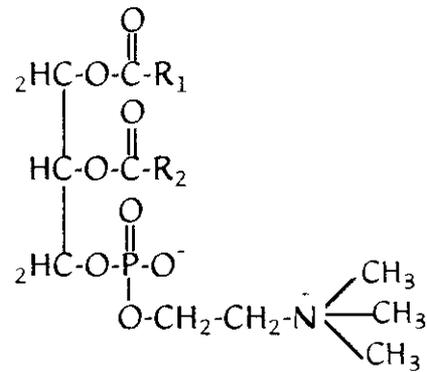


FIGURA 66. Fórmula estructural de la fosfatidilcolina (lecitina).

En la hidrólisis de la fosfatidilcolina se obtiene glicerol, 2 moles de ácidos grasos, ácido fosfórico y la base nitrogenada colina.

Las *lecitinas*, al igual que el colesterol, son constituyentes celulares comunes que se encuentran principalmente en tejidos animales, donde cumplen funciones estructurales (como parte de las membranas celulares) y metabólicas. Aunque no forman parte de los depósitos de grasas, constituyen una considerable proporción de los lípidos del hígado y del cerebro. También se encuentran en el plasma, como parte de los complejos lípidos-proteína, denominados *lipoproteínas* que desempeñan un papel preponderante en el transporte de lípidos. Asimismo, las *lecitinas* desempeñan un papel de importancia en la esterificación del colesterol libre para formar ésteres de colesterol.

Pero quizá, una de las funciones más importantes de la fosfatidilcolina es que actúa como precursor en la formación de la sustancia tensioactiva (“*surfactante*”) pulmonar del líquido amniótico. La similitud entre los ácidos grasos encontrados en el líquido amniótico y en los efluentes pulmonares del feto, en las diferentes etapas de la gestación, hace pensar que la presencia de fosfatidilcolina en el fluido amniótico tiene su origen en el desarrollo del tejido pulmonar del feto. La concentración de *lecitina* en el líquido amniótico, experimenta un notable aumento a medida que progresa la gestación (de 2.8 mg L⁻¹ en la semana n° 12 a 88 mg L⁻¹ al término del embarazo; (Gluck et al., 1973)), por lo que, su determinación es de gran importancia para asegurar la edad gestacional y el índice de madurez pulmonar fetal, así como, para la detección y diagnóstico de insuficiencia respiratoria del feto (Nelson, 1969; Gluk et al.,

1971; Bhagwanani et al., 1972). Generalmente, el procedimiento empleado para determinar la madurez del pulmón fetal es la estimación de la cantidad de lecitina y esfingomielina (expresado como la relación L/S) presente en el líquido amniótico.

3.4.1.2. Interés alimentario.

La lecitina se utiliza como aditivo (E-322) de aplicación generalizada en la industria alimentaria debido a sus propiedades emulsionantes. Se trata de un aditivo de origen natural que se extrae de la clara de huevo o de la soja y que no presenta toxicidad alguna. Se utiliza en la fabricación del chocolate, leche en polvo, helados y margarinas.

La función de los *emulsionantes* o *emulgentes* en la tecnología alimentaria está relacionada con el humedecimiento de superficies lipófilas, el incremento de la solubilidad, y sobre todo, con la *preparación y estabilización de dispersiones* de todo tipo, como por ejemplo agua y aceite en la mahonesa (en la cocina natural es la yema de huevo la que realiza esta función). La acción de los emulgentes se debe a su estructura molecular, con una parte lipófila que se disuelve bien en la fase no acuosa y otra parte, polar o hidrófila, que se disuelve bien en agua. Por otra parte, los emulsionantes mejoran la consistencia de los productos alimenticios industriales, haciéndolos más atractivos visualmente.

3.4.2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS QUE CONTIENEN COLINA.

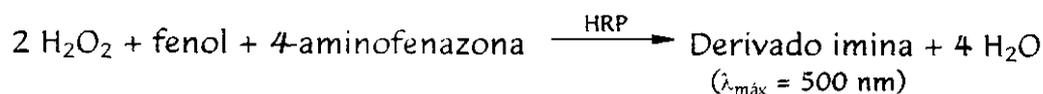
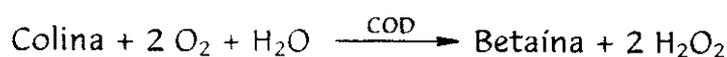
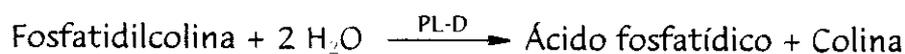
3.4.2.1. Métodos analíticos químicos y enzimáticos.

Tradicionalmente, uno de los procedimientos *químicos* más empleados para la determinación de fosfolípidos totales en suero consiste en la determinación del fósforo inorgánico en un extracto de suero (Hoeflmayr et al., 1966; Kaplan et al., 1989). En este tipo de técnicas, se extraen, en primer lugar, los lípidos del suero con un disolvente orgánico (generalmente, se utilizan mezclas etanol-éter, cloroformo-metanol o éter de petróleo) y, a continuación, se digiere el extracto que contiene los fosfolípidos para destruir el material orgánico y liberar el ortofosfato. La digestión se

efectúa con una mezcla de H_2SO_4 - H_2O_2 , HClO_4 o con HNO_3 . Finalmente, el fosfato presente en la mezcla digerida se hace reaccionar, en la mayoría de los casos, con molibdato amónico, reduciéndose a continuación, el fosfomolibdato amónico así formado, en condiciones tales, que eviten la reducción simultánea del exceso de molibdato. Se mide entonces el azul de molibdeno formado.

Entre los numerosos inconvenientes que presenta este método podemos citar su *complejidad y pobre precisión*, ya que, si no se observan cuidadosamente las condiciones de reacción, se pueden producir pérdidas, sobre todo, en las etapas de extracción y digestión. Además, se trata de un método *laborioso* que consume *mucho tiempo*, por lo que no resulta adecuado para análisis de rutina además, carece de la *selectividad* requerida pues, por este procedimiento, se determina el contenido total de fosfolípidos presentes en la muestra sin poder diferenciar los componentes individuales, para lo cual es necesario recurrir a una separación cromatográfica previa a la determinación.

Por el contrario, los **métodos enzimáticos** para la determinación de fosfolípidos que contienen colina, proporcionan mayor *exactitud, precisión, selectividad y rapidez* que los métodos químicos y requieren un menor volumen de muestra. Estos métodos se basan en la acción combinada de las enzimas fosfolipasa D (PL-D) y colina oxidasa (COD), que producen la *hidrólisis* de los fosfolípidos y la posterior *oxidación* de la colina liberada, respectivamente (Takayama et al., 1977; Anaokar et al., 1978; Gurantz et al., 1981; McGowan et al., 1983). Finalmente, el H_2O_2 producido durante la oxidación enzimática, se detecta espectrofotométricamente mediante una tercera reacción enzimática catalizada por la enzima peroxidasa (HRP). La secuencia de reacciones es la siguiente:



A pesar de que los procedimientos enzimáticos son más rápidos que los métodos químicos anteriormente mencionados, ya que no requieren las etapas de

extracción y digestión, las reacciones en las que intervienen las enzimas PL-D y HRP requieren largos tiempos de incubación (del orden de 30 minutos cada una).

3.4.2.2. Sensores de fibra óptica o sensores electroquímicos.

El único ejemplo encontrado en la bibliografía ha sido el descrito por Karube y col. (Karube et al., 1979) para la determinación de fosfatidilcolina en muestras de suero mediante un sensor amperométrico. Se trata de un sistema en flujo que incorpora las enzimas fosfolipasa D y colina oxidasa coinmovilizadas en un gel de agarosa y empaquetadas en un minirreactor de vidrio. El H_2O_2 liberado en la reacción enzimática se detecta mediante reducción amperométrica en un electrodo de Pt. El biosensor presenta un intervalo de respuesta lineal comprendido entre 0 - 3 g L⁻¹ de fosfatidilcolina. Sin embargo, uno de los inconvenientes del dispositivo es la estabilidad limitada que presentan las enzimas inmovilizadas, ya que al cabo de 9 días éstas han perdido un 30% de su actividad original.

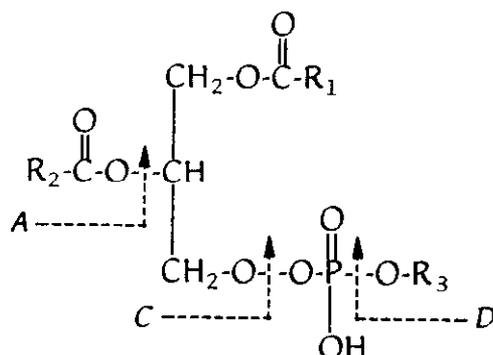
3.4.3. PREPARACIÓN DE LA FASE SENSORA.

La necesidad de obtener dispositivos que permitan reducir los tiempos y el costo del análisis con respecto a los métodos químicos existentes, así como eliminar los inconvenientes derivados de la detección espectrofotométrica del H_2O_2 (reacción irreversible; interferencia debida a algunos compuestos que pueden ser oxidados por el H_2O_2 y que a su vez inhiben la enzima HRP e.g. bilirrubina, ácido ascórbico y hemoglobina), nos ha llevado a estudiar la posibilidad de construir un biosensor de fibra óptica para la determinación de fosfatidilcolina, basado en las reacciones catalizadas por las enzimas PL-D y COD y detección del O_2 consumido en esta última reacción, mediante medidas de desactivación de la luminiscencia empleando un optodo de O_2 , igual al descrito en el capítulo 3.2.

3.4.3.1. Elemento biológico: fosfolipasa D y colina oxidasa.

Las fosfolipasas, (tipos A, C y D) (E.C.3.1.4.4) son un grupo de enzimas pertenecientes a la familia de la hidrolasas que poseen especificidades relativas diferentes, de manera que, cada fosfolipasa cataliza la hidrólisis de un enlace específico en un fosfolípido, como se indica en el esquema 7, donde R_1 y R_2 representan sendas moléculas de ácido graso y R_3 el resto alcohol.

De todas ellas, sólo la fosfolipasa D procedente de la especie *Streptomyces chromofuscus* cataliza preferentemente la hidrólisis de los fosfolípidos que contienen colina (Bergmeyer et al., 1983), los cuales suponen el 95% de los fosfolípidos presentes en el suero. La enzima presenta una actividad óptima a pH 8.0. La presencia de Triton X-100 e iones Ca^{2+} en la disolución estimulan la actividad enzimática, mientras que Ba^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , EDTA y SDS actúan como inhibidores.



ESQUEMA 7. Lugares posibles de hidrólisis de las fosfolipasas en una molécula de fosfolípido.

Por su parte, la colina oxidasa, abreviadamente COD (E.C.1.1.3.17), cataliza la oxidación de la (2-hidroxietil)trimetilamina (véase apartado 3.4.2.1), conocida con el nombre de colina, obtenida como producto en la hidrólisis enzimática de algunos fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y esfingomiélna). Como la mayoría de las flavoproteínas, la COD ejerce su acción catalítica mediante un mecanismo de reacción denominado tipo "ping pong" (Stemple et al., 1991), que involucra a los dos sustratos, colina y O_2 . La enzima presenta su máxima actividad en disolución en el intervalo de pH comprendido entre 7 - 8 (Ikuta et al., 1977; Ohta et al., 1980). Puede presentar reacciones competitivas con algunos compuestos de características similares a la colina tales como, la (2-hidroxietil)-N,N-dimetilamina, (2-hidroxietil)-N,N-dietilamina, (2-hidroxietil)-N-metilamina y (2-hidroxietil)-N-etilamina.

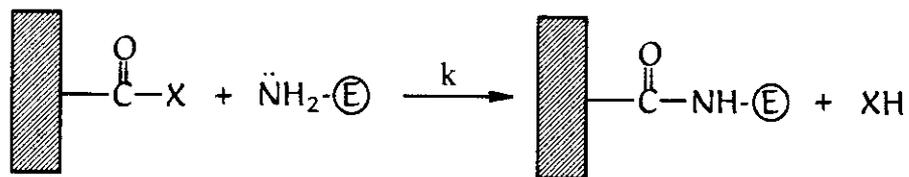
3.4.3.2. Inmovilización enzimática y acoplamiento al sensor de O_2 .

La inmovilización de la enzima COD se realizó de tres formas distintas (véase apartado 2.3.4). En primer lugar, se procedió a su inmovilización por *entrecruzamiento con glutaraldehído* sobre una superficie de carbón activo, adherido a una capa de silicona, que contiene el indicador luminiscente $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$,

sensible al O_2 . La ventaja de este procedimiento es que permite obtener una única fase sensible que combina el sensor de oxígeno y la enzima en una misma membrana, lo que, generalmente, da lugar a menores tiempos de respuesta y mayor reproducibilidad en las medidas.

Desafortunadamente, para las dos enzimas ensayadas (COD proveniente de *Alcaligenes*, 13 unidades mg^{-1} o de *Arthrobacter globiformis*, 10.2 unidades mg^{-1}) se obtuvieron sensores insensibles a variaciones en la concentración de colina debido probablemente, a una participación o modificación de los centros activos de la enzima en el proceso de entrecruzamiento con glutaraldehído. Es por ello, que se desestimó el empleo de este procedimiento de inmovilización.

En segundo lugar, se llevó a cabo una inmovilización de la enzima sobre membranas de inmunoafinidad tipo Inmobilon® (Millipore) (véase apartado 2.3.4), cuyo empleo ya había sido descrito anteriormente en el desarrollo de biosensores amperométricos para la determinación de pesticidas (*Palleschi et al., 1992; Bernabei et al., 1993*). Estas membranas de naturaleza hidrófila y estructura microporosa, poseen una superficie previamente activada (con grupos carbonilo), que permite la formación de enlaces covalentes con las proteínas sin pérdida de su actividad biológica (*Blankstein et al., 1985*). La inmovilización responde al siguiente esquema de reacción:



El empleo de las membranas de Inmobilon requiere usar una fase sensible formada por dos capas: la membrana enzimática y la membrana de silicona sensible al O_2 .

Los biosensores obtenidos por este procedimiento tampoco ofrecieron resultados satisfactorios, ya que aunque se comprobó que efectivamente se produce una variación de la señal de luminiscencia del complejo de Ru en presencia de una disolución de colina, la señal disminuye rápidamente tras el primer ciclo de medida. Esta falta de repetibilidad en la respuesta, también observada por otros autores,

(Mascini et al., 1987; Trettnak et al., 1988) se atribuye a la pérdida de una cierta cantidad de enzima que se encuentra débilmente enlazada a la superficie de la membrana de inmutafinidad.

Con el fin de superar los inconvenientes encontrados en los casos anteriores, se llevó a cabo un tercer procedimiento de inmutilización por *enlace covalente* sobre membranas de nylon. El método implica la activación previa del nylon, de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Hornby y col. (Hornby et al., 1975) (Figura 67), con el fin de introducir en su superficie grupos que sean capaces de enlazarse con las moléculas de enzima.

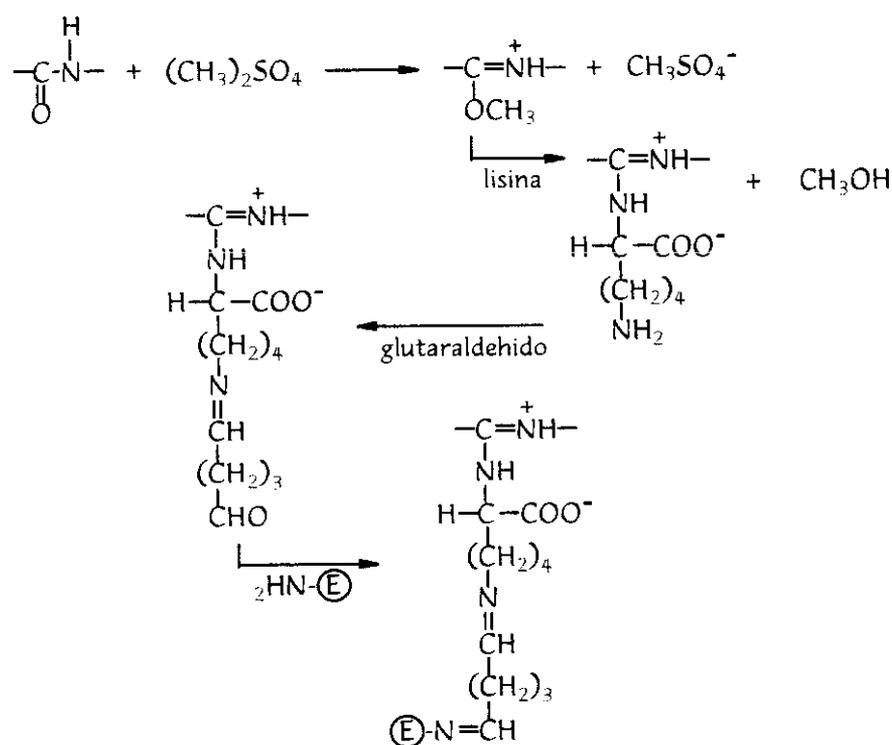


FIGURA 67. Secuencia de reacciones empleadas para la activación de nylon mediante O-metilación de enlaces amida y posterior inmutilización de la enzima.

Concretamente, la activación del soporte se llevó a cabo por O-metilación de los enlaces amida del nylon con un poderoso agente metilante (sulfato de dimetilo), dando lugar a las correspondientes *sales de imidato*. Éstas, a su vez, son capaces de reaccionar con agentes nucleófilos como aminas dando lugar a *amidinas*. Por esta razón, en una segunda etapa, el nylon activado se trata con una disolución de lisina que se utiliza como molécula espaciadora, para evitar el posible impedimento de tipo

estérico (Campbell et al., 1975) en la inmovilización enzimática. De esta forma, conseguimos un nylon funcionalizado que presenta grupos amino libres en su superficie. La etapa final supone la reacción de los grupos amino libres de la lisina con el agente bifuncional, glutaraldehído, y la posterior unión covalente de la enzima.

El éxito de la inmovilización está condicionado, en gran medida, por la etapa de activación con sulfato de dimetilo. Se ha comprobado que uno de los factores que más influyen sobre dicha reacción, es el tiempo de permanencia de la membrana en contacto con el agente metilante. Puesto que la reacción requiere condiciones muy drásticas (reactivo concentrado y en caliente), el tiempo de permanencia de la membrana de nylon en la disolución de sulfato de dimetilo ha de ser el suficiente para que se originen el mayor número de grupos activos sobre la superficie del soporte sin que se desintegre la membrana durante el ataque. En nuestro caso, se han probado tiempos de contacto de 5, 10 y 15 minutos, ya que para valores superiores a 15 minutos, se observa el ataque de la estructura del nylon y la consiguiente destrucción de la membrana.

Con el fin de comprobar la eficacia de la activación del nylon en función de los distintos tiempos ensayados, se procedió a realizar el siguiente estudio: a las membranas de nylon, una vez activadas por ataque con sulfato de dimetilo y posterior reacción con lisina, se les adicionan unas gotas de un reactivo, el ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico, que se utiliza para la identificación cualitativa de grupos amino primarios. Como resultado, las membranas se tiñen de un color anaranjado, cuya intensidad depende del número de grupos amino libres presentes en la superficie del nylon. Los espectros de reflectancia obtenidos para dichas membranas (Figura 68) demuestran que un tiempo de contacto de 15 minutos permite conseguir el máximo grado de funcionalización del soporte, lo cual favorece la fijación de mayor cantidad de enzima.

En estas condiciones, se consiguió con éxito la inmovilización de la enzima colina oxidasa de *Alcaligenes species*, obteniéndose membranas activas que una vez acopladas al sensor de O₂, responden de forma repetitiva a los cambios en la concentración de colina. Por ello, seleccionamos este procedimiento para la construcción del biosensor, a pesar de ser más largo y laborioso que los anteriormente citados, ya que proporciona una mayor estabilidad de la enzima inmovilizada. Al igual

que en el caso de las membranas de Inmobilon, el empleo de membranas de nylon también requiere usar una fase sensible compuesta por dos capas: la membrana de nylon donde se inmoviliza la enzima y la membrana de silicona sensible al O_2 . Lógicamente, en este caso, los tiempos de respuesta del sensor se ven afectados por los procesos de difusión, en primer lugar, de la colina a través de la membrana enzimática, y a continuación, del O_2 a través de la silicona.

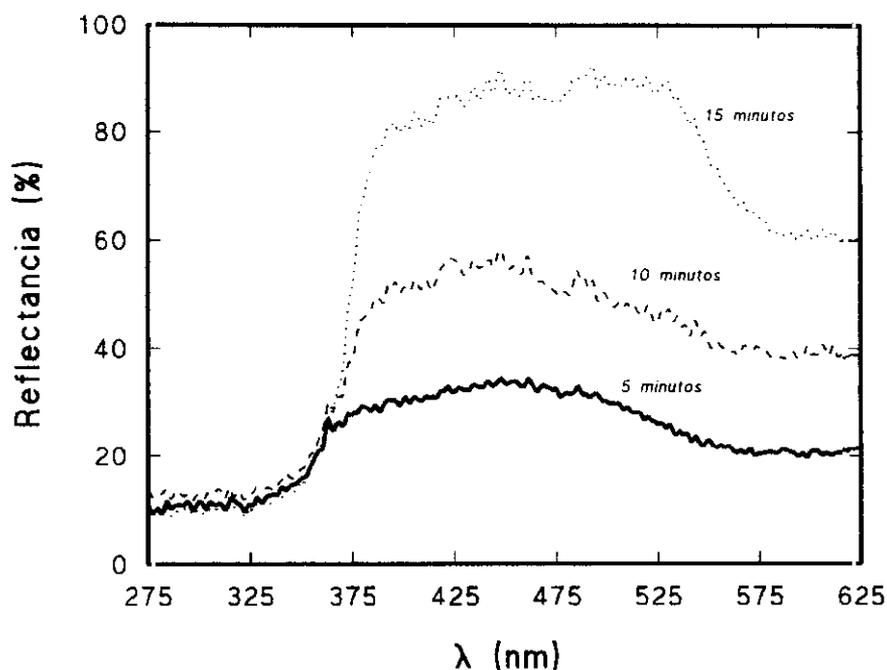


FIGURA 68. Espectros de reflectancia de las membranas de nylon activadas, tras su reacción con el ácido 2,4,6-trinitrobenceno sulfónico, en función del tiempo de contacto con el agente metilante, $(CH_3)_2SO_4$.

De la misma manera, se estudió la posibilidad de inmovilizar la fosfolipasa D procedente de *Streptomyces chromofuscus* en membranas de nylon, con el fin de coinmovilizar posteriormente las dos enzimas (fosfolipasa D y colina oxidasa) en una misma membrana y simplificar de esta forma, el diseño del biosensor. Desafortunadamente, la inmovilización de la fosfolipasa D condujo a una disminución considerable de su actividad enzimática, hecho que algunos autores (*Karube et al., 1979*) atribuyen a la probable inactivación enzimática provocada por el glutaraldehído. Por ello, se abandonó la idea de coinmovilizar ambas enzimas en la membrana de nylon y, para no complicar excesivamente el dispositivo experimental, se prefirió trabajar con la fosfolipasa D en disolución.

3.4.3.3. Optimización de la cantidad de enzima inmovilizada.

En este apartado, se procedió a evaluar la influencia de la cantidad de enzima COD presente en la membrana de nylon sobre la respuesta del biosensor hacia el sustrato colina. Para ello, según el procedimiento de inmovilización indicado en el apartado 2.3.4 de esta Memoria, se prepararon dos biosensores a partir de disoluciones de COD que contenían 5 y 10 mg mL⁻¹ de proteína (equivalentes a 65 y 130 U mL⁻¹), respectivamente. Se asume, que la concentración de enzima activa en la membrana es proporcional a su concentración en la disolución de partida. A continuación, se midió la respuesta de cada uno de los biosensores a disoluciones de colina de diferente concentración, inyectadas en un sistema de flujo. Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 69. El valor de la señal se expresa como altura del pico FIA obtenido tras inyectar las disoluciones patrón de colina.

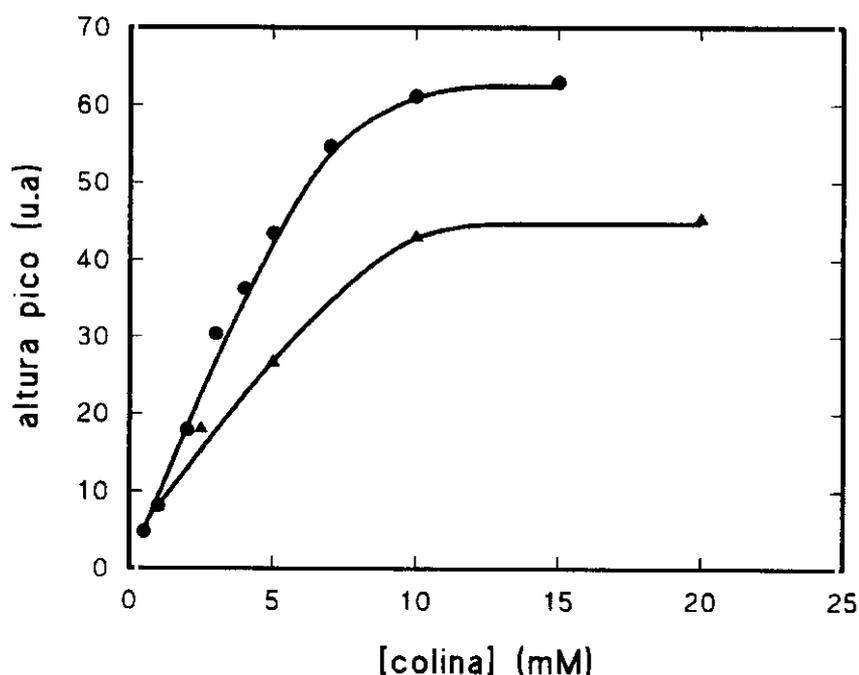


FIGURA 69. Efecto de la cantidad de colina oxidasa inmovilizada (▲) 65 U y (●) 130 U sobre la respuesta del biosensor hacia disoluciones de colina de distinta concentración.

Se observa un incremento en la *sensibilidad*, así como en el *intervalo de linealidad* del biosensor a medida que aumenta la cantidad de enzima inmovilizada. Por ello, se ha seleccionado para experimentos posteriores la cantidad de 10 mg mL⁻¹ (equivalente a 130 U mL⁻¹), ya que, para cantidades superiores, se comprobó que no

se inmoviliza en el soporte el 100% de la enzima presente en la disolución de partida, lo que da lugar a un gasto innecesario de la misma.

3.4.4. DETERMINACIÓN DE COLINA MEDIANTE EL EMPLEO DEL BIOSENSOR.

Puesto que el biosensor desarrollado en esta Memoria, para la determinación de fosfolípidos que contienen colina está basado en la detección de la colina producida tras la hidrólisis enzimática de dichos fosfolípidos, resulta fundamental, en primer lugar, optimizar todas aquellas variables que influyen en la respuesta del optodo hacia este analito. Las medidas realizadas con el biosensor, se han llevado a cabo empleando un método FIA, utilizando el dispositivo de medida indicado en el apartado 2.2.2.

3.4.4.1. Estudio del efecto del caudal y del volumen de inyección.

Para comprobar el efecto que produce la variación del *caudal* de las disoluciones de muestra a través de la célula de flujo, donde se sitúa el biosensor, sobre la respuesta del mismo, se varió éste entre 0.25 y 1.40 mL min⁻¹.

Se comprueba que la respuesta obtenida para una disolución de colina 1 mM resulta óptima para un caudal de 0.60 mL min⁻¹ ya que es el que proporciona el mejor compromiso entre la altura y la anchura a media altura de los picos FIA. Caudales inferiores originan un ligero aumento de la señal (inferior al 6.8%), con el consiguiente ensanchamiento de los picos debido a la dispersión del bolo de muestra, mientras que, caudales superiores causan una ligera disminución de la señal (inferior al 5%).

En cuanto al *volumen de inyección de muestra*, éste se varió entre 25 y 150 µL. Se comprueba que la respuesta obtenida para una disolución 1 mM de colina resulta constante y máxima para volúmenes de inyección superiores a 100 µL; no obstante, se eligió un volumen de 40 µL para posteriores experimentos, en primer lugar, porque la señal analítica observada en estas condiciones es tan sólo un 4% inferior a la máxima obtenida y, en segundo lugar, porque se consume menor cantidad de muestra, disminuyendo además, el tiempo necesario para el análisis.

3.4.4.2. Estudio de la influencia de la disolución portadora en la respuesta del biosensor.

a) Selección del medio regulador. Efecto del pH.

Se ha ensayado el efecto que produce la naturaleza de distintas disoluciones amortiguadoras tales como *fosfato*, *borato*, *HEPES*, *TRIS* y *glicina* de concentración 0.1 M y pH 8.0, sobre la respuesta del biosensor al inyectar una disolución de colina 4 mM en dichos portadores. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 70. Como se observa en dicha gráfica, de las distintas disoluciones reguladoras estudiadas, los mejores resultados se obtienen empleando tampón fosfato o glicina, siendo los valores correspondientes a este último ligeramente superiores. Sin embargo, para la glicina se obtienen picos FIA ligeramente más estrechos que para el fosfato, por lo que se decidió seleccionar la primera como disolución reguladora de trabajo.

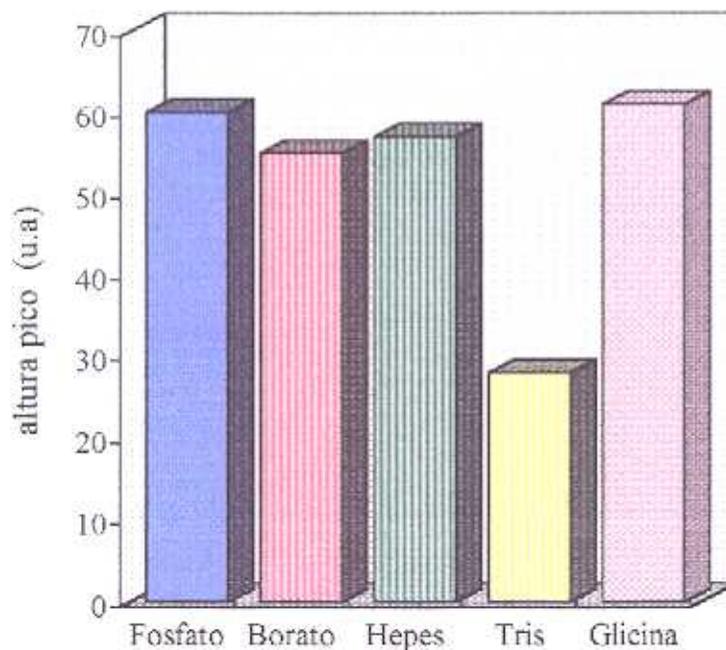


FIGURA 70. Efecto de la naturaleza de la disolución reguladora (0.1 M, pH 8.0) sobre la respuesta del biosensor a una disolución de colina 4 mM.

El tampón biológico HEPES, proporciona una *pobre repetibilidad* de la señal analítica, la cual va disminuyendo paulatinamente en los sucesivos ciclos de medida. Sin embargo, la peor respuesta de todas las obtenidas corresponde a la disolución amortiguadora de 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol, abreviadamente TRIS, el

cual, a pesar de ser uno de los tampones biológicos más utilizados, no siempre proporciona buenos resultados (Perrin et al., 1974).

Una vez seleccionada la disolución reguladora, pasamos a determinar el pH óptimo de funcionamiento de la enzima inmovilizada, para lo cual se prepararon disoluciones reguladoras de glicina 0.1 M y diferente pH (comprendido entre 7.5 - 9.0) midiendo la respuesta del biosensor frente a una disolución de colina 4 mM. La TABLA XXIII muestra la respuesta obtenida con el biosensor en función del pH de la disolución reguladora empleada como portador.

La máxima señal se obtiene para un valor de pH de 8.5, el cual es ligeramente más básico que el valor óptimo de la enzima en disolución (7 - 8) (Ikuta et al., 1977; Ohta et al., 1980); no obstante, está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores para la COD inmovilizada (Rouillon et al., 1992; Gerrieri et al., 1995).

TABLA XXIII. EFECTO DEL pH EN LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR A UNA DISOLUCIÓN DE COLINA 4 mM EN UNA DISOLUCIÓN REGULADORA DE GLICINA 0.1 M.

| <i>pH</i> | altura pico ($\pm s$), (u.a) (n = 3) |
|-----------|---|
| 7.5 | 34.1 (0.3) |
| 8.0 | 38.6 (0.5) |
| 8.5 | 40.6 (0.3) |
| 9.0 | 33.2 (0.7) |

Algunos autores (Segel, 1975; Cornish-Bowden, 1976) han sugerido que los iones hidrógeno actúan como inhibidores competitivos de la enzima colina oxidasa ya que, al disminuir el pH, se produce la *protonación* de algunos grupos de la enzima, originándose *formas iónicas*, que presentan *menor afinidad* por el sustrato y/o *distinta estabilidad*.

b) Influencia de la concentración de la disolución portadora.

Se ha ensayado el efecto que produce la variación de la concentración de la disolución reguladora de glicina a pH 8.5 (en el intervalo 10 - 200 mM), sobre la

respuesta del biosensor hacia una disolución de colina 2.5 mM. Se comprobó que la señal analítica no se modifica significativamente en el intervalo estudiado; si bien, se observó una ligera disminución de la respuesta para concentraciones de tampón glicina superiores a 100 mM, que puede estar ocasionada por la pérdida de actividad enzimática. Por ello, decidimos utilizar para estudios posteriores una concentración de tampón 50 mM.

TABLA XXIV. VARIACIÓN DE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR A UNA DISOLUCIÓN DE COLINA 2.5 mM EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN UTILIZADO COMO PORTADOR (Glicina pH 8.5).

| [Glicina] | altura pico ($\pm s$), (u.a) (n = 3) |
|-----------|---|
| 10 | 11.0 (0.6) |
| 50 | 12.5 (0.4) |
| 100 | 11.3 (0.3) |
| 200 | 9.4 (0.1) |

3.4.4.3. Efecto de la temperatura.

La Figura 71 muestra la dependencia de la respuesta del biosensor con la temperatura. En el intervalo comprendido entre 15-25 °C la respuesta resulta máxima y constante; sin embargo, a partir de 25 °C comienza a disminuir notablemente. Considerando estos resultados, se eligió una temperatura de trabajo de 20 °C de forma que una ligera variación de la misma no provocara una modificación importante de la señal analítica.

3.4.4.4. Características analíticas.

Empleando las condiciones óptimas de trabajo, se procedió, a continuación, a determinar el intervalo de linealidad del calibrado, así como, la precisión, límite de detección y selectividad del método de determinación de colina con el sensor de fibra óptica.

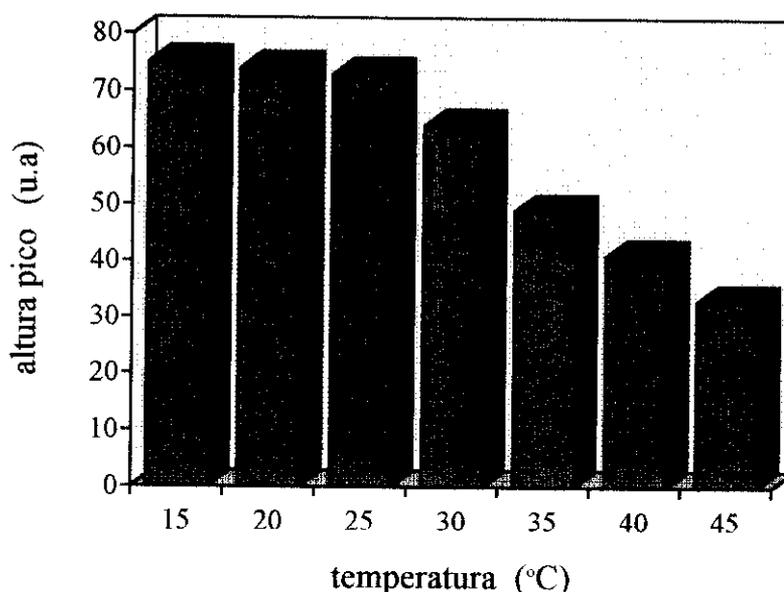


FIGURA 71. Efecto de la temperatura sobre la señal analítica correspondiente a una disolución de colina 4 mM en tampón glicina 50 mM y pH 8.5.

a) Calibrado.

Para conocer el intervalo de concentraciones en el que existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración de colina, se prepararon una serie de disoluciones patrón del analito de concentración comprendida entre 0 y 10 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 72, en la cual se representa la variación de la respuesta del sensor al inyectar disoluciones de colina de distinta concentración, en una disolución portadora compuesta por un tampón glicina 50 mM a pH 8.5 y $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, así como la recta de calibrado obtenida en las condiciones de medida. A partir de ella, se concluye que el intervalo de respuesta lineal del biosensor de fibra óptica se sitúa entre 0.05 y 5 mM de colina. Para concentraciones superiores la respuesta sigue un comportamiento no lineal, llegando a aparecer una meseta que indica la concentración de saturación en las condiciones de medida utilizadas (disoluciones equilibradas con aire). La ecuación de ajuste por mínimos cuadrados correspondiente a la recta de calibrado es la siguiente: $h = (8.8 \pm 0.2) [\text{colina}] + (0.1 \pm 0.5)$ ($r = 0.999$), para un límite de confianza del 95%, donde h representa la altura del pico FIA correspondiente a cada disolución patrón de colina cuya concentración viene expresada en mmol L^{-1} .

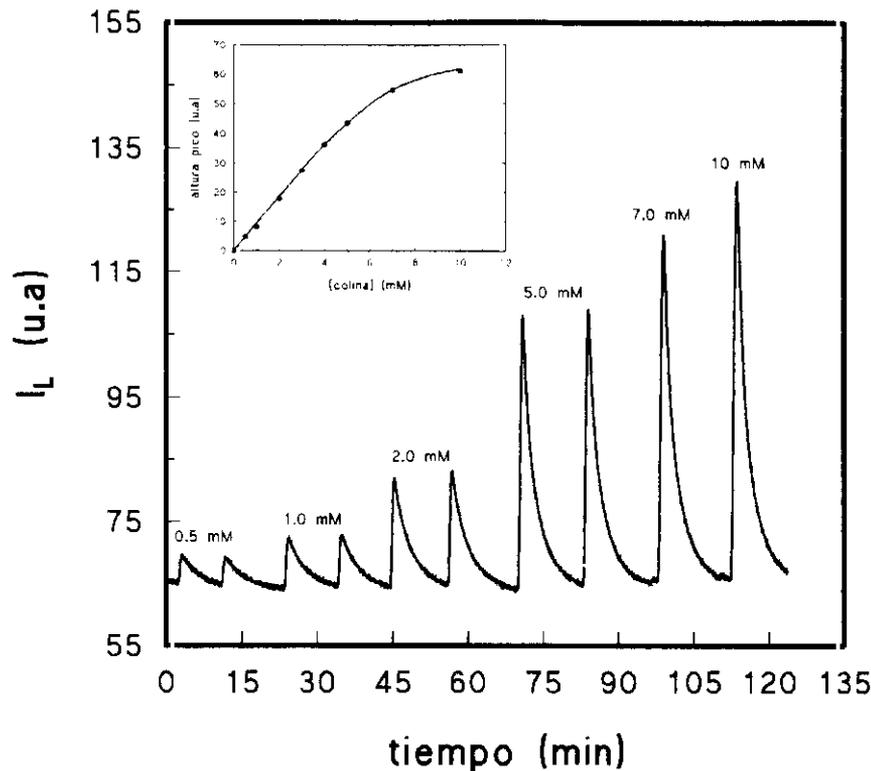


FIGURA 72. Perfiles de respuesta del biosensor frente a disoluciones de concentración variable de colina. Figura insertada: Calibrado del biosensor de colina en tampón glicina 50 mM, a pH = 8.5, T = 20 °C. (Cada punto corresponde al valor medio de tres inyecciones de muestra).

b) Precisión y límite de detección.

La *precisión* del biosensor en su respuesta a colina se evaluó siguiendo los criterios habituales descritos en esta Memoria. Para ello se prepararon tres disoluciones de distinta concentración de colina, 1.0, 2.5 y 4.0 mM, respectivamente y se calculó la desviación estándar relativa (RSD) correspondiente a 8 inyecciones consecutivas de cada muestra, obteniéndose valores de 7, 3.0 y 2.6%, respectivamente.

Para determinar el *límite de detección*, se ha aplicado el criterio sugerido por la IUPAC (Hasebe et al., 1975):

$$L.D = 3 S_b/m$$

donde m es la pendiente del calibrado lineal obtenido y S_b es la desviación estándar (en alturas) obtenida para el blanco. Al igual que se mencionó en el apartado 3.3.4.2, debido a que los picos FIA correspondientes a una disolución del blanco no se distinguían de la señal obtenida para la línea base, el límite de detección se ha calculado tomando como estimador de S_b el obtenido para una concentración 0.1 mM

de colina, próxima a la concentración menor del intervalo de linealidad del optodo. De esta forma, se obtiene un valor para el límite de detección de 0.05 mM de colina.

c) Estudio de interferencias.

Se ha ensayado el efecto que produce la presencia de algunas sustancias que podrían interferir en la determinación de colina en muestras de suero, ya que afectan, bien a la actividad de la COD, o bien, al sensor de O₂ utilizado como transductor de la reacción enzimática. Los resultados obtenidos se recogen en la TABLA XXV, donde se ha representado la sensibilidad relativa del biosensor hacia una disolución 2.5 mM de colina en las condiciones de medida (disoluciones equilibradas al aire, tampón glicina 50 mM, pH 8.5, 20 °C) y en presencia de diferentes especies. Cada valor representa la media de tres inyecciones. El criterio para considerar interferencia se fijó en 2s siendo s la desviación estándar de las señales obtenidas en ausencia del elemento interferente.

TABLA XXV. ESTUDIO DE DISTINTAS ESPECIES INTERFERENTES SOBRE LA RESPUESTA DEL BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA A UNA DISOLUCIÓN DE COLINA 2.5 mM, EN LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE MEDIDA (Tampón glicina 50 mM, pH 8.5, T = 20 °C).

| <i>Interferente</i> | <i>Anál:Interf.</i> | <i>Sens. relativa.⁽¹⁾ (%)</i> |
|------------------------|---------------------|--|
| <i>Acido ascórbico</i> | 1:0.1 | 97 |
| | 1:1 | 135 |
| | 1:5 | 140 |
| <i>Ácido úrico</i> | 1:1 | 103 |
| | 1:2 | 99.5 |
| <i>Glucosa</i> | 1:5 | 104 |
| <i>Bilirrubina</i> | 1:0.1 | 96 |
| <i>Etanolamina</i> | 1:1 | 105 |
| | 1:10 | 103 |
| <i>D,L-Serina</i> | 1:1 | 106 |
| | 1:2 | 117 |

⁽¹⁾ Expresada como la relación de las señales correspondientes a la colina en presencia del interferente y a la colina en ausencia de interferente.

Según se desprende de los datos recogidos en la TABLA XXV, únicamente la presencia de ácido ascórbico (analito:interferente $\geq 1:1$) y de serina (analito:interferente $\geq 1:2$) interfieren en la cuantificación de colina con el biosensor de fibra óptica. Al igual que mencionamos en el apartado 3.3.4.3, la interferencia positiva observada en presencia de ácido ascórbico se debe, sin duda, al poder *reductor* de este compuesto, el cual es oxidado por el O_2 disuelto presente en las disoluciones. En cuanto a la interferencia ocasionada por la serina, puede tener su origen en la semejanza estructural de este aminoácido con la colina. El resto de las sustancias ensayadas no interfieren en la determinación de colina, incluso a niveles de concentración muy superiores a los encontrados en muestras biológicas.

3.4.4.5. Estabilidad operacional.

Las enzima colina oxidasa en disolución acuosa presenta una estabilidad muy limitada, ya que, al cabo de dos días, ésta ha perdido el 80% de su actividad (*Karube et al., 1979*). Con objeto de evaluar la estabilidad operacional de la enzima inmovilizada y por tanto, el tiempo de vida útil del biosensor, se ha comparado la respuesta obtenida al inyectar disoluciones de colina de concentración 3 mM, en las condiciones óptimas de trabajo, a lo largo de diversos días.

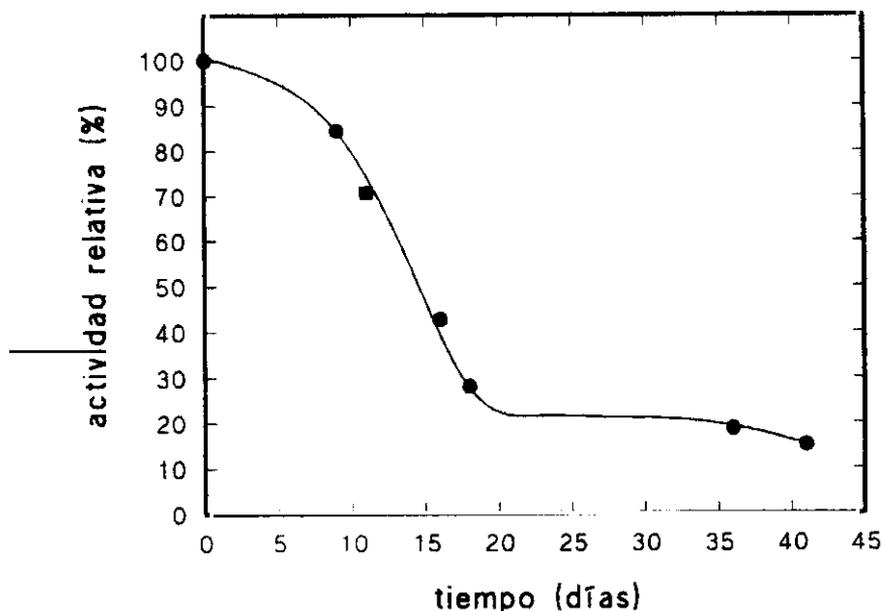


FIGURA 73. Evolución de la respuesta (en términos de actividad relativa) de la enzima colina oxidasa hacia una disolución de colina 3.0 mM en las condiciones óptimas de trabajo (tampón glicina 50 mM, pH 8.0, 20 °C), en función del tiempo transcurrido desde la inmovilización.

En la Figura 73 se ha representado la evolución en la respuesta de la membrana enzimática (expresada en términos de actividad relativa), con el tiempo transcurrido desde su fabricación. Los resultados indican que el biosensor se mantiene operativo durante un período aproximado de 15 días (durante los cuales se realizaron 115 inyecciones de muestra), ya que, pasado ese tiempo, la actividad de la enzima se reduce prácticamente a un 80% de su valor inicial. Estos resultados son un claro ejemplo de como, en muchos casos, la inmovilización de las enzimas permite además, de su uso en un sistema en flujo, incrementar el tiempo de vida útil de las mismas.

3.4.5. DETERMINACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA MEDIANTE EL EMPLEO DEL BIOSENSOR.

Una vez estudiado y caracterizado el biosensor de colina, se utilizó este dispositivo para su aplicación a la determinación de fosfatidilcolina (como principal representante de los fosfolípidos que contienen colina), tras someter ésta a una hidrólisis enzimática previa, según se indicó en el apartado 2.4.4. Las primeras experiencias se dirigieron a estudiar algunos factores que afectan a la hidrólisis enzimática de este compuesto, tales como, la composición del medio de reacción y el tiempo de incubación, obteniéndose los resultados que se describen a continuación.

3.4.5.1. *Influencia de la composición del medio de reacción.*

a) Naturaleza de la disolución reguladora.

Habitualmente, la hidrólisis enzimática de la fosfatidilcolina se lleva a cabo por incubación de la muestra con una cierta cantidad de la enzima fosfolipasa D, utilizando como medio de reacción una disolución reguladora TRIS 50 mM a pH 8.0, en presencia de iones Ca^{2+} y el tensioactivo Triton X-100 (Takayama et al., 1977). Sin embargo, según se indicó en el apartado 3.4.4.2, el tampón TRIS no resulta un medio adecuado para el funcionamiento del biosensor de colina, por lo que se evaluó la posibilidad de modificar la composición del medio de reacción donde se lleva a cabo la hidrólisis de la fosfatidilcolina. Para este estudio, se prepararon disoluciones amortiguadoras de glicina, fosfato y TRIS, 50 mM a pH 8.0 que contenían 2 mg mL^{-1} de fosfatidilcolina, 0.08 g L^{-1} de Ca^{2+} y 5 g L^{-1} de Triton X-100. Las disoluciones se incuban durante 20 minutos a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, con 33 U de fosfolipasa D y, transcurrido este

tiempo, se inyectan 40 μL de muestra en el sistema de flujo, utilizando como portador una disolución reguladora 50 mM de pH = 8.0, midiéndose la concentración de colina en las muestras con el biosensor de fibra óptica.

Aunque no se han observado diferencias significativas en las señales obtenidas con los tampones fosfato y TRIS (véase TABLA XXVI), el primero permite obtener mayor precisión en las determinaciones. Por ello, se ha seleccionado esta disolución reguladora para el resto de los experimentos, tanto para la incubación de la muestra de fosfatidilcolina con fosfolipasa D, como disolución portadora para el sistema FIA utilizado para la medida con el biosensor de colina.

TABLA XXVI. INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA DISOLUCIÓN REGULADORA SOBRE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA ENZIMA FOSFOLIPASA D.

| TAMPÓN | altura pico ($\pm s$), (u.a) (n = 3) |
|---------|---|
| Glicina | 8.0 (0.5) |
| Fosfato | 14.3 (0.1) |
| TRIS | 15.0 (2.0) |

b) Efecto de la cantidad de agente tensioactivo presente en la disolución.

Se ha examinado el efecto que produce la presencia de una cierta cantidad de Triton X-100 en las disoluciones de medida sobre la hidrólisis de la fosfatidilcolina, ya que este tensioactivo, además de favorecer la solubilización del fosfolípido, es un conocido activador junto con los iones Ca^{2+} de la fosfolipasa D (Imamura et al., 1977).

Con este fin, se prepararon disoluciones que contenían una cantidad constante de fosfatidilcolina (5 mg mL^{-1}) e iones Ca^{2+} (0.08 mg mL^{-1}), así como cantidades crecientes de Triton X-100 (entre 0.1-1.0% (p/p)). Estas disoluciones, tras la incubación con fosfolipasa D, se inyectan en el sistema de flujo para evaluar la cantidad de colina producida y, por tanto, la eficacia de la hidrólisis en cada caso.

Para experiencias posteriores se ha seleccionado una cantidad de un 1% de Triton X-100 porque, de esta forma, nos aseguramos la disolución completa de la muestra (para cantidades inferiores al 0.5% las disoluciones quedan turbias) y se obtienen, por tanto, mejores respuestas (TABLA XXVII).

TABLA XXVII. EFECTO DE LA CANTIDAD DE TENSIOACTIVO PRESENTE EN LA DISOLUCIÓN REGULADORA (Fosfato 50 mM, pH 8.0, en presencia de Ca^{2+} 0.08 g L^{-1}), SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA FOSFOLIPASA D. (Incubación: 20 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$; Detector: biosensor de fibra óptica para colina).

| [TRITON X-100], %(p/p) | altura pico ($\pm s$), (u.a) (n = 3) |
|---------------------------|---|
| 0.1 | ----- |
| 0.2 | 1.0 (0.1) |
| 0.5 | 7.0 (0.4) |
| 1.0 | 8.0 (0.3) |

Asimismo, para asegurar el correcto funcionamiento de la fase sensible comprobamos que la presencia del agente tensioactivo en las disoluciones de medida no ejerce ningún efecto negativo sobre la enzima colina oxidasa, ya que la respuesta del biosensor hacia colina no sufre ninguna modificación por la adición de distintas cantidades de Triton X-100 en el intervalo de concentraciones estudiado (0.1 - 1.0 %).

3.4.5.2. Efecto del tiempo de incubación.

Con el fin de evaluar el tiempo necesario para obtener la hidrólisis completa de la fosfatidilcolina, se prepararon disoluciones de este fosfolípido (5 mg mL^{-1}) en el medio de reacción seleccionado en experimentos precedentes y, a continuación, tras someterlas a diferentes tiempos de incubación a la temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$, se inyectaron en el sistema de flujo, registrando la señal producida en cada caso. Los resultados representados en la Figura 74 ponen de manifiesto el incremento de la señal analítica a medida que aumenta el tiempo de incubación (entre 2 - 20 minutos), seleccionándose como valor óptimo un tiempo de 20 minutos. Para tiempos inferiores se observó un aumento progresivo de la señal analítica tras la primera inyección, lo

cual indica que la hidrólisis no se ha completado en el tiempo seleccionado. Sin embargo, tras 20 minutos de incubación no se observa esta deriva de la señal.

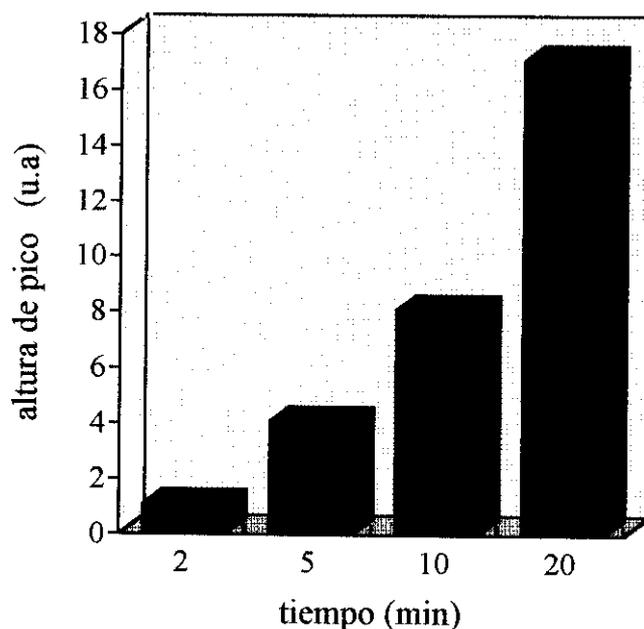


FIGURA 74. Optimización del tiempo de incubación para una disolución de fosfatidilcolina (5 mg mL^{-1}) en tampón fosfato 50 mM , $\text{pH } 8.0$; 1% Triton X-100; 0.08 mg mL^{-1} CaCl_2 . Temperatura de incubación: 37°C . Detector: biosensor de fibra óptica para colina.

3.4.5.3. Características analíticas.

Una vez optimizadas las condiciones de trabajo, se procedió a determinar las características analíticas del método propuesto para la determinación de fosfatidilcolina con el biosensor de fibra óptica.

a) Calibrado.

Los calibrados del biosensor se realizaron preparando disoluciones de fosfatidilcolina en el intervalo de concentraciones comprendido entre $0.5 - 5 \text{ mg mL}^{-1}$, según el procedimiento descrito en el apartado 2.4.4. En la Figura 75 se muestra la respuesta típica del biosensor y el calibrado obtenido en las condiciones de medida optimizadas previamente.

La respuesta resulta lineal en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.08 y 3.0 mg mL^{-1} de fosfatidilcolina, siendo la ecuación que define la recta de calibrado la siguiente: $h = (4.7 \pm 0.3) [\text{fosfatidilcolina}](\text{mg mL}^{-1}) + (0.0 \pm 0.5)$ ($r = 0.999$), donde h representa la altura del pico FIA.

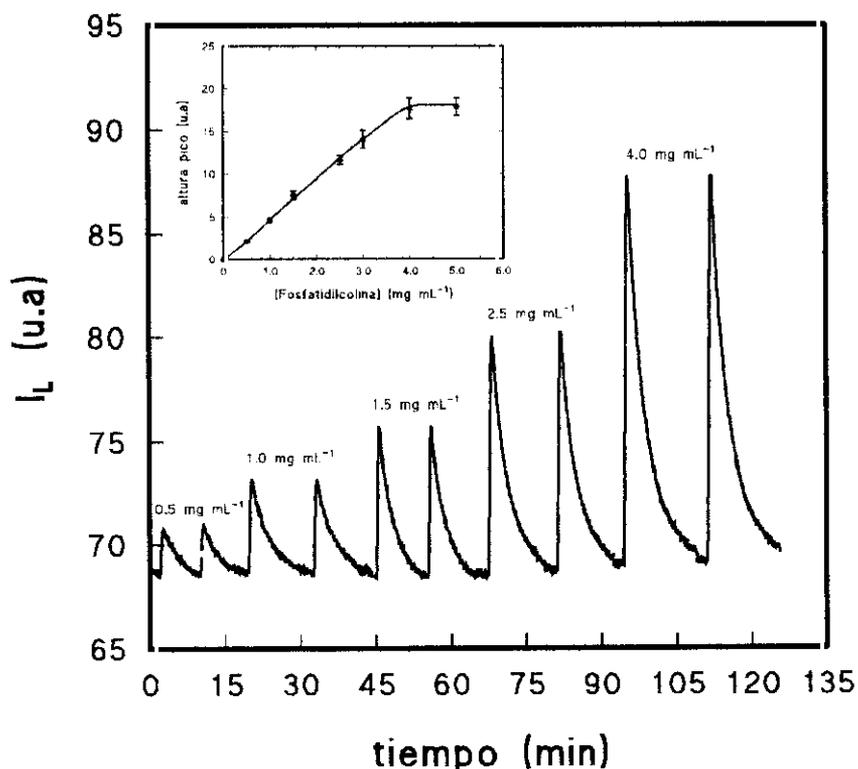


FIGURA 75. Respuesta característica del optodo para colina en función de la concentración de fosfatidilcolina presente en las muestras. Figura insertada: Calibrado del biosensor en el intervalo de concentraciones estudiado. (Tiempo de incubación de las muestras: 20 min, en presencia de 33 U de fosfolipasa D. Cada punto corresponde al valor medio de tres inyecciones de muestra).

b) Precisión y límite de detección.

La *precisión* del optodo en su respuesta a fosfatidilcolina, se evaluó en términos de la desviación estándar relativa (RSD) para 5 determinaciones análogas de muestras de fosfatidilcolina a dos niveles de concentración (1 y 2.5 mg mL⁻¹), obteniéndose valores de 5.4 y 3%, respectivamente.

Para calcular el *límite de detección*, se ha utilizado el criterio habitual $LD = 3 S_b/m$ (Hasebe et al., 1975), recomendado por la IUPAC, donde m es la pendiente del calibrado lineal obtenido y S_b es la desviación estándar (en alturas) calculada a partir de diez inyecciones de una muestra que contiene 0.3 mg mL⁻¹ de fosfatidilcolina, próxima a la concentración menor del intervalo de linealidad del optodo. El límite de detección obtenido resulta ser de 0.08 mg mL⁻¹ de fosfatidilcolina.

c) Estudio de interferencias.

A pesar de la especificidad de la fosfolipasa D, se ha encontrado que la que procede de la especie *Streptomyces* puede catalizar la hidrólisis de otros fosfolípidos, como es el caso de la lisofosfatidilcolina y la esfingomielinea (*Gurantz et al., 1981*) que, sin embargo, están presentes en suero o plasma en cantidades muy inferiores a la fosfatidilcolina. Se ha analizado la respuesta del sistema para una disolución de 2.0 mg mL⁻¹ del analito en presencia de estas biomoléculas, y los resultados obtenidos para relaciones fosfatidilcolina/lisofosfatidilcolina igual a 1:0.11 (sensibilidad relativa, 105%) y fosfatidilcolina/esfingomielinea igual a 1:0.25 (sensibilidad relativa, 103%), (que coinciden con la distribución normal de estos compuestos en las fracciones fosfolípicas de suero o plasma), demuestran que la respuesta del biosensor no se modifica significativamente por la presencia de estas especies. El criterio para considerar interferencia se fijó en 2s siendo s la desviación estándar de las señales obtenidas en ausencia del elemento interferente.

Podemos concluir, por tanto, que la lisofosfatidilcolina y la esfingomielinea no producen interferencia en la determinación de fosfatidilcolina a los niveles de concentración ensayados.

3.4.6. APLICACIÓN ANALÍTICA.

El biosensor de fibra óptica desarrollado en el presente trabajo se ha aplicado a la determinación de fosfatidilcolina en muestras de suero. El intervalo normal de concentraciones de fosfolípidos en plasma se encuentra entre 2.5-3.0 mM, siendo el constituyente principal la fosfatidilcolina (*Kaplan et al., 1989*). Se eligieron para ello dos muestras de suero comerciales *Precinorm L*[®] y *Precinorm U*, la primera de las cuales posee un contenido certificado en fosfatidilcolina de 1.70 ± 0.34 mg mL⁻¹. Para llevar a cabo los análisis se procedió del siguiente modo: las muestras de suero liofilizado se reconstituyen con 3 mL de la disolución portadora, siendo necesaria una dilución posterior de las mismas. A continuación, tras incubar las muestras con 33 unidades de fosfolipasa D durante 20 minutos a 37 °C, se inyectaron 40 µL en el sistema de análisis en flujo a través de un filtro de disco de membrana (Millipore, 0.25 µm) para evitar la posible obturación de la válvula de inyección.

Se preparó una recta de calibrado en el intervalo de concentración de fosfatidilcolina comprendido entre 0.0 - 1.5 mg mL⁻¹, y se calculó, a partir de éste, el contenido en fosfatidilcolina para 3 determinaciones análogas de cada muestra, obteniéndose los resultados que aparecen en la TABLA XXVIII. Con el fin de controlar la presencia de elementos interferentes se aplicó el método de adiciones estándar, obteniéndose pendientes que no diferían significativamente ($\alpha = 0.05$) de las del calibrado; ello puso de manifiesto la inexistencia de efecto matriz en las muestras de suero analizadas y, por tanto, la innecesidad de emplear el método de adiciones estándar, lo que confiere mayor rapidez al procedimiento propuesto.

TABLA XXVIII. DETERMINACIÓN DE FOSFATIDILCOLINA EN MUESTRAS DE SUERO COMERCIALES EMPLEANDO EL BIOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA.

| | <i>A. estándar , mM</i> | <i>Calibrado, mM</i> | <i>Valor certificado</i> |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>Precinorm® L</i> | 1.3 ± 0.2 | 1.3 ± 0.1 (n = 3) | 1.70 ± 0.34 |
| <i>Precinorm® U</i> | 1.9 ± 0.1 | 1.8 ± 0.2 (n = 3) | ---- |

En el caso de la muestra correspondiente al suero Precinorm® L, el resultado obtenido con el biosensor resulta totalmente comparable con el valor certificado para un nivel de significación del 95%. Para la muestra de suero Precinorm®U, al no disponerse de un valor certificado con el que poder contrastar nuestros resultados, se procedió a realizar un estudio de recuperación, para lo cual se adicionaron cantidades conocidas de fosfatidilcolina a una alícuota del suero, determinándose a continuación, tras la hidrólisis enzimática, el contenido total de fosfatidilcolina presente en dichas muestras.

Los resultados obtenidos (TABLA XXIX) indican valores de recuperación comprendidos entre un 95 - 98%, lo cual demuestra la validez del método propuesto para el análisis de fosfatidilcolina en muestras de suero.

TABLA XXIX. ESTUDIO DE RECUPERACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE FOSFATIDILCOLINA EN UNA MUESTRA DE SUERO COMERCIAL.

| | Fosfatidilcolina añadida, mg mL ⁻¹ | Fosfatidilcolina encontrada, mg mL ⁻¹ | Recuperación ^a % |
|---------------------|---|--|--------------------------------|
| Precinorm® U | 0 | 0.34 | ---- |
| | 0.5 | 0.80 | 95 |
| | 1.0 | 1.32 | 98 |

^a Media de tres determinaciones.

3.4.7. BIBLIOGRAFÍA.

- Anaokar, S; Garry, P.J y Standefer, J.C. *Clin. Chem.*, 1978, 25, 103.
- Bernabei, M; Chiavarini, S; Cremisini, C y Palleschi, G. *Biosens. and Bioelectronics*, 1993, 8, 265.
- Blankstein, L.A y Dohrman, L. *Amer. Clin. Prod. Rev.*, 1985, 4, 33.
- Bhagwanani, S.G; Fahmy, D y Turnbull, A.C. *Lancet*, 1972, 159.
- Campbell, J; Hornby, W.E y Morris, D.L. *Biochim. et Biophysica Acta*, 1975, 384, 307.
- Cornish-Bowden, A. "Principles of Enzymes Kinetics", Butterworth, London, 1976.
- Guerrieri, A; De Benedetto, G.E; Palmisano, F y Zambonin, P.G. *Analyst*, 1995, 120, 2731.
- Gluck, L y Kulovich, M.V y Borer, R.C. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1971, 109, 440.
- Gluck, L y Kulovich, M.V. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1973, 115, 539.
- Gurantz, D; Laker, M.F y Hofmann, A.F, *J. Lip. Res.*, 1981, 22, 373.
- Hasebe, K y Osteryoung, J. *Anal. Chem.*, 1975, 47, 2412.
- Hoeflmayr, J y Fried, R. *Med. Ernaehr.*, 1966, 7, 9.
- Hornby, W.E y Morris, D.L en Weetall, H.H (ed.) "Immobilized enzymes, antigens, antibodies and peptides". Marcel Dekker, New York, 1975.
- Ikuta, S; Imamura, S; Misaki, H y Horiuti, Y. *J. Biochem.*, 1977, 82, 1741.

- Imamura, S ; Ohno, M y Hirouchi, Y . *J. Biochem.*, 1977, 81, 6.
- Kaplan, L.A y Pesce, A.G (ed.). “*Química Clínica. Teoría, análisis y correlación*”. Editorial Médica Panamericana, 1989.
- Karube, I, Hara, K, Satoh, I y Suzuki, S . *Anal. Chim. Acta*, 1979, 106, 243.
- Mascini, M; Mazzei, F; Moscone, D; Calabrese, G y Benedetti, M. *Clin. Chem.*, 1987, 33, 591.
- McGowan, M.W; Artiss, J.D y Zak, B . *Clin. Chem.*, 1983, 29, 1513.
- Nelson, G.H. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1969, 105, 1072.
- Ohta-Fukujama, M; Miyake, Y; Emi, S y Yamano, T . *J. Biochem.*, 1980, 88, 197.
- Palleschi, G; Bernabei, M; Cremisini, C y Mascini, M. *Sens. and Actuators B*, 1992, 7, 513.
- Perrin, D.D. y Dempsey, B. “*Buffers for pH and Metal Ion Control*”. Chapman and Hall: London, 1974; 157.
- Rouillon, R; Mionetto, N y Marty, J.L . *Anal. Chim. Acta*, 1992, 268, 347.
- Segel, I.H. “*Enzyme Kinetics: Behaviour and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*”, Wiley-Interscience, New York, 1975.
- Stemple, J.Z; Rusin, K.M y Fare, T.L . *Anal. Chem.*, 1991, 63, 1050.
- Takayama, M; Itoh, S y Nagasaki, T y Tanimizu, I . *Clin. Chim. Acta*, 1977, 79, 93.
- Trettnak, W; Leiner, M.J.P y Wolfbeis, O.S . *Analyst*, 1988, 113, 1519.

4. CONCLUSIONES.

Los resultados más relevantes del trabajo que se presenta en esta Memoria, pueden resumirse en las siguientes conclusiones, referidas a cada uno de los optodos desarrollados.

A) Sensor de fibra óptica para la determinación de CO_2 .

1. Se ha desarrollado un nuevo principio de medida óptica por luminiscencia del $\text{pH}/\text{P}_{\text{CO}_2}$, basado en la *transferencia protónica* desde un ácido de Brønsted presente en el medio acuoso, al *estado excitado* de complejos metálicos luminiscentes que contienen ligandos poliazaromáticos quelatantes de naturaleza básica. Dicha reacción ácido-base en el estado excitado, de naturaleza irreversible, compete eficazmente con la fotoluminiscencia de tales complejos, por lo que el principio de medida patentado, permite la determinación de dichos analitos utilizando, tanto la medida de la *intensidad de luminiscencia*, como el *tiempo de vida de emisión*, lo que hasta el momento no era posible utilizando indicadores fluorimétricos conocidos.

2. Basado en este principio, se ha construido un sensor de fibra óptica que permite la determinación de CO_2 en muestras gaseosas y líquidas. El optodo incorpora como indicador el complejo luminiscente *tris[2-(2-pirazinil)tiazol]rutenio(II)*, abreviadamente $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$, diseñado y sintetizado expresamente para la construcción de dicho sensor. El complejo se *inmoviliza electrostáticamente* en un gel de dextrano funcionalizado, disponiéndose en una célula de flujo, en el extremo de la fibra óptica. La fase sensible se separa de la muestra, mediante una *membrana de silicona* permeable al analito.

3. El complejo $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$, presenta máximos de *excitación* ($\lambda = 463 \text{ nm}$) y *emisión* ($\lambda = 653 \text{ nm}$) en la región visible del espectro electromagnético, lo cual permite una mayor versatilidad de funcionamiento y menor coste de los componentes instrumentales (fuentes de iluminación, fibras ópticas, etc.).

4. Los *apreciables desplazamientos de Stokes*, que presentan los complejos metálicos de Ru(II) (ca. 200 nm o más), entre los que se encuentra el $\text{Ru}(\text{pzth})_3^{2+}$, minimizan la posible interferencia por parte de la luz difundida, permitiendo la utilización de sistemas de *filtros*, en lugar de *monocromadores*, con la consiguiente mayor simplicidad y economía en la construcción de los dispositivos.

5. El sensor de CO₂ utiliza para la medida, un tampón hidrógenoftalato de concentración considerablemente superior (0.1 M), a la empleada en otros sensores escritos anteriormente en la bibliografía (típicamente bicarbonato 1-15 mM), con la consiguiente *mayor simplicidad* de construcción y *mantenimiento operativo*.

6. La incorporación de la enzima anhidrasa carbónica en la fase sensible, permite reducir notablemente los tiempos de respuesta relativamente elevados del optodo demostrándose que la velocidad de *hidratación* del CO₂ es una de las *etapas limitantes* de la respuesta de estos dispositivos.

7. El método propuesto se ha aplicado con éxito a la determinación del contenido de CO₂ en *muestras gaseosas* certificadas empleando medidas de intensidad y tiempo de vida de emisión, así como, al análisis del contenido de bicarbonato en *muestras de agua mineral embotellada*. Los resultados obtenidos permiten concluir que el optodo es válido para el análisis de este tipo de muestras.

B) Sensor de fibra óptica para la determinación de O₂.

1. Se ha desarrollado un sensor de fibra óptica que permite la determinación de O₂ tanto en fase gaseosa como en disolución, basado en la *desactivación* de la *luminiscencia* del complejo tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)rutenio(II), Ru(dip)₃²⁺, por dicho analito.

2. El proceso de fabricación de las membranas sensibles al analito (naturaleza del soporte y procedimiento de inmovilización), ha demostrado afectar drásticamente a la respuesta del optodo en términos de *sensibilidad*, *estabilidad* e *intervalo de linealidad* de las curvas de calibrado. La curvatura progresiva de estas últimas tiene su origen en la *microheterogeneidad* del soporte polimérico del indicador, en la diferente *accesibilidad* al O₂ que presentan las moléculas de indicador inmovilizado, y/o la *incompleta solubilización* del complejo indicador en el polímero de silicona.

3. Se ha determinado que de los distintos soportes ensayados (CPG, gel de sílice, gel de sílice alquil-funcionalizada C₁₈ y silicona), las membranas fabricadas a partir de gel de sílice son las que proporcionan los mejores resultados en cuanto a *homogeneidad* y *sensibilidad* al analito. Asimismo, se concluye que ésta última, aumenta al hacerlo la cantidad de gel de sílice dispersada en las mismas, así como al incrementar la concentración de Ru(dip)₃²⁺ inmovilizado.

4. El sensor de O₂ fabricado se ha aplicado con éxito a la monitorización de esta especie en procesos de fermentación aerobia, así como, en el control de procesos de depuración de aguas residuales, donde la monitorización de los niveles de O₂ disuelto, juega un papel fundamental, (comparándose los resultados obtenidos, en ambos casos, con los proporcionados por un electrodo de Clark convencional).

C) Biosensor de fibra óptica para la determinación de colesterol libre.

1. Se ha desarrollado un biosensor de fibra óptica que permite la cuantificación de colesterol libre para su aplicación como detector en un sistema de *análisis en flujo*. El biosensor emplea el principio de la *transducción optoquímica*, mediante inmovilización en una misma membrana de la enzima *colesterol oxidasa* y el complejo Ru(dip)₃²⁺ como indicador de O₂ consumido.

2. Se ha llevado a cabo la *optimización simultánea*, mediante la aplicación de un método *simplex supermodificado*, de 3 variables *interdependientes* (% Triton X-100, % isopropanol y concentración del tampón) que afectan a la solubilidad del analito y a la actividad enzimática. La respuesta del biosensor en las condiciones óptimas (2.6 % Triton X-100, 0.3 M Fosfato a pH 7.5 y 11% de isopropanol) se alcanza así tras doce experimentos, triplicándose la señal analítica obtenida en las condiciones de partida.

3. Las características analíticas del método puesto a punto son las siguientes: un *intervalo de linealidad* comprendido entre 0.15-3.0 mmol L⁻¹ de colesterol, que incluye los intervalos de interés clínico (0.54-2.41 mM); *precisión* del 4.0% para 2 mM de colesterol libre con un *límite de detección* de 0.15 mM. Las *interferencias* se limitan al *ácido ascórbico* cuando se encuentra en relaciones analito/interferente superiores a 1:1.

4. El biosensor muestra una gran *estabilidad a largo plazo*, no habiéndose observado síntomas de *fotodescomposición* del indicador, ni *pérdidas* significativas de la *actividad enzimática* durante un período de operación continua superior a dos meses.

5. El método propuesto se ha validado para la determinación de colesterol libre en muestras de suero certificado.

D) *Biosensor de fibra óptica para la determinación de colina y/o fosfatidilcolina.*

1. Se ha desarrollado un método para la determinación por luminiscencia de colina y/o fosfolípidos que contienen colina (e.g. fosfatidilcolina) empleando fibra óptica, basado en un sistema de dos enzimas; colina oxidasa (inmovilizada) y fosfolipasa D (disuelta), y el complejo $\text{Ru}(\text{dip})_3^{2+}$ como transductor de O_2 .

2. De los distintos métodos de inmovilización ensayados para la colina oxidasa (*entrecruzamiento* sobre la superficie de la membrana de silicona, membranas de *inmunofinidad* y anclaje covalente a membranas de nylon), es este último el que proporciona mayor reproducibilidad y estabilidad del biosensor.

3. Las principales características analíticas del método puesto a punto para la determinación de colina son las siguientes: *intervalo lineal* de respuesta al analito comprendido entre 0.05- 5mM, con una *precisión* del 7.0, 3.0 y 2.6% para concentraciones de 1.0, 3.0 y 4.0 mM de colina, respectivamente. El *límite de detección* es de 0.05 mM de colina y las principales *interferencias* del método se deben al *ácido ascórbico* y a la *serina*. En cuanto a las características analíticas del método para la determinación de fosfatidilcolina, se obtuvieron las siguientes: *intervalo de linealidad* de respuesta al analito entre 0.08-3.0 mg mL⁻¹; una *precisión* del 5.4% para disoluciones de 1 mg mL⁻¹ y del 3% para 2.5 mg mL⁻¹ de fosfatidilcolina, siendo el *límite de detección* de 0.08 mg mL⁻¹. La presencia de otros fosfolípidos como la *lisofosfatidilcolina* o la *esfingomielina* en relaciones 1:0.11 y 1:0.25, respectivamente, no influyen sobre la respuesta del biosensor óptico.

4. El método propuesto se ha aplicado con éxito a la determinación de fosfatidilcolina en muestras de suero. Las *ventajas fundamentales* que presenta el biosensor óptico, en relación a los procedimientos químicos y enzimáticos, descritos hasta la fecha, es que permite *reducir* considerablemente el *tiempo de análisis* y el *coste* del mismo.

5. PUBLICACIONES.



Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral han dado lugar a los siguientes artículos científicos y patentes de invención:

- 1) "Sensor óptico", *Patente española ES 2 023 593*, 1992. G. Orellana y M.C. Moreno-Bondi.
- 2) "Fiber-optic sensing of carbon dioxide based on excited-state proton transfer to a luminescent ruthenium(II) complex". G. Orellana, M.C. Moreno-Bondi, E. Segovia y M.D. Marazuela. *Anal. Chem.*, 1992, 64, 2210.
- 3) "Intensity and lifetime-based luminescence optosensing of carbon dioxide". G. Orellana, C. de Dios, M.C. Moreno-Bondi y M.D. Marazuela. "Chemical, Biochemical, and Environmental Fiber Sensors VII" en *Proc. Europto series*, 1995, 2508, 18.
- 4) "Enhanced performance of a fibre-optic luminescence CO₂ sensor using carbonic anhydrase". M.D. Marazuela, M.C. Moreno-Bondi y G. Orellana. *Sens. and Actuators B*, 1995, 29, 126.
- 5) "Free cholesterol fiber-optic biosensor for serum samples with simplex optimization". M.D. Marazuela, B. Cuesta, M.C. Moreno-Bondi y A. Quejido. (Aceptado para su publicación en *Biosensors and Bioelectronics*, 1996).