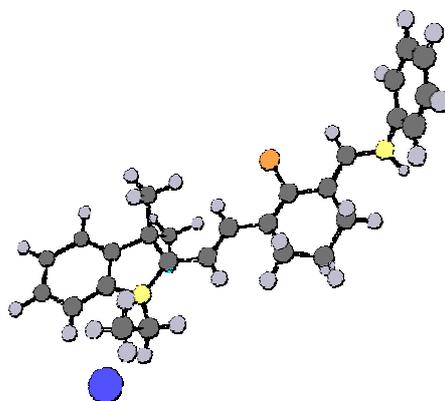
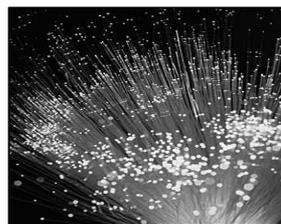


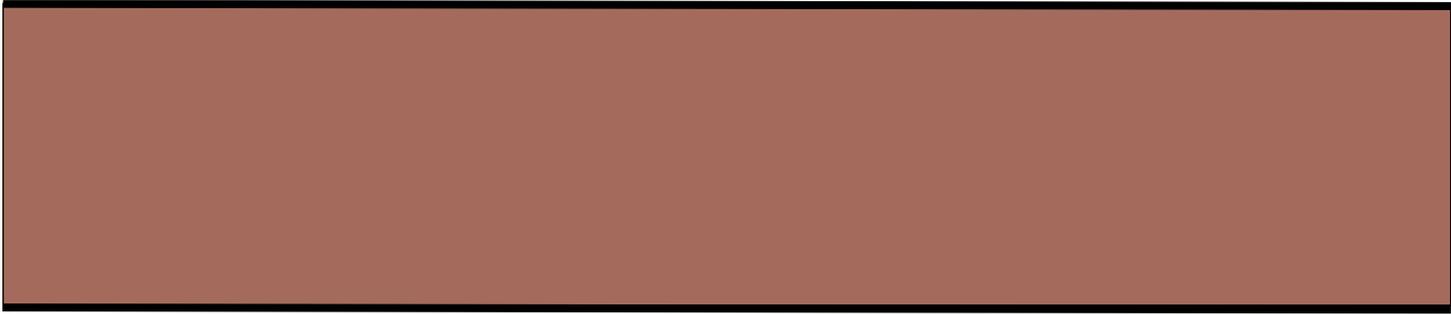
**DESARROLLO DE SENSORES OPTOQUÍMICOS
MINIATURIZADOS BASADOS EN MEDIDAS DE
FLUORESCENCIA Y EL USO DE
FLUOROIONÓFOROS VIS-NIR**



Laia Rivera Sarrate

TESIS DOCTORAL
Programa de Química
Directores: Julián Alonso Chamarro y Mar Puyol Bosch

Departamento de Química, Facultad de Ciencias, 2010



Unidad de Química Analítica
Departamento de Química
Universitat Autònoma de Barcelona
08193 Bellaterra (Barcelona)



Unidad de Química Analítica
Departamento de Química
Facultad de Ciencias
Universitat Autònoma de Barcelona

DESARROLLO DE SENSORES OPTOQUÍMICOS MINIATURIZADOS BASADOS
EN MEDIDAS DE FLUORESCENCIA Y EL USO DE FLUOROIONÓFOROS VIS-NIR

Memoria presentada por:

LAIA RIVERA SARRATE

Para optar al grado de Doctora
Programa de Doctorado en Química

Visto bueno, Bellaterra, 1 marzo de 2010

Julián Alonso Chamarro
Catedrático de Universidad
Unidad de Química Analítica

Mar Puyol Bosch
Doctora en Química



Grup de Sensors i Biosensors
Departamento de Química, Edificio Cn
08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès)
Universitat Autònoma de Barcelona
<http://sensors.uab.es/>
Telf.: +34 93 581 25 33
Fax: +34 93 581 23 79

El trabajo descrito en la presente memoria se ha llevado a cabo gracias a la siguiente financiación:

Desarrollo de analizadores miniaturizados para el control in-situ de parámetros de interés medioambiental basados en la integración de microsensores ópticos y eléctricos y microsistemas de gestión de fluidos (DPI2003-09735-C02-01), proyecto concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

Microanalizadores automáticos con detectores optoquímicos para el control de parámetros medioambientales (PTR95-0770-OP), proyecto PETRI concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

Microsistemas analíticos integrados (TAS) con tecnología LTCC y de silicio (TEC2006-13907-C04/MIC), proyecto concedido por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

El trabajo descrito en esta memoria ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

Miltsov, S.; Rivera, L.; Encinas, C.; Alonso, J. **Boron trifluoride-methanol complex-mild and powerful reagent for deprotection of labile acetylated amines**, Tetrahedron Letters, 2003, 44, 2301-2303.

Rivera, L.; Puyol, M.; Miltsov, S.; Villuendas, F.; Alonso, J. **New ketocyanine-based fluorescent optodes for the development of integrated waveguide sensors**, Sensors and Actuators B, 2006, 114, 705-712.

Rivera, L.; Puyol, M.; Miltsov, S.; Alonso, J. **New hexamethine-hemicyanine dyes for the development of integrated optochemical sensors**, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387, 2111-2119.

Rivera, L.; Puyol, M.; Villuendas, F.; Alonso, J. **Miniaturised setup for fluorescence sensing with optodes: Characterisation of a new hemicyanine ion-selective-based membrane**, Sensors and Actuators B, 2008, 134, 863-868.

Rivera, L.; Izquierdo, D.; Garcés, I.; Salinas, I.; Alonso, J.; Puyol, M. **Simple dip-probe fluorescence setup sensor for in situ environmental determinations**, Sensors and Actuators B, 2009, 137, 420-425.

Als meus pares

Al Quim

AGRAÏMENTS

En primer lloc, m'agradaria agrair al Julián Alonso la possibilitat de formar part del seu grup de recerca. Als meus companys del Grup de Sensors i Biosensors per tot l'ajut i bons moments, especialment als membres del grup d'òptics: Mar Puyol, Albert Beltran i Cristina Encinas. A l'Aleix Parra i l'Isma Tejero. Al Paco Villuendas, Ignacio Garcés i David Izquierdo, per la seva col·laboració i el seu *savoir faire* en el món de l'òptica, sense els quals els nostres sensors no haguessin estat possibles. A l'Albert Virgili, per la seva ajuda amb els RMNs i la seva confiança.

A l'Anna González, a la Mariona Massana i a la Núria Ibáñez, amb qui vam compartir penes i glòries al GSB i a hores d'ara ja formen part de la meua vida. A les persones que han patit d'alguna manera o altra, amb tota la paciència, el procés de realització d'aquest treball. Als meus amics, per tot l'interès i suport. A la meua família, que sou incondicionals.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Sensores químicos	2
1.1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SENSORES QUÍMICOS	4
1.2. Sensores optoquímicos	5
1.2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES OPTOQUÍMICOS	7
1.2.1.1. Según la interacción luz-materia	7
1.2.1.2. Según la fase ópticamente activa o elemento de reconocimiento	12
1.2.2. INSTRUMENTACIÓN DE LOS SENSORES OPTOQUÍMICOS	13
1.2.2.1. Fuentes de luz	14
1.2.2.2. Selectores de longitud de onda	17
1.2.2.3. Guías de onda	18
1.2.2.4. Detectores	19
1.3. Los sensores optoquímicos basados en optodos	21
1.3.1. COMPONENTES BÁSICOS DE LOS OPTODOS	21
1.3.1.1. La matriz	22
1.3.1.2. Ionóforos	24
1.3.1.3. Cromo(fluoro)ionóforos	25
1.3.1.4. Aditivos iónicos	26
1.3.2. MECANISMOS DE RESPUESTA DE LOS OPTODOS	27
1.3.2.1. Mecanismo de intercambio catiónico	28
1.3.2.2. Mecanismo de co-extracción	31
1.4. Los cromo(fluoro)ionóforos NIR selectivos a protón	33
1.4.1. COLORANTES CON ABSORCIONES EN LA ZONA DEL VISIBLE LEJANO Y NIR	34
1.4.2. LOS COLORANTES CIANINA	36
1.4.2.1. Estructura química y características ópticas de las cianinas	37
1.4.2.2. Equilibrios ácido-base	39
1.4.2.3. Agregación	40
1.4.2.4. Efecto del disolvente: solvatocromismo	41
1.4.2.5. Fotoestabilidad	41
1.5. Bibliografía	45
2. OBJETIVOS	53
3. EXPERIMENTAL	55
3.1. Reactivos	55
3.1.1. DISOLUCIONES	55
3.1.2. Reactivos para síntesis de precursores y cromo(fluoro)ionóforos	56
3.1.3. COMPONENTES DE MEMBRANA	56
3.2. Instrumentación para la caracterización de precursores, cromo(fluoro)ionóforos y optodos	57
3.3. Procedimientos sintéticos	60
3.3.1. SÍNTESIS DE LOS PRECURSORES	60
3.3.1.1. Obtención de yoduro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, p1; de la correspondiente sal de bromuro (p1b) y de perclorato (p1c)	60
3.3.1.2. Obtención de 2,3,3-trimetil-5-metoxindolenina, p2 [1]	61
3.3.1.3. Obtención de 2,3,3-trimetil-5-nitroindolenina, p3	62
3.3.1.4. Obtención de 5-acetilamino-2,3,3-trimetilindolenina, p4 [2]	63
3.3.1.5. Obtención de yoduro de 5-acetilamino-1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, p5	64
3.3.1.6. Obtención de yoduro de 1-etil-5-hidroxi-2,3,3-trimetilindolenio, p6	64

3.3.1.7. Obtención de 5-butil-2,3,3-trimetilindolenina, p7.....	65
3.3.1.8. Obtención de yoduro de 3-etil-2-metilnafto[1,2-d]tiazolio, p8.....	67
3.3.1.9. Obtención de 2,5-bis(dimetilaminometilen)ciclopentanona, p9.....	67
3.3.1.10. Obtención de 2-metil-3-(4-sulfonatobutil)benzotiazolio, p10.....	68
3.3.1.11. Obtención de cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-ilideno] anilinio, p11 [3].....	69
3.3.1.12. Obtención de cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(etano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-ilideno] anilinio, p12, y derivados, p13, p14 y p15.....	70
3.3.2. SÍNTESIS DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS.....	71
3.3.2.1. Obtención de croconinas.....	71
3.3.2.2. Obtención de cetocianinas.....	77
3.3.2.3. Obtención de cianinas-anilinas: ca1, ca2, ca3, ca4, ca5, ca6, ca7 y ca8 [3, [7].....	82
3.3.2.4. Obtención de un cromo(fluoro)ionóforo norcianina-anilina, cloruro de 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(propano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3,3-dimetil-1H-benz[e]indolio, nca1.....	86
3.4. Metodologías para la obtención de los espectros de absorción.....	87
3.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS EN DISOLUCIÓN ETANÓLICA.....	87
3.4.1.1. Determinación del coeficiente de extinción molar y de la longitud de onda del máximo de absorción.....	87
3.4.1.2. Estudio del comportamiento ácido-base en disolución etanólica.....	87
3.4.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS EN MEMBRANAS DE PVC PLASTIFICADO.....	88
3.4.2.1. Protocolo de preparación de membranas.....	88
3.4.2.2. Montaje experimental.....	89
3.4.2.3. Determinación de la longitud de onda del máximo de absorción.....	90
3.4.2.4. Estudio del comportamiento ácido-base.....	90
3.4.2.5. Estudios de fotoestabilidad.....	90
3.4.2.6. Estudios de exudación de la membrana.....	91
3.4.2.7. Estudio del tiempo de respuesta.....	91
3.5. Metodologías para la obtención de los espectros de emisión de fluorescencia.....	92
3.5.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS EN DISOLUCIÓN ETANÓLICA.....	92
3.5.1.1. Determinación de la longitud de onda de los máximos de excitación y emisión y del rendimiento cuántico de fluorescencia.....	92
3.5.1.2. Estudio del comportamiento ácido-base en etanol.....	93
3.5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS EN MEMBRANAS DE PVC PLASTIFICADO.....	93
3.5.2.1. Protocolo de preparación de membranas.....	93
3.5.2.2. Montaje experimental.....	93
3.5.2.3. Determinación de la longitud de onda del máximo de excitación y emisión de fluorescencia.....	94
3.5.2.4. Estudio del comportamiento ácido-base.....	94
3.5.3. CARACTERIZACIÓN DE MEMBRANAS SELECTIVAS A POTASIO Y PLOMO (II) EN LOS DISPOSITIVOS MINIATURIZADOS DE FLUORESCENCIA DESARROLLADOS.....	95
3.5.3.1. Protocolo de preparación de membranas.....	95
3.5.3.2. Estudios preliminares de los optodos en absorbancia.....	95
3.5.3.3. Caracterización de las membranas en la plataforma sensora de fluorescencia mediante la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA).....	95

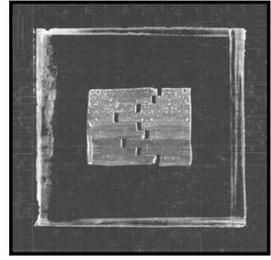
3.5.3.4. <i>Evaluación de la respuesta analítica de la membrana selectiva de plomo en la sonda de fluorescencia y su aplicación</i>	99
3.6. Bibliografía	100
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
4.1. Diseño y síntesis de los cromo(fluoro)ionóforos	105
4.1.1. DISEÑO	105
4.1.1.1. <i>Norindocrococianinas</i>	105
4.1.1.2. <i>Cetocianinas</i>	106
4.1.1.3. <i>(Nor)cianinas-anilinas</i>	106
4.1.2. SÍNTESIS	108
4.1.2.1. <i>Norindocrococianinas</i>	108
4.1.2.2. <i>Cetocianinas</i>	109
4.1.2.3. <i>(Nor)cianinas-anilinas</i>	110
4.2. Caracterización espectroscópica de los cromo(fluoro)ionóforos en absorbancia	112
4.2.1. ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO ÁCIDO-BASE EN DISOLUCIÓN ETANÓLICA.....	112
4.2.1.1. <i>Norindocrococianinas</i>	113
4.2.1.2. <i>Cetocianinas</i>	116
4.2.1.3. <i>(Nor)cianinas-anilinas</i>	119
4.2.2. ESTUDIOS EN MEMBRANA	122
4.2.2.1. <i>Estudios ácido-base de los cromo(fluoro)ionóforos</i>	122
4.2.2.2. <i>Evaluación del comportamiento de los cromo(fluoro)ionóforos en combinación con un ionóforo: optodos selectivos a ion potasio y a ion plomo (II)</i>	136
4.3. Caracterización espectroscópica de los cromo(fluoro)ionóforos en fluorescencia	141
4.3.1. ESTUDIOS DE CIANINAS-ANILINAS EN FLUORESCENCIA.....	141
4.3.2. ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE FLUORESCENCIA DE LAS CETOCIANINAS.....	143
4.3.2.1. <i>Características de emisión de fluorescencia y propiedades fotofísicas</i>	144
4.3.2.2. <i>Comportamiento ácido-base en etanol y en membranas de PVC plastificado</i>	146
4.3.2.3. <i>Fotodescomposición y exudación</i>	148
4.4. Desarrollo de sistemas miniaturizados de fluorescencia	150
4.4.1. DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA SENSORA DE FLUORESCENCIA PARA REALIZAR DETERMINACIONES EN CONDICIONES DE FLUJO CONTINUO	152
4.4.1.1. <i>Caracterización de la plataforma sensora en la determinación de ion potasio utilizando el optodo M4</i>	153
4.4.1.2. <i>Caracterización de la respuesta de la plataforma sensora en la determinación de ion plomo (II) utilizando el optodo Mpb1</i>	159
4.4.2. DESARROLLO DE UNA SONDA DE FLUORESCENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE ION PLOMO (II) EN DISCONTINUO	165
4.4.2.1. <i>Respuesta analítica</i>	167
4.4.2.2. <i>Aplicación de la sonda de fluorescencia en la determinación de ion plomo (II) en extractos de suelos contaminados</i>	169
4.5. Bibliografía	171
5. CONCLUSIONES	177
6. ANEXO: ESPECTROS DE RMN DE LAS MOLÉCULAS SINTETIZADAS	A.1

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A, Abs	Absorbancia	DMFA	Dimetilformamida
a	Actividad iónica	DOS	Sebacato de bis(2-etilhexilo)
α	Absorbancia relativa	ϵ	Coefficiente de absortividad molar
Ar	Aromático	ϵ_r	Constante dieléctrica
ADN	Ácido desoxirribonucleico	E	Intensidad de radiación de excitación
ASTM	American Society for Tests and Materials / Sociedad americana para pruebas y materiales	EPA	Environmental Protection Agency / Agencia de protección medioambiental
β	Constante de formación de complejo	ESI, ISE	Ion-selective electrode / Electrodo selectivo de iones
BAW	Bulk Acoustic Wave / Onda acústica volumétrica	ET ^N	Energía de transición de un colorante
CCD	Charge-Coupled Device / Dispositivo de carga acoplada	Φ	Rendimiento cuántico
CHEMFET	Chemical Field-Effect Transistor / Transistor de efecto de campo químicamente sensible	ν	Frecuencia
d	Doblete	F	Área integrada del espectro de emisión de fluorescencia
δ	Desplazamiento químico	FAA	Flame Atomic Absorption / Espectrometría de absorción atómica con llama
\emptyset	Diámetro	FABMS	Fast Atom Bombardment Mass Spectroscopy / Espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos
$\Delta\phi$	Variación de fase	FIA	Flow Injection Analysis / Análisis por inyección en flujo
Δm	Variación de modulación de fase		
Δv_{ST}	Desplazamiento de Stokes		
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization / Aumento sin distorsión por transferencia de polarización		

FIM	Fixed Interference Method / Método de las interferencias fijas	ICP-OES	Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry / Espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado
FWHM	Full Width at Half Maximum / Anchura de banda a media altura	IR	Infrarrojo
GFAAS	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry / Espectrometría de absorción atómica en horno de grafito	J	Constante de acoplamiento
GRIN	Gradient-index / Gradiente de índice de refracción	K_a	Constante de acidez
GSB	Grup de Sensors i Biosensors, Universitat Autònoma de Barcelona	K_H	Coeficiente de partición del protón
GTF	Grupo de Tecnologías Fotónicas, Universidad de Zaragoza	K_M	Coeficiente de partición del analito
h	Constante de Planck	K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
HALS	Hindered Amine Light Stabilizer / Estabilizador de degradación de polímeros basado en aminas bloqueadas	KTpCIPB	Tetrakis(<i>p</i> -clorofenil)borato de potasio
HFPB	Tetrakis[3,5-bis(1,1,1,3,3,3- hexafluoro-2-metoxi-2- propil)fenil]borato	λ	Longitud de onda
HMO	Hückel Molecular Orbital / Método de los orbitales moleculares de Hückel	LD	Límite de detección
ISFET	Ion-selective Field-Effect Transistor / Transistor de efecto de campo selectivo de iones	LED	Light Emitting Diode / Diodo emisor de luz
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry / Espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado	LTCC	Low Temperature Co-fired Ceramic / Cerámicas de co- sinterización a baja temperatura
		m	Multiplete
		MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization / Desorción/ionización por láser asistida por una matriz
		NA	Numerical Aperture / Apertura numérica
		NIR	Near Infrared / Infrarrojo cercano
		OD	Optical Density / Densidad óptica
		PIN	Fotodiodo de unión p-n
		pK_a	Logaritmo decimal de la constante de acidez

pK_{aMEM}	Logaritmo decimal de la constante de acidez en membrana	UAB	Universitat Autònoma de Barcelona
ppm	Parte por millón	UV	Ultravioleta
ps	Calidad para síntesis	vis	Visible
POF	Polymer Optical Fibre / Fibra óptica de polímero	z	carga iónica
PPP	Método de Pariser-Parr-Pople		
PVC	Polyvinyl chloride / Cloruro de polivinilo		
q	Cuadruplete		
r	Anisotropía		
RMN	Resonancia magnética nuclear		
RSD	Desviación estándar relativa		
s	Singlete		
SAW	Superficial Acoustic Wave / Onda acústica superficial		
SPR	Superficial Plasmons Resonance / Resonancia de plasmones superficiales		
τ	Tiempo de vida		
t	Triplete		
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media		
T_g	Temperatura de transición vítrea		
t_r	Tiempo de respuesta		
TDDA ⁺	Ion tetradodecilamonio		
TDDMA ⁺	Ion tridodecilmetilamonio		
TFPB ⁻	Ion Tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borato		
THF	Tetrahidrofurano		
TOA ⁺	Ion tetraoctilamonio		
TOPH	Tris(2-etilhexil)fosfato		
TpCIPB ⁻	Ion tetrakis(p-clorofenil)borato		
TPB ⁻	Ion tetrafenilborato		
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano		



INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Como consecuencia de la creciente necesidad de obtener más y mejor información sobre el medio en el que vivimos, y más concretamente, sobre la materia (su composición, sus propiedades y evolución con el entorno), se han desarrollado una amplia variedad de técnicas analíticas. De esta forma, la información suministrada por la Química Analítica¹, a través de lo que se denomina *proceso analítico*, nos permite actuar sobre el medio, monitorizar y a veces controlar procesos del tipo industrial, biotecnológico, médico o ambiental.

El proceso analítico consta de varias etapas: la toma de muestras, el transporte de éstas al laboratorio, su tratamiento y separación de interferentes, la reacción de determinación y la detección. Finalmente, el procesamiento de la señal obtenida y la interpretación de los datos dan lugar al resultado. Aunque con numerosas ventajas, éste es un proceso normalmente laborioso, que muchas veces requiere unas condiciones controladas de laboratorio y personal especializado. Además, suele ser necesario el uso de grandes y sofisticados equipos de alto coste, que necesitan de un frecuente mantenimiento y calibración. Éstos además conllevan un elevado consumo de reactivos y producción de desechos que no promueve una química analítica más limpia y sostenible.

Con el propósito de solventar estos problemas aparecen los denominados *sensores químicos* que idealmente integran el proceso analítico en un solo dispositivo y posibilitan así las medidas *in situ* y en tiempo real. [1,2]

¹ La Química Analítica es la parte de la química que desarrolla y aplica métodos - químicos o fisicoquímicos -, instrumentos y estrategias para obtener información de la composición química y naturaleza de un material o muestra.

1.1. SENSORES QUÍMICOS

Un *sensor* es un dispositivo robusto, portátil y de fácil uso capaz de suministrar de forma continua información sobre un parámetro físico (sensor físico) o sobre la composición de los sistemas materiales (sensores químicos). [3-6]

Los sensores químicos están constituidos por dos componentes principales: un elemento de reconocimiento selectivo y un elemento instrumental, formado básicamente por un transductor. El elemento de reconocimiento iónico o molecular, ya sea químico o biológico, interacciona selectivamente con la especie de interés (analito) generando una señal primaria, que lleva la información química, y que puede ser del dominio térmico, másico, electroquímico, óptico, etc. El transductor se encarga de transformar la señal primaria en una señal secundaria, más fácil de manipular, generalmente del dominio eléctrico. Esta señal, una vez procesada, permite extraer, a través de la calibración, la información analítica sobre la muestra, en las unidades de interés.

Así, el proceso analítico puede verse reducido a dos etapas: reconocimiento y transducción. En función del tipo de elemento de reconocimiento, se pueden diferenciar los *quimiosensores* de los *biosensores*. En los primeros, son compuestos sintéticos (ionóforos, reactivos selectivos, etc.) los que se encargan del reconocimiento del analito; en cambio, en los biosensores, este papel lo desempeña algún tipo de material biológico, como pueden ser enzimas, anticuerpos, material genético, receptores químicos, tejidos, células, etc. Según el tipo de transducción, existe una gran variedad de sensores químicos, [7] que son resumidos en la **Tabla 1.1**, de acuerdo con la IUPAC. [8]

Tabla 1.1. Tipos de sensores químicos según el transductor (señal primaria que transforma) y especies que pueden analizar.

Tipo de sensor	Señal primaria	Analito
óptico	-absorbancia -reflectancia -luminiscencia -fluorescencia -índice de refracción -efecto optotérmico -dispersión de luz	-pH -iones (y metales pesados) -gases -moléculas
electroquímico (potenciométrico, potenciométrico de electrolito sólido, amperométrico, y CHEMFET e ISFET)	-potencial -intensidad de corriente -flujo de corriente de drenaje a fuente	-pH -iones (y metales pesados) -gases -moléculas

eléctrico	-conductividad -capacitancia -permitividad eléctrica	-iones
másico (piezoeléctrico y de onda acústica de superficie)	-masa	-gases -líquidos volátiles
magnético	-efecto paramagnético	-moléculas -gases
termométrico	-calor	-moléculas -iones
radiométrico	-propiedades de las radiaciones (rayos X, β, γ)	-moléculas

Los sensores más ampliamente utilizados son los *electroquímicos*, los cuales transforman el efecto de la interacción electroquímica entre el analito y un electrodo en una señal útil. Estos efectos pueden ser estimulados eléctricamente o ser resultado de una interacción espontánea en la condición de corriente cero. Entre este tipo de sensores se encuentran algunos tan conocidos y utilizados como el de pH, los electrodos selectivos a iones (ESIs) y los transistores de efecto de campo selectivos a iones (ISFETs).

Los *sensores ópticos* aprovechan variaciones en las propiedades ópticas resultado de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento. En función de la propiedad óptica utilizada, pueden clasificarse en sensores de absorbancia, de reflectancia, de luminiscencia (p.e. fluorescencia), de índice de refracción, de efecto optotérmico y de dispersión de la luz.

La transducción de los *sensores eléctricos* está basada en procesos no electroquímicos, en los cuales la señal medida es consecuencia del cambio en las propiedades eléctricas causadas por la interacción del analito con el dispositivo.

Los *sensores másicos* detectan cambios de masa debidos a la acumulación del analito en la superficie especialmente modificada del sensor, y los transforman en cambios de alguna propiedad del material de soporte. Si se emplean ondas acústicas de volumen (BAW, *Bulk Acoustic Waves*) la medida se basa en el cambio de su frecuencia de resonancia. En cambio, si las ondas son superficiales (SAW, *Surface Acoustic Waves*), la medida es resultado de cambios en la propagación de la onda generada en la superficie del material.

En los *sensores magnéticos* se mide el cambio en las propiedades paramagnéticas del analito.

Los *sensores termométricos* se basan en los cambios térmicos asociados con determinadas reacciones químicas o adsorciones en las que interviene el analito.

Por último, la medida de las propiedades de las radiaciones (rayos X, β, γ) es el fundamento de los *sensores radiométricos*.

La aplicación de nuevas tecnologías en el campo de los sensores, como la microelectrónica, o el uso de nuevos materiales, como los polímeros o las cerámicas co-sinterizadas a baja temperatura (LTCC, *Low-Temperature Co-fired Ceramics*) y sus tecnologías asociadas ha permitido el desarrollo en los últimos años de nuevas generaciones de dispositivos, cada vez más miniaturizados en tamaño. La utilización de los sensores, aunque lenta, cada vez es más patente en muchos ámbitos de la vida cotidiana, como en medicina (tratamientos médicos, diagnóstico, etc.), [9-11] en laboratorios químicos, en procesos industriales, [12] en biotecnología, [13] o en medioambiente. [14,15] De este modo, la calidad de vida de enfermos se ve mejorada (tests de glucosa), se pueden detectar y monitorizar vertidos, ahorrar energía, optimizar procesos o diseñar sistemas de alarma.

Actualmente, en el desarrollo de los sensores se tiende a incorporar al empleo de las nanotecnologías, para así explotar nuevos fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala y extraer información de ésta o mejorar las características analíticas de los sensores convencionales ampliando las posibilidades de aplicación de éstos.

1.1.1. Características de los sensores químicos

La sociedad actual demanda dispositivos sensores cada vez más pequeños, fiables, rápidos y que sean capaces de detectar concentraciones cada vez más pequeñas de analito. Con el objetivo de determinar sus características operacionales, se utilizan diferentes parámetros de calidad como son: la *precisión* y la *exactitud*; la *selectividad*, que dependerá del elemento de reconocimiento; la *sensibilidad*, que dependerá de la pendiente de la función de respuesta y del intervalo de trabajo; el *tiempo de respuesta*, que afectará a la posibilidad de realizar medidas en tiempo real y/o una alta frecuencia de análisis; el *tiempo de vida*, que deberá ser elevado en aplicaciones de monitorización. Este parámetro va muy asociado, normalmente, a la estabilidad de la fase sensora ya que suele ser el componente más vulnerable; y la *reversibilidad* del proceso de reconocimiento selectivo, para viabilizar la reutilización del sensor.

Por otro lado, si los sensores químicos pretenden ser una instrumentación alternativa a los grandes equipos empleados en los métodos clásicos de análisis, éstos deben cumplir, además, los siguientes requisitos:

- *Bajo coste*: especialmente importante en el caso de instrumentación desechable.
- *Manejabilidad, portabilidad y tamaño reducido*: con el fin de poder realizar medidas *in situ* y/o con pequeñas cantidades de muestra, y sin necesidad de personal especializado.

- *Robustez*: los sensores han de preservar sus características operativas frente a distintos medios, matrices, independientemente de las condiciones ambientales.

1.2. SENSORES OPTOQUÍMICOS

Como se ha visto en el apartado anterior, de entre los distintos tipos de sensores químicos, existen los que, al interaccionar selectivamente con el analito, generan una señal primaria del dominio óptico: son los denominados sensores optoquímicos, de los cuales se ocupa el presente trabajo.

El desarrollo de los sensores ópticos ha sido más tardío que el de los electroquímicos, debido básicamente a que ha ido ligado a la necesidad de nueva tecnología para la fabricación a bajo coste de componentes ópticos.

Entre los años 1930 y 1960, se publicaron los primeros trabajos en los que se presentaban dispositivos que realizaban medidas de luminiscencia, concretamente de *quenching* de fluorescencia de indicadores inmovilizados selectivos a oxígeno, [16,17] pero fue en 1975 cuando Lübbers y Opitz por primera vez desarrollaron un sensor óptico. [18]

El proceso de transducción de los sensores optoquímicos se basa en las siguientes etapas: la conducción de luz desde la fuente a la muestra o a una fase de reconocimiento en contacto con la muestra, su interacción que proporciona como resultado la respuesta analítica y su conducción desde ésta hacia el detector, donde es convertida en una señal eléctrica (**Figura 1.1**). [20]

El avance más importante acaecido en el campo de los sensores ópticos es el acoplamiento de éstos a fibras ópticas, patentado por primera vez por Hesse en 1974. [19] Desde entonces, muchos trabajos han sido publicados involucrando fibras ópticas e indicadores, [20,21] y en los últimos años, éstos han empezado a representar una alternativa a otros tipos de sensores en aplicaciones como el control de procesos, [22-24] la química clínica, [25] o el análisis de aguas. [26,27]

Entre las múltiples ventajas de utilizar fibras ópticas en sensores ópticos, destacan su gran capacidad de transmisión de información (posibilidad de desarrollo de multisensores) con bajas pérdidas, y su flexibilidad y versatilidad, posibilitando fácilmente la miniaturización y el acceso a lugares remotos o peligrosos. [28-31]

El enorme interés que despiertan los sensores ópticos se deriva de las ventajas intrínsecas que éstos ofrecen respecto a sensores basados en otros mecanismos de transducción y que se enumeran a continuación:

- No requieren una señal de referencia que hace más costosa la instrumentación, como en el caso de los sensores electroquímicos.

- Facilidad de miniaturización y versatilidad en los esquemas de transducción. Adicionalmente, la posibilidad de reemplazar de forma sencilla la parte sensora da lugar a dispositivos desechables, muy útiles en química clínica.
- Posibilidad de determinación de analitos que no pueden ser medidos mediante detección electroquímica
- Ausencia de interferencias eléctricas
- Amplia variedad de aplicaciones cuando son acoplados a fibras ópticas. Por ejemplo, su uso es apropiado en el seguimiento *in vivo* de parámetros de interés clínico, por la facilidad de esterilización, por la ausencia de conexiones eléctricas y por ser un análisis no destructivo. En muchas ocasiones, pueden realizarse también medidas no invasivas.

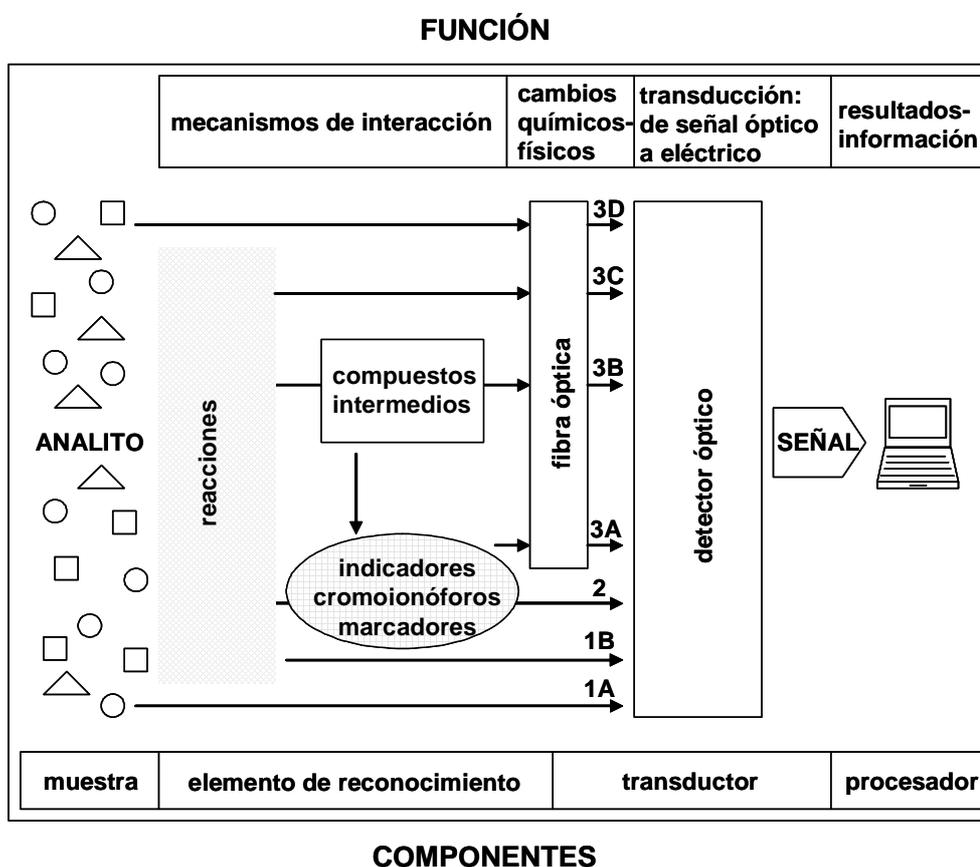


Figura 1.1. Mecanismos de interacción química posibles en los distintos tipos de sensores optoquímicos: medida directa de analitos con propiedades espectroscópicas (1A), tras un proceso de quimioluminiscencia (1B); medida del resultado de la interacción de la luz con indicadores y marcadores inmovilizados en un soporte (2); medida proveniente de un cambio de las propiedades intrínsecas físicas o químicas de una fibra óptica como resultado de la presencia de un indicador (3A), de un analito intermedio (3B), de un elemento de reconocimiento (3C) y del analito (3D). Se indican también los componentes básicos de los sensores químicos ópticos y su función.

Sin embargo, este tipo de sensores también presentan una serie de inconvenientes, como los que a continuación se exponen:

- La luz ambiental puede interferir en la medida. Aunque éste problema es solucionable aislando convenientemente la zona de reconocimiento o bien usando fuentes de luz pulsadas.
- Presentan un intervalo lineal de respuesta relativamente pequeño (dos décadas de concentración) en comparación con los electroquímicos.
- La estabilidad de los componentes con propiedades ópticas inmovilizados es limitada, debido a la fotodescomposición y a la exudación de la matriz a la disolución.
- Los tiempos de respuesta son del orden de minutos en el caso de usar fases de reconocimiento, ya que la transferencia del analito de la disolución a la fase viene controlada por difusión.

Debido a que la mayoría de analitos no presentan propiedades ópticas, gran parte de los sensores optoquímicos hacen uso de la química de indicadores y de métodos de inmovilización de éstos sobre el transductor.

La presente tesis se enmarca en la obtención de nuevos sensores miniaturizados de fluorescencia selectivos de iones de aplicación en química analítica, por lo que a lo largo de este capítulo se hará hincapié, tanto en todos aquellos aspectos relacionados con el elemento de reconocimiento, como en la instrumentación necesaria para el desarrollo de sensores ópticos miniaturizados.

1.2.1. Clasificación de los sensores optoquímicos

De las muchas clasificaciones posibles, a continuación se comentan aquellas relacionadas con los sensores desarrollados en el presente trabajo.

1.2.1.1. Según la interacción luz-materia

Distintos procesos pueden tener lugar cuando interaccionan energía y materia, provocando así cambios en la intensidad, en la longitud de onda, en la dirección de transmisión o en cualquier propiedad física de la radiación. Según los diferentes procesos, existen sensores de *absorbancia*, *luminiscencia*, *reflectancia*, *dispersión Raman*, *interferometría* y *elipsometría*. Estos fenómenos de interacción óptica pueden utilizarse en modo convencional o en modo de onda evanescente (en la zona de penetración de la luz entre el núcleo y el revestimiento de una guía de onda o fibra óptica), como en el caso de los *sensores de resonancia de plasmones superficiales* o SPR. [32]

Sensores de absorbancia

La respuesta óptica es debida a cambios en la absorción de luz de las especies que se encuentran en el camino óptico y se utiliza la transmitancia (fracción de radiación incidente transmitida hacia el detector) como medida experimental. A su vez, la absorbancia se relaciona con la concentración de las especies absorbentes a través de la bien conocida ley de Lambert-Beer. Así, relacionaremos la señal obtenida con la concentración mediante las siguientes ecuaciones,

$$A = \log T = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot b \cdot C \quad (1)$$

donde A es la absorbancia; T, la transmitancia; I_0 , la intensidad de luz del haz incidente; I, la intensidad de luz transmitida; ε , el coeficiente de absortividad molar ($\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); b, la longitud del camino óptico (cm) y C, la concentración de las especies absorbentes ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

No obstante, no siempre se mantiene la relación lineal entre absorbancia y concentración. En la práctica, existen numerosos factores que limitan el cumplimiento efectivo de la ley, por lo que solo es aplicable en disoluciones diluidas ($< 0.01 \text{ M}$). Así, por ejemplo, el índice de refracción de la disolución se modifica al incrementar la concentración y con él también lo hace ε , lo que origina errores en la medida. También se han de tener en cuenta otros problemas químicos o instrumentales. La posibilidad de que se establezcan interacciones entre el analito y el disolvente que modifiquen sus propiedades ópticas; absorciones inespecíficas de la matriz de la muestra; o el uso de luz no estrictamente monocromática son algunos ejemplos de problemas que afectan a la viabilidad de la aplicación del fenómeno de absorción de radiación con fines analíticos. A pesar de todo, la espectroscopia de absorción es una de las técnicas más utilizadas tanto en el análisis químico convencional, [31-35] con multitud de aplicaciones en distintos campos, [36-39] como en el desarrollo de sensores ópticos. [40-42] Su sencillez conceptual e instrumental hace que su implantación haya sido superior a la de otras técnicas más sensibles (como la fluorescencia) y, por lo tanto, más apropiadas para su uso en sistemas miniaturizados.

Sensores de luminiscencia

Se basan en el fenómeno de emisión de radiación electromagnética por parte de las moléculas que, tras absorber energía y pasar a niveles electrónicos excitados, emiten radiación al volver al estado electrónico fundamental. Si la transición al nivel excitado se realiza absorbiendo radiación, el proceso de emisión se denomina fotoluminiscencia. Si la

energía que utiliza la molécula proviene de una reacción química, el proceso de emisión se denomina *quimioluminiscencia*. Los procesos de fotoluminiscencia se pueden dividir en *fluorescencia* y en *fosforescencia*, según la naturaleza del estado excitado. Si las moléculas se relajan desde un estado singlete (electrón apareado respecto al estado fundamental) a otro singlete, lo cual está permitido por la mecánica cuántica, el fenómeno que tiene lugar es la fluorescencia. Las velocidades de emisión son del orden de 10^8 s^{-1} . Por otro lado, si la relajación tiene lugar desde un estado excitado triplete (electrón desapareado respecto al estado fundamental) a singlete, se da la fosforescencia. Esta transición no está cuánticamente permitida, con lo que es mucho más lenta que la fluorescencia, del orden de milisegundos a segundos.

Los sensores basados en medidas de fluorescencia son muy sensibles y más selectivos respecto a interferencias de matriz, puesto que existen menos moléculas capaces de emitir luminiscencia que de absorber radiación. Además, respecto a luz parásita es posible seleccionar tanto la longitud de onda de excitación como la de emisión. Estas ventajas, sumadas al gran desarrollo que la instrumentación óptica ha experimentado en los últimos años en lo relativo a fuentes y detectores miniaturizados y/o guías de onda, han propiciado un creciente uso de las técnicas luminiscentes. [43,44] En concreto, las medidas de fluorescencia han encontrado un amplio abanico de aplicaciones en el ámbito bioquímico y medioambiental. [45-47] No obstante, son técnicas que utilizan instrumentación más compleja que la empleada en los sensores de absorbancia.

Todo sensor luminiscente requiere un cambio en alguna propiedad de la luminiscencia en respuesta al analito. Este cambio puede ser en la intensidad o en el tiempo de vida de emisión o en la anisotropía del espectro del elemento de reconocimiento. Los posibles modos de medida se esquematizan en la **Figura 1.2**. Los sensores que miden intensidad de luminiscencia pueden cuantificar directamente el analito si tiene propiedades luminiscentes, o bien lo hacen indirectamente midiendo la atenuación o *quenching* de la intensidad de emisión de un luminóforo adicional cuando éste interacciona con el analito.

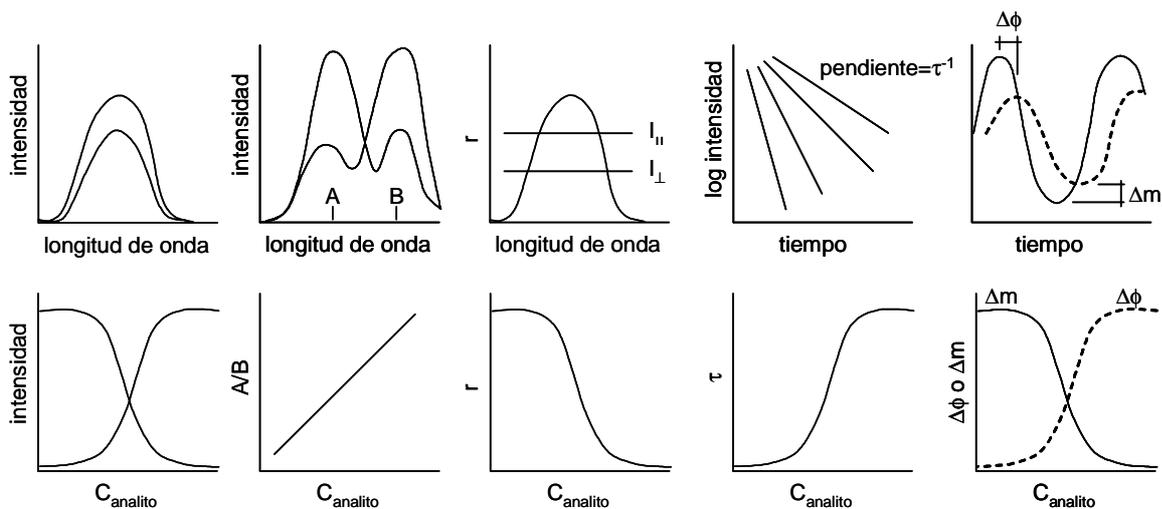


Figura 1.2. Cambios espectrales observables en sensores de fluorescencia (arriba) y correspondientes funciones de calibrado resultantes (debajo). De izquierda a derecha: medidas de intensidad, de relación de intensidades, de anisotropía, de tiempo de vida en el dominio del tiempo y de tiempo de vida en modulación de fase.

Si la cuantificación es directa, la intensidad de luminiscencia es proporcional a la concentración de la especie luminiscente, según la siguiente ecuación:

$$I = k \cdot I_0 \cdot \Phi \cdot \epsilon \cdot b \cdot C \quad (2)$$

donde I es la intensidad de la radiación luminiscente; k , una constante de proporcionalidad; I_0 , la intensidad de luz del haz incidente; Φ , el rendimiento cuántico (número de fotones emitidos/número de fotones absorbidos); ϵ , el coeficiente de absorptividad molar ($\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$); b , el camino óptico (cm) y C , la concentración de especie luminiscente ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$). Esta relación solo se cumple a concentraciones bajas de especie luminiscente ($2.303 \epsilon \cdot b \cdot C \leq 0.05$).

En cambio, cuando el analito es un atenuador (*quencher*) que modifica la intensidad de fluorescencia que emite un luminóforo mediante una sola reacción, su concentración se relaciona linealmente con la relación de intensidades en presencia o ausencia de éste mediante la relación de Stern-Volmer,

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

donde I_0 es la intensidad de fluorescencia en ausencia de atenuador Q , mientras que I es la intensidad en presencia de diferentes concentraciones de Q ; K_{SV} es la constante de Stern-Volmer y $[Q]$ es la concentración de atenuador, en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Los sensores basados en medidas de intensidad de fluorescencia son los más utilizados, pero plantean problemas debido a que la constante irradiación del fluoróforo, que constituye el elemento de reconocimiento, provoca su rápida degradación. Además, en aplicaciones reales también pueden aparecer otras fuentes de disminución de la intensidad de fluorescencia distintas a la presencia de analito, como son la absorbancia de la radiación emitida por alguno de los componentes de la matriz de la muestra o la dispersión de ésta por la existencia de turbidez, entre otras. Así pues, para solventar estos problemas, se han desarrollado sensores basados en luz pulsada para llevar a cabo la excitación periódica de la especie fluorescente. En ellos se mide el tiempo de vida de fluorescencia. [48-53]

Estos sensores determinan el tiempo promedio en el que una molécula permanece en el estado excitado (tiempo de vida). Existen dos métodos ampliamente usados: el primero consiste en excitar la muestra con un breve pulso de radiación y, posteriormente, medir la disminución de la intensidad de fluorescencia en función del tiempo; y el segundo, en excitar la muestra con luz sinusoidalmente modulada y calcular el tiempo de vida a partir del desplazamiento de fase y de la desmodulación de la emisión. Los datos resultantes pueden revelar la frecuencia de colisiones de los atenuadores o *quenchers* (donde se aplica una ecuación de Stern-Volmer modificada), la velocidad de transferencia de energía y la velocidad de reacciones que se dan en el estado excitado. Estos datos son además necesarios cuando se realizan medidas de anisotropía de fluorescencia.

En ocasiones en las que es difícil determinar la concentración real de luminóforo, por ejemplo cuando tienen lugar la fotodescomposición o la exudación de éste, es útil tomar medidas proporcionales a un cociente. De este modo, la concentración de analito puede determinarse por el cociente de intensidades de luminiscencia medidas a dos longitudes de onda, la de excitación o la de emisión. Otra posibilidad es la medida del cambio en la polarización o en la anisotropía de fluorescencia que provoca el analito (existen tanto medidas en el estado de equilibrio, como resueltas en el tiempo). Las medidas de anisotropía revelan el desplazamiento angular promedio de un fluoróforo que tiene lugar entre la absorción y la subsiguiente emisión de un fotón. Este desplazamiento depende de la velocidad y de la magnitud de la difusión rotacional durante el tiempo de vida del estado excitado que, a su vez, depende de la viscosidad del disolvente. Debido a que la escala de tiempo de la difusión rotacional de las biomoléculas es comparable al tiempo de atenuación de muchos fluoróforos, estas medidas han sido aplicadas al estudio de sistemas bioquímicos.

1.2.1.2. Según la fase ópticamente activa o elemento de reconocimiento

Debido a que la mayoría de analitos no presentan propiedades ópticas, los sensores optoquímicos necesitan incorporar un componente que varíe alguna de sus propiedades espectroscópicas con la presencia de analito. En función de cómo se encuentra inmovilizado este componente en la fase que está en contacto con el analito, los sensores ópticos se pueden dividir en sensores basados en fenómenos de superficie o en sensores de matriz tridimensional (*bulk optodes*). Cada tipo de fase ópticamente activa implica un mecanismo determinado de reconocimiento y de respuesta.

Sensores basados en fenómenos de superficie

Los componentes con propiedades ópticas que estos sensores incorporan se encuentran inmovilizados sobre un soporte sólido en contacto con la muestra (**Figura 1.3a**), que puede ser, o bien una matriz porosa (polímeros, copolímeros, hidrogeles o vidrios), o bien la superficie de un elemento óptico (guías ópticas, prismas, metal, etc.). Normalmente se trata de matrices hidrofílicas activadas con derivados de los clásicos indicadores colorimétricos solubles en agua. La inmovilización del elemento de reconocimiento óptico [54] (por adsorción física, [55,56] mediante interacciones covalentes [57,58] o electrostáticas [59,60]) puede realizarse a través de métodos mecánicos, [61] por inmersión (*dip coating*), [62] o bien por fotopolimerización. [63] La respuesta a un analito determinado viene dada por los equilibrios que se establecen en la interfase del soporte con la disolución. Éstos, a su vez, están controlados por las leyes de difusión de Fick y por las condiciones de adsorción.

Sensores de matriz tridimensional (*bulk optodes*)

En este tipo de sensores, los elementos ópticamente activos están disueltos en una fase orgánica, que a su vez está embebida en el interior de una matriz polimérica, formando así, una fase homogénea que se denomina comúnmente optodo (*bulk optode*). Una película de esta fase homogénea (también llamada membrana líquida polimérica) se deposita en una superficie inerte quedando en contacto con la disolución (**Figura 1.3b**). El reconocimiento del analito implica la transferencia de éste desde la disolución al interior de la membrana, mediante un proceso muy parecido a una extracción líquido-líquido. La entrada del analito provoca un cambio en las propiedades ópticas de un elemento disuelto en ella (indicador). La respuesta de los optodos selectivos de iones depende de los equilibrios implicados en el proceso de generación de ésta. Existen diferentes mecanismos posibles en función de la composición de la membrana, y más concretamente, según el tipo de elemento complejante que incorpore como componente selectivo (un portador neutro o cargado [64]), del indicador

y del analito. La composición de las membranas sensoras es muy similar a la de los electrodos selectivos de iones (ESI), ampliamente usados en potenciometría, hecho que ha facilitado su desarrollo. En el apartado § 1.3 se tratará más ampliamente este tipo de membranas, ya que son las que se utilizarán como elemento de reconocimiento en los sensores desarrollados en el presente trabajo.

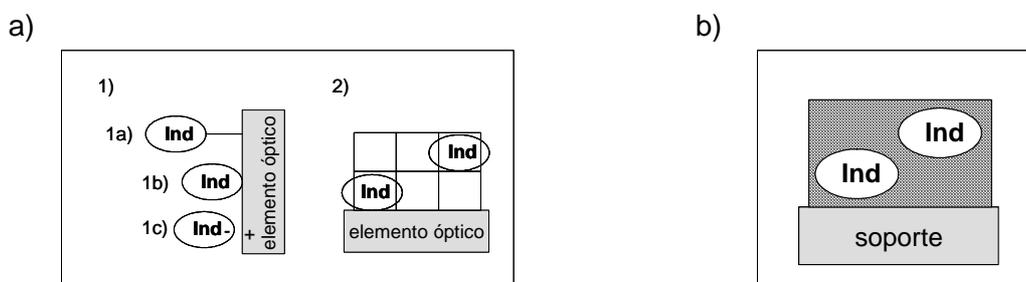


Figura 1.3. a) *Sensores ópticos basados en fenómenos de superficie.* 1) El componente con propiedades ópticas (Ind, indicador) puede estar 1a) unido covalentemente al elemento óptico, 1b) adsorbido en su superficie o bien 1c) unido a ella por atracción electrostática. 2) El indicador está atrapado en una matriz porosa. **b)** *Sensor de matriz tridimensional.* En este caso el indicador está disuelto en una fase homogénea que consta de una matriz polimérica plastificada (con un disolvente orgánico).

1.2.2. Instrumentación de los sensores optoquímicos

La instrumentación empleada tradicionalmente en los sensores ópticos, tanto para realizar medidas de absorbancia como de fluorescencia en la región UV-Vis-NIR, es simple, ya que consta de componentes ópticos convencionales. En ambos casos, los elementos básicos son: una *fuentes de luz*, *selectores de longitud de onda* (en el caso de trabajar con fuentes de luz policromáticas), *guías de onda* y un *detector*. Además, muy a menudo se usan *polarizadores*, *lentes* y otros componentes adicionales. Con posterioridad a la transducción, generalmente se amplifica la señal como paso previo al procesamiento de los datos. Aunque utilizan los mismos elementos instrumentales, la diferencia básica entre la instrumentación utilizada en las técnicas de absorción y en las de emisión, es la disposición de éstos (**Figura 1.4**). En los apartados siguientes se detallan los componentes y su configuración para cada tipo de medida.

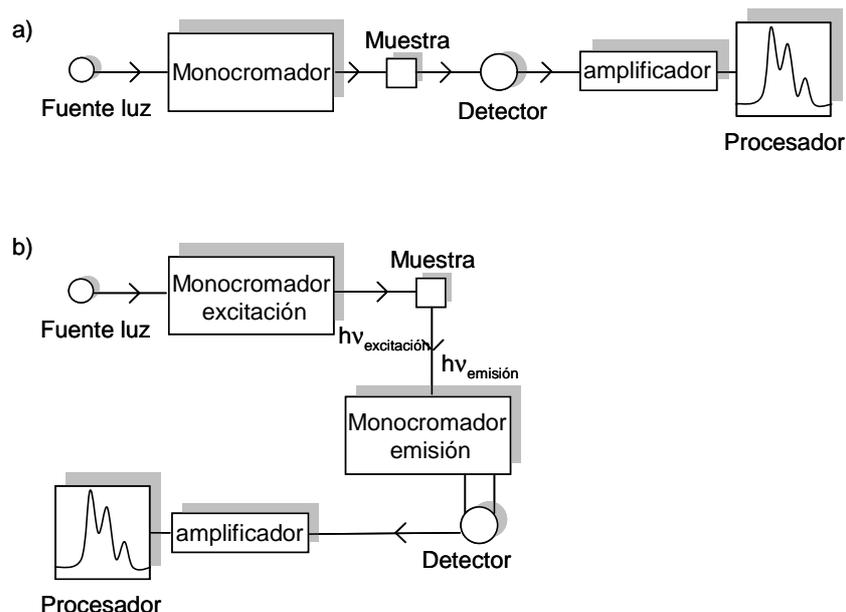


Figura 1.4. a) Esquema y componentes de un espectrofotómetro y b) de un espectrofluorímetro.

1.2.2.1. Fuentes de luz

En el mercado existen muchos tipos de fuentes de luz disponibles. [65,66] Para medidas espectrales de absorción y de fluorescencia molecular es necesaria una fuente cuya potencia sea estable con el tiempo y que la radiación emitida abarque el intervalo de longitudes de onda adecuado. Por otra parte, para medidas a una longitud de onda determinada, será conveniente el uso de una fuente lo más monocromática posible. Así, para poder escoger la fuente de luz adecuada para cada tipo de medida o de sensor, habrá que tener en cuenta sus características. Además de la potencia de emisión de la fuente y la anchura de banda de la radiación hay otras características importantes a considerar, como son la estabilidad, el tamaño, el tiempo de vida, el calentamiento, el ruido y la coherencia. Las fuentes de luz pueden ser de espectro continuo o de líneas. También se pueden utilizar fuentes monocromáticas (láseres) o LEDs (diodos emisores de luz).

Existen dos tipos de fuentes de radiación continua: las *incandescentes* y las de *arco*. Ambas son de baja intensidad, de tamaño grande y emiten luz blanca, con lo que se usan junto con selectores de onda.

Las *fuentes incandescentes* son aquellas en las que la resistencia al paso de corriente a través de un filamento provoca el calentamiento de éste hasta la incandescencia y la consiguiente emisión de luz. Son poco eficientes, solo un 10% de la energía disipada es en forma de radiación, su tiempo de vida es corto y la emisión depende del voltaje de la fuente

de alimentación. Además, su emisión en la región UV es baja. Sin embargo, son las más simples y baratas. En la región del visible y del NIR, las más utilizadas son las de tungsteno (350-2500 nm).

Las *fuentes de arco* se basan en la generación de un arco eléctrico a través de un gas, que puede estar a alta o baja presión. Como producto de la recombinación de electrones con los átomos de gas ionizados (resultado de la colisión del gas con los electrones que fluyen a través del arco), emiten luz continua. Los gases más empleados son el deuterio (lámpara de baja presión, útil para medidas en el UV, ya que emite luz continua de 160 a 375 nm) y el xenón (la más versátil y que emite luz continua de 250 a 700 nm, con líneas agudas cerca de 450 nm y por encima de los 800 nm). Su intensidad de emisión es superior a las incandescentes.

Las fuentes de líneas como las de vapor de mercurio emiten un número de longitudes de onda discreto aunque presentan una intensidad de emisión muy elevada.

Todas las fuentes descritas hasta ahora tienen un amplio uso en sistemas convencionales de medida de absorción y emisión molecular, pero, en general, no se pueden pulsar, ni su amplitud se puede modular.

Láseres

Los láseres, acrónimo inglés de *light amplification by stimulated emission of radiation* (amplificación de luz por emisión estimulada de radiación), son fuentes de radiación basadas en el principio de la emisión inducida o estimulada, para generar un haz de luz coherente. A este efecto, necesitan de un medio activo, capaz de generar el láser. El material base para su obtención puede ser: (1) un cristal sólido como el rubí; (2) un semiconductor como el GaAs; (3) una disolución de un colorante orgánico (*dye lasers*), o bien (4) un gas como Ar o Kr.

En la generación de un láser se producen cuatro procesos básicos: bombeo, emisión espontánea de radiación, emisión estimulada de radiación y absorción.

Debido a su principio de funcionamiento, los láseres emiten radiación muy intensa, monocromática (anchos de banda de 0.01 nm o menos) y coherente. Ofrecen también una gran estabilidad y larga duración. Debido a estas características, su utilización como fuentes de luz en las regiones UV-visible e IR del espectro electromagnético se ha incrementado notablemente.

De entre los láseres existentes, destacan el de He-Ne (543.5 nm y 632.8 nm), como láser que utiliza átomos neutros como especies activas (siendo éste de los más utilizados, por su bajo coste y reducido tamaño); el de Ar-Kr (351.1, 475.9, 488.0 y 514.5 nm), que

utiliza iones como especies activas; el de CO₂ o N₂, para el infrarrojo; y sobre todo los láseres de diodo (o diodos láser). Estos últimos son los más utilizados en los últimos años debido a que presentan un tamaño y costes de fabricación reducidos. Son láseres construidos con materiales semiconductores y presentan además las propiedades y características de los diodos eléctricos. Su aplicación masiva en comunicaciones ópticas y en electrónica de consumo (escáneres, impresoras, CDs) ha facilitado el abaratamiento de los costes de fabricación y su miniaturización. La longitud de onda de emisión depende del semiconductor utilizado; por ejemplo, el láser de GaAlAsP emite a 670 nm y el de GaAlAs lo hace a 780 nm. Además, como ventajas adicionales, su amplitud puede modularse a varios gigahercios (gran ancho de banda), la emisión puede ser pulsada y su acoplamiento a fibras ópticas es sencillo.

Finalmente, aunque en los últimos años el número de dispositivos láser desarrollado se ha ampliado notablemente, la mayoría de ellos todavía tienen un tamaño demasiado grande para aplicaciones portátiles o en campo, que es uno de los propósitos del empleo de sensores químicos y sobretodo un coste que dificulta su uso generalizado.

LEDs

Un LED, acrónimo inglés de *light-emitting diode* (diodo emisor de luz), es un dispositivo semiconductor (diodo) que emite luz espontáneamente casi monocromática y no coherente cuando se polariza directamente la unión p-n y circula por él una corriente eléctrica.

La banda de longitudes de onda que emite, y por lo tanto su color, depende del material semiconductor utilizado (de la separación energética de los materiales que conforman la unión p-n), pudiendo variar desde el ultravioleta, pasando por el visible, hasta el infrarrojo. Los LEDs convencionales están fabricados con materiales semiconductores inorgánicos. La anchura espectral de la luz que emiten es de unos 20-40 nm. Son fuentes de pequeño tamaño, pueden acoplarse a fibras ópticas y, debido a su producción en masa, son muy económicas. Por ello se usan ampliamente para el desarrollo de sensores ópticos. Sin embargo, estos dispositivos presentan algunas limitaciones, como son el efecto de la temperatura en su emisión, su tiempo de vida relativamente corto y el limitado número de longitudes de onda accesibles. Aunque actualmente se están comercializando ya algunos LEDs en UV, los más comunes emiten entre 450 nm y el NIR (infrarrojo cercano).

1.2.2.2. Selectores de longitud de onda

El uso de fuentes de radiación continua hace necesario el empleo de dispositivos selectores de longitud de onda (*monocromadores, filtros, etc.*) capaces de limitar la anchura espectral de la radiación involucrada en un análisis espectroscópico. Esta condición es imprescindible para viabilizar una aplicación adecuada de la ley de Lambert-Beer. Principalmente, existen dos tipos de selectores de onda: los monocromadores y los filtros ópticos.

Los *monocromadores* dispersan la luz blanca o policromática en varios colores o longitudes de onda mediante prismas o redes de difracción. Son componentes básicos para la selección de la longitud de onda tanto en espectrofotómetros, como en espectrofluorímetros (con un monocromador de excitación y otro de emisión) (**Figura 1.4**). Sin embargo, éstos no son adecuados para aplicaciones analíticas que usen sensores debido a su gran tamaño y alto coste.

En el campo de los sensores, se usan los *filtros ópticos* para mejorar la señal de salida, cuando el objetivo es la construcción de instrumentación compacta y a una longitud de onda fijada y preestablecida. De acuerdo con la región del espectro que transmiten y que atenúan se pueden clasificar en: *filtros de corte (cut-off filters)* con transmitancias del 100% en una zona del espectro y nulas en el resto, disminuyendo rápidamente a partir de una longitud de onda y en *filtros de paso de banda (band pass filters)* que únicamente transmiten un intervalo de longitudes de onda. Ambos se pueden combinar. Además, existen también los llamados *filtros de rechazo (notch filters)*, que rechazan la luz a una determinada longitud de onda y transmiten el resto, siendo así útiles para eliminar la luz dispersa.

Entre los filtros ópticos, según su principio de filtrado, se pueden distinguir los de *absorción* y los de *interferencia* (también denominados de Fabry-Perot). Los de absorción consisten generalmente en un vidrio coloreado que absorbe ciertas longitudes de onda y acostumbran a tener un ancho de banda entre 30 y 250 nm. Generalmente se usan en la región del visible y aunque de menor calidad que los de interferencia, son efectivos, muy versátiles y baratos. [67]

Los filtros de interferencia son constituidos por un dieléctrico transparente (CaF_2 o MgF_2) entre dos películas metálicas semitransparentes, colocados a su vez entre dos placas de vidrio. El grosor del dieléctrico determina la longitud de onda transmitida y el funcionamiento de estos filtros se basa en el principio de las interferencias ópticas. Los anchos de banda característicos oscilan entre un 1.5 y 0.5% de la longitud de onda de transmitancia de pico.

1.2.2.3. Guías de onda

Una guía de onda es cualquier estructura física (que puede ser cilíndrica o plana, de vidrio o de plástico) que confina y conduce las ondas electromagnéticas, mediante el fenómeno de reflexión interna total. Este fenómeno tiene lugar cuando la radiación, que atraviesa un medio de índice de refracción n_1 (núcleo) mayor que el índice de refracción n_2 del material que lo recubre (revestimiento), no es capaz de atravesar la interfase entre ambos medios, reflejándose completamente. La radiación queda confinada en el núcleo, y por reflexiones sucesivas se propaga por su interior. Este fenómeno sólo se produce para ángulos de incidencia superiores a un cierto valor crítico, el ángulo crítico θ_c . La radiación que incide en la interfase con ángulos menores que el ángulo crítico se refracta, no propagándose así a través de la guía. Este ángulo determina también el cono de aceptación de una fibra, a menudo expresado como la apertura numérica (NA). Un valor de apertura numérica alto permite introducir luz en la guía que incide desde trayectorias de entrada bastante diferentes, pero, a su vez, provoca un aumento de la dispersión de luz.

Por lo que a su configuración se refiere, las guías son versátiles y las más usadas en sensores ópticos son las cilíndricas (capilares y fibras ópticas) y las planas. Nos centraremos en las fibras ópticas, que son las directamente relacionadas con el presente trabajo.

Fibras ópticas

Están constituidas por hebras cilíndricas y finas de vidrio, plástico o sílice fundida (según su aplicación) de diámetros entre 0.05 μm y 0.6 cm. Las de vidrio de SiO_2 se emplean para transmitir luz en la región UV-vis-NIR; las de vidrio de fluoruros metálicos en la región IR; y las de plástico (p.ej. de policarbonato, poliestireno, polimetilmetacrilato) son de aplicación en el visible y se usan mucho en el ámbito clínico. [68]

Según si pueden soportar un único modo de transmisión o varios, se distinguen las *fibras monomodo* y las *multimodo*. Las fibras en las que se puede propagar sólo un modo de transmisión, con diámetros inferiores a diez veces la longitud de onda de la luz que se propaga, son las monomodo. En cambio, las fibras multimodo, con núcleos mayores a 10 μm , soportan más de un modo de propagación, debido a que tienen mayor NA. A mayor ángulo de aceptación, más radiación puede reflejarse en la guía con distintos ángulos de reflexión, viéndose limitada la capacidad de transmisión de información. Las fibras multimodo son más apropiadas para transportar altas potencias a distancias cortas y también son las más utilizadas en sensores ópticos. El extremo de una fibra puede además soportar la zona sensora o elemento de reconocimiento, o bien ésta puede disponerse

lateralmente entre núcleo y revestimiento, como es el caso de los sensores basados en onda evanescente.

1.2.2.4. Detectores

Para medir la radiación en sensores ópticos, se usan *fotodetectores*, los cuales generan una corriente eléctrica proporcional a la intensidad de radiación que reciben. Los fotodetectores, [69] según su funcionamiento, se pueden dividir en tres categorías: 1) *detectores fotoeléctricos o cuánticos*, que responden a fotones individuales; 2) *detectores coherentes*, que operan en la interacción del campo eléctrico de la radiación incidente con un oscilador local; y 3) *detectores térmicos*, que responden al calor (radiación infrarroja) y que generalmente son usados como medidores de potencia (potencia media de la radiación incidente).

Los detectores de fotones generan directamente una señal eléctrica como resultado de la interacción de éstos con una superficie activa capaz de absorber radiación. Son muy usados para medir las radiaciones ultravioleta, visible o infrarroja cercana. Así, a continuación se describen más detalladamente los dos tipos básicos de detectores de fotones: los *fotoemisores* y los *fotoconductores*.

Fotoemisores

En estos dispositivos, la energía absorbida causa la emisión de electrones y el desarrollo de una corriente eléctrica. Un ejemplo de éstos son los *fototubos de vacío* y los *tubos fotomultiplicadores*.

Los *fototubos* consisten en un ánodo de filamento y un cátodo semicilíndrico herméticamente encerrados al vacío en un receptáculo transparente y conectados a un circuito auxiliar. La superficie cóncava del cátodo mantiene una capa de material fotoemisor, que al ser irradiado tiende a emitir electrones. La fotocorriente inducida por la radiación origina una caída de potencial a través de una resistencia, que se amplifica y se mide. La sensibilidad e intervalo de longitudes de onda útil dependen del material de construcción del cátodo. Así, los fototubos comerciales usan una gran variedad de superficies emisoras, que se dividen en: altamente sensibles, sensibles al rojo, sensibles al ultravioleta y de respuesta plana.

Los *tubos fotomultiplicadores*, muy similares a los fototubos aunque presentan ventajas significativas para la medida de potencias radiantes pequeñas. La superficie catódica es de composición parecida a la de los fototubos, pero a diferencia de éstos, incluyen unos

electrodos adicionales, los díodos, los cuales son los responsables de la amplificación. Su respuesta es rápida y son muy sensibles a las radiaciones ultravioleta y visible. Debido a la alta corriente de oscuridad originada en gran parte por la emisión térmica, a menudo incorporan un sistema de refrigeración. Una limitación de estos dispositivos es que sólo pueden medir radiación de baja potencia, ya que la luz intensa provoca daños irreversibles en la superficie fotoemisora. Consecuentemente, han de estar aislados de la luz. Respecto a su aplicación, son detectores muy utilizados en espectrofotómetros convencionales, pero al ser de gran tamaño y alto coste, no resultan adecuados para el desarrollo de sensores miniaturizados. Además, requieren de una fuente de alimentación de alta tensión.

Fotoconductores

En los detectores *fotoconductores*, la radiación incidente promociona electrones a las bandas de conducción, aumentándose así la conductividad, que es medida para llevar a cabo la detección. Pertenecen a este tipo de detectores:

1) las *células fotovoltaicas*, en las que la energía radiante genera una corriente en la interfase entre una capa semiconductor y un metal. Se usan para medir la radiación de la región visible.

2) los *detectores de fotoconductividad*, en los que la absorción de la radiación por un semiconductor produce electrones y huecos, originando un aumento de conductividad. Es decir, las resistencias del semiconductor disminuyen cuando se absorbe radiación. Alcanzan su máxima sensibilidad en la región del infrarrojo cercano (0.75-3 μm).

3) los *fotodiodos*, en los que los fotones aumentan la conductancia a través de una unión *p-n* de polarización inversa (fotodiodos PIN). Los materiales más comunes en la fabricación de los fotodiodos son el silicio (300-1000 nm), el germanio, InGaAs, InAs y InSb. Son más sensibles que un fototubo de vacío, pero menos que un tubo fotomultiplicador. Su pequeño tamaño y rápida respuesta en un amplio intervalo de longitudes de onda los hace muy interesantes en la construcción de sensores, miniaturizados y portátiles. Con el tiempo, en muchas aplicaciones, los fotodiodos (y dispositivos mucho más sofisticados [70]) han ido suplantando a los detectores de fotoconductividad. Actualmente, el uso de series lineales de diodos (*diode arrays*) [71] o de series de diodos en una matriz bidimensional (dispositivos de carga acoplada o Charge-Coupled Devices, CCD) [72] posibilita la detección múltiple y simultánea de varias longitudes de onda.

1.3. LOS SENSORES OPTOQUÍMICOS BASADOS EN OPTODOS

Los sensores optoquímicos basados en optodos son aquellos en los que la fase reactiva es una matriz polimérica en la que están disueltos tanto los componentes ópticamente activos, como los elementos de reconocimiento selectivo. Estos dispositivos surgieron alrededor de los años 80 de la idea de aplicar las membranas selectivas utilizadas en los electrodos selectivos de iones (ESIs o *ISEs*) en el desarrollo de sensores con transducción óptica. Anteriormente, los ESIs se habían desarrollado explotando la aparición de un potencial de membrana como resultado del transporte selectivo de iones hacia el interior de una fase homogénea inmiscible en agua (membrana). Este transporte selectivo de iones es inducido por determinadas moléculas denominadas ionóforos, mimetizando las membranas biológicas. En los últimos 50 años, con el fin de aplicar este tipo de membranas, se han estudiado y obtenido multitud de compuestos transportadores selectivos a distintos iones. De este modo, los ESIs han evolucionado hasta ser una técnica analítica rutinaria. [73,74]

En los sensores optoquímicos basados en el uso de este tipo de membranas, el analito es extraído al interior de una membrana homogénea, hidrofóbica e inmiscible en agua, mediante el uso de transportadores selectivos hasta alcanzar el equilibrio termodinámico entre ambas fases. Este proceso altera la composición de la membrana provocando indirectamente un reajuste de los equilibrios en los que interviene una especie auxiliar con propiedades espectroscópicas, que es la que, en definitiva, permite una transducción óptica de la señal.

Por lo que a las membranas ópticas de matriz tridimensional se refiere, se encuentran descritos en la bibliografía diferentes sensores selectivos de distintos analitos. En general, son cationes (como son H^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} o metales pesados) y aniones inorgánicos (p. ej. ion bicarbonato, nitrato, fosfato, Cl^- y sulfito), aunque también existen sensores de especies neutras (CO_2 , NH_3 , H_2O , alcoholes y SO_2) y de compuestos orgánicos iónicos.

1.3.1. Componentes básicos de los optodos

El optodo, que es el elemento de reconocimiento de un sensor, es la parte que proporciona selectividad hacia un analito. Además determinará otros parámetros analíticos como son la sensibilidad, el tiempo de vida y el intervalo de trabajo. Básicamente, está compuesto por una matriz polimérica plastificada, un ionóforo, un cromoforo (en el caso de que el ionóforo no posea propiedades ópticas) y aditivos iónicos.

El primer estadio en el diseño de un sensor para un analito determinado consiste en la elección del ionóforo a integrar en el optodo o membrana selectiva. Este paso es previo a la

definición de la composición global de la membrana. A continuación, es preciso fijar el resto de componentes, su cantidad y la proporción entre ellos. Al fijar dicha composición, se han de tener en cuenta aspectos como: el tipo de medida a realizar; los equilibrios posibles entre el analito y los componentes de la membrana, el tipo de muestra y su matriz, y finalmente, la instrumentación disponible. Una vez formulada y optimizada la membrana, teniendo en cuenta en todo momento la aplicación final, habrá que integrarla junto al transductor teniendo en cuenta las características y configuración de éste.

En este apartado se tratan más detalladamente los componentes de un optodo.

1.3.1.1. La matriz

La matriz es el medio donde se disuelven los responsables de la respuesta química selectiva de un sensor optoquímico (ionóforo, cromo(fluoro)foro y aditivos). Es la encargada de conferir a la fase reactiva las propiedades físicas adecuadas, como son la estabilidad mecánica y la elasticidad, además de una relativamente alta movilidad de sus componentes. Con este objetivo, la matriz generalmente está compuesta por un 33% en peso de *polímero* (habitualmente, cloruro de polivinilo, PVC) y un 66% de *plastificante*.

Polímero

En un principio, el *polímero* era sólo considerado como una matriz inerte, pero actualmente es bien conocida la importancia de la presencia en él (y en otros componentes de la membrana) de impurezas iónicas, sin las cuales la membrana no ofrece respuesta. El polímero más utilizado es el cloruro de polivinilo, PVC, y aunque la naturaleza de las impurezas del PVC comercial no está específicamente determinada, se conoce la presencia de grupos sulfato y sulfonato, provenientes de residuos de emulsionantes y que no están unidos covalentemente al polímero. Según el origen del PVC, se pueden encontrar otras impurezas, como sales de cationes lipofílicos.

Si bien las membranas de PVC son una opción económica y de fácil construcción, éstas presentan baja adherencia a la superficie de los materiales semiconductores (compatibles con la tecnología microelectrónica) y, con el tiempo, frecuentemente sufren exudación de los componentes, que migran gradualmente hacia la solución. El PVC tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) alrededor de los 80°C, haciéndose necesaria la adición de un plastificante, ya que los polímeros aptos para su uso en matrices sensoras deben tener una T_g por debajo de la temperatura ambiente. Como alternativa, se han empleado polímeros con T_g inferiores, más blandos, que no necesitan de plastificante. Un ejemplo son los poliuretanos blandos, las siliconas, el cloruro de polivinilideno y los

polisiloxanos, pero presentan el inconveniente de no poder modular su selectividad iónica cambiando el plastificante.

Asimismo, para mejorar su adherencia a superficies polares, se ha utilizado PVC modificado químicamente con grupos amino, hidroxilo y carboxilato. Otras alternativas son el uso de distintos tipos de matrices como el Nafion[®] o bien matrices fotocurables.

Plastificante

El *plastificante* (o disolvente mediador) es un disolvente orgánico de alto punto de ebullición e inmiscible en agua, cuya función en las membranas ópticas es la formación de una disolución homogénea y estable en la que se encuentren disueltos el resto de componentes y, de esta forma, junto con el polímero, dotar a la membrana de una estructura. El plastificante, además, debe ser compatible físicamente con el polímero: debe ser químicamente inerte, lipofílico, para evitar la migración de los componentes hacia la disolución y debe asegurar la movilidad de sus constituyentes. Para poder conferir todas estas características a los optodos, es necesario que el plastificante se encuentre en la membrana en gran proporción y en estado líquido, presentando una adecuada viscosidad. La lipofilicidad y la constante dieléctrica son dos de los parámetros que definen un plastificante y que hay que considerar al formular un optodo. La lipofilicidad se refiere a la capacidad de un compuesto químico de disolverse en solventes apolares (y en lípidos). Indica la afinidad por una fase orgánica frente a una acuosa, dando idea de la distribución de un compuesto entre ambas fases. La constante dieléctrica (ϵ_r) es una medida de la polarizabilidad de una molécula y el valor de ésta depende de muchos factores, como el peso molecular, la geometría de la molécula, o el tipo de interacciones que presente.

Además, el plastificante tiene la capacidad de modular la selectividad, el intervalo de respuesta y el tiempo de vida de las membranas, debido al efecto sobre la respuesta iónica que tienen algunas de sus propiedades (como son la polaridad, la capacidad coordinante y la de formación de pares iónicos). Un ejemplo de la influencia de la polaridad del plastificante sobre la selectividad de la membrana es la preferencia que se ha observado por parte de los solventes más polares a los iones divalentes respecto a los monovalentes. En otras ocasiones, la influencia sobre la respuesta no solo se explica por la polaridad del disolvente, sino que también entra en juego la capacidad coordinante de éste. Así, en un optodo selectivo a protón que funciona por intercambio catiónico de Na^+ y H^+ , se obtiene un límite de detección inferior (y por lo tanto, un intervalo de respuesta menor), al emplear el disolvente polar éter de *o*-nitrofeniloctilo en lugar del apolar sebacato de bis(2-etilhexilo), y esto se explica por la alta capacidad coordinante de éste último.

Los plastificantes usados en optodos son los mismos que los utilizados en la preparación de ESIs, [75-77] siendo los adipatos, sebacatos, ftalatos ($\epsilon_r = 4-5$) y nitroaromáticos ($\epsilon_r \approx 24$) los más habituales. Los más comunes en optodos son el sebacato de bis(2-etilhexilo), el sebacato de dibutilo, el fosfato de tris(2-etilhexilo) y el éter de *o*-nitrofeniloctilo, aunque éste último es a menudo sustituido por el éter de *o*-trifluorometiloctilo que es incoloro, y más apropiado en la construcción de optodos basados en absorbancia (no presenta interferencias).

1.3.1.2. Ionóforos

Los *ionóforos* o portadores de iones son agentes complejantes lipofílicos capaces de unirse reversiblemente a iones. Se denominan portadores de iones debido a que catalizan el transporte iónico a través de membranas hidrofóbicas, aumentando la permeabilidad de éstas. Pueden ser especies cargadas (*ionóforos cargados*) o neutras (*ionóforos neutros*). Los primeros ionóforos neutros usados en los ESIs fueron los antibióticos, [78-80] como por ejemplo, la valinomicina, [81] la cual se demostró que inducía el transporte de potasio al interior de membranas biológicas mediante procesos de reconocimiento molecular. Estos procesos se basan en la complementariedad de forma y tamaño de la cavidad del receptor con los de la molécula que reconocen, así como de la estereoquímica, principalmente, de los lugares de unión receptor-sustrato. La presencia de grupos que faciliten interacciones moleculares no covalentes de atracción (puentes de hidrógeno, dipolo-dipolo) también es decisiva en estos procesos. Los ionóforos neutros, que son principalmente compuestos macrocíclicos como éteres corona, criptandos, calixarenos o quelatos, son los más utilizados. [82] Pero no solo las moléculas que pueden formar complejos son capaces de actuar como ionóforos: cualquier reacción reversible que implique la formación de enlaces covalentes puede ser válida si el equilibrio se establece suficientemente rápido. Es el caso de ácidos y bases débiles lipofílicos, que pueden emplearse como ionóforos selectivos a protón.

En un sensor químico, y en general en membranas selectivas a iones (ESIs y optodos), la función del ionóforo es esencial: consiste en reconocer al analito selectivamente y transportarlo al interior de la membrana. Con esta finalidad, los requisitos que ha de cumplir un ionóforo son:

- alta lipofilidad, para ser estable en la membrana hidrofóbica y no exudar
- alta selectividad respecto al analito
- presentar constantes de formación del complejo analito-ionóforo y constantes de distribución de las especies entre fase acuosa y membrana apropiadas

- comportarse independientemente del pH (excepto en los ionóforos de protón)
- unirse al analito reversiblemente

Generalmente, los optodos contienen aproximadamente un 1% de ionóforo, pero tanto la cantidad de éste, como su proporción con el cromo(fluoro)foro y el aditivo iónico han de ser cuidadosamente ajustadas para asegurar una óptima respuesta al analito.

1.3.1.3. Cromo(fluoro)ionóforos

Los *cromo(fluoro)ionóforos* son transportadores de iones capaces de presentar cambios en sus propiedades ópticas al interactuar con el analito. Su estructura química incluye una zona de reconocimiento enlazada a un grupo cromóforo o fluoróforo. Un grupo cromóforo es una región molecular donde la diferencia energética entre dos orbitales moleculares cae dentro del espectro visible, y la cual es responsable de su color. Normalmente se trata de un sistema π conjugado. Cuando el analito es reconocido, este sistema electrónico π se ve modificado, lo que provoca un cambio en las propiedades espectrales (absorción UV-Vis o fluorescencia) del cromo(fluoro)ionóforo). En definitiva, éste es un proceso de transducción, donde la información química se transforma en una señal óptica. Las características que un cromo(fluoro)ionóforo debería tener para su uso en optodos son las mismas que las descritas para un ionóforo (apartado § 1.3.1.2) y además, presentar una gran variación de sus propiedades ópticas en el intervalo de concentraciones de trabajo del analito. Si se emplea un cromo(fluoro)ionóforo, es deseable que sus máximos de absorción asociados a la interacción con el analito estén lo más separados posible y que su coeficiente de absorción molar sea elevado, para asegurar una alta sensibilidad. En el caso de un fluorionóforo, es deseable un gran desplazamiento de Stokes, para que la luz de excitación no interfiera en la medida de la luz de emisión, y un rendimiento cuántico alto para obtener una máxima eficiencia. Finalmente, si la longitud de onda de su banda de excitación coincidiera con la de emisión de una fuente comercial miniaturizada como son los LEDs o láseres de diodo, representaría una gran ventaja en cuanto a la obtención de sensores más compactos y de bajo coste.

La formulación más sencilla de optodos corresponde a membranas selectivas a protón, que contienen un solo elemento de reconocimiento selectivo, que a su vez posee propiedades ópticas, es decir, un cromo(fluoro)ionóforo. Éstos son indicadores de pH lipofílicos (ácidos o bases débiles), la forma protonada y desprotonada de los cuales presentan diferencias en sus propiedades ópticas. Su pK_a en membrana define los límites del intervalo de medida del optodo.

Para analitos distintos del protón es difícil encontrar cromo(fluoro)ionóforos con una selectividad y reversibilidad adecuadas. Una alternativa que permite soslayar este problema consiste en utilizar conjuntamente un cromo(fluoro)ionóforo selectivo a protón, cuyos equilibrios de protonación/desprotonación se vean afectados por la interacción selectiva del ionóforo con el analito.

1.3.1.4. Aditivos iónicos

Los *aditivos iónicos* son iones lipofílicos, que se pueden utilizar para favorecer los procesos de transferencia del analito desde la disolución hacia la membrana. Aunque en principio no son imprescindibles para el funcionamiento de las membranas basadas en transportadores neutros, mejoran las características de respuesta de los sensores. [40,83-85] Éstos compuestos catalizan el transporte selectivo del analito desde la fase acuosa a la membrana, mejoran la selectividad de la respuesta (si el ion primario posee más carga que los interferentes), ayudan a mantener la electroneutralidad necesaria en la membrana y reducen la resistencia eléctrica que ésta ofrece.

En membranas que contienen transportadores neutros, los aditivos lipofílicos adecuados son los de signo contrario al analito a medir. En cambio, en membranas basadas en transportadores cargados, los aditivos han de ser de igual carga que el analito.

Los aditivos lipofílicos aniónicos más empleados son los derivados del tetrafenilborato de potasio, mientras que los aditivos lipofílicos catiónicos suelen ser sales de tetraalquilamonio, como el bromuro de tetraoctilamonio (**Figura 1.5**). [40,86]

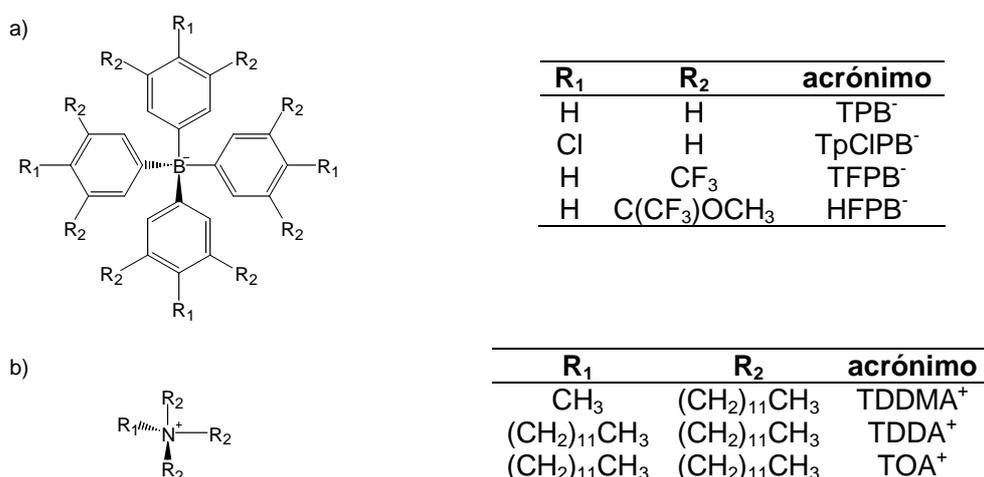


Figura 1.5. Estructura de algunos aditivos aniónicos **a)** y aditivos catiónicos **b)** más comúnmente utilizados en membranas selectivas a iones (en ESIs y en optodos).

1.3.2. Mecanismos de respuesta de los optodos

Como se ha visto hasta ahora, si bien las membranas potenciométricas y los optodos poseen composiciones análogas, el principio de respuesta es muy distinto.

A diferencia de los ESIs, en los que la diferencia de cargas en la interfase genera el potencial de membrana, en los optodos, la respuesta viene determinada por el intercambio de iones entre la disolución y la membrana hasta llegar a un equilibrio. Debido al tiempo requerido para la difusión del analito en el seno de la matriz, el tiempo de respuesta aumenta con el grosor de la membrana. Un factor que condiciona el mecanismo a través del cual se genera la respuesta de la membrana es el mantenimiento del principio de neutralidad en el seno del optodo. Para optodos que incorporan un ionóforo, un cromofluorionóforo y un aditivo iónico, y dependiendo de las cargas de las especies involucradas en los equilibrios de transferencia, se han propuesto dos tipos de mecanismos de respuesta distintos: [40]

- a) el intercambio simultáneo de iones (catiónico o aniónico) entre la disolución y la membrana.
- b) la coextracción simultánea de aniones y cationes desde la disolución a la membrana.

Ambos mecanismos contemplan las posibles cargas de todos los componentes del optodo, así como la extracción de cationes y aniones por parte de los ionóforos para formar complejos de cualquier estequiometría.

Teniendo en cuenta los equilibrios que estos mecanismos implican, pueden derivarse expresiones matemáticas que permiten describir la respuesta de los optodos. Estas expresiones se basan en una serie de premisas: [87]

- la membrana está en contacto por un lado con la disolución y por el otro con un soporte sólido, que es inerte e impermeable.
- los optodos son sistemas reversibles y cuando se alcanza el equilibrio no existen gradientes de concentración. Además, el analito en la membrana está completamente complejado por el ionóforo y no hay pérdidas de los componentes de la membrana hacia la disolución.
- los componentes de la membrana no agregan y la estequiometría de los complejos formados no varía.
- no se tienen en consideración las posibles impurezas presentes en la membrana a la hora de plantear los equilibrios posibles.
- el espesor de la interfase membrana-disolución es pequeño comparado con el grosor de la membrana.

- la composición de la membrana es constante a lo largo de todo el intervalo de medida, por lo que los coeficientes de actividad se aproximan a la unidad o son constantes.
- la concentración de los componentes activos de la membrana es baja (se expresa como mmol/kg).

A continuación, se detalla el desarrollo matemático para llegar a la expresión que permite relacionar la señal obtenida con la concentración de analito en los dos tipos de optodos que han sido desarrollados en el presente trabajo. Uno sigue un mecanismo de intercambio catiónico y el otro de coextracción iónica. El resto de sistemas posibles pueden describirse por analogía.

1.3.2.1. Mecanismo de intercambio catiónico

El modelo de intercambio catiónico más descrito permite explicar el comportamiento de un optodo que consta de: un ionóforo neutro (I) selectivo a un ión de carga positiva z (M^{z+}); de un cromo(fluro)ionóforo catiónico de protón (CH^+) y de un aditivo aniónico lipofílico (R^-). El analito M^{z+} es extraído selectivamente por el ionóforo de la fase acuosa a la membrana, formando el complejo (MI^{z+}) y provocando la salida de un protón del cromo(fluro)ionóforo [CH^+] para mantener la electroneutralidad de la membrana. [40,87] Como indicador de pH, el cromo(fluro)ionóforo protonado [CH^+] tiene propiedades ópticas diferentes a la forma desprotonada (C), lo cual es detectado como respuesta al analito (**Figura 1.6**).

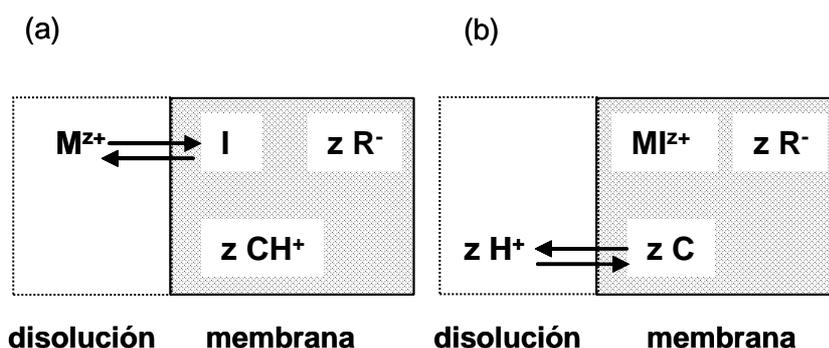


Figura 1.6. Esquema de una membrana de intercambio catiónico. M^{z+} es el analito, I el ionóforo, CH^+ el cromo(fluro)ionóforo protonado y R^- el aditivo lipofílico aniónico, formando todos ellos complejos de estequiometría 1:1.

Al cumplirse la electroneutralidad en la fase orgánica podemos escribir el balance de cargas como:

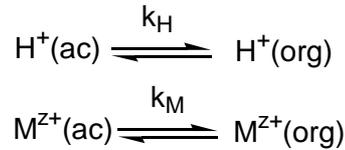
$$[CH^+] + z [MI^{z+}] = R_T \quad (7)$$

donde R_T es la concentración total de aditivo aniónico lipofílico R^- en la membrana. Además, si se asume un proceso ideal de equilibrio (en el que no existen equilibrios de agregación, ni en la membrana (org) ni en la fase acuosa (ac)), el equilibrio total de intercambio iónico entre muestra y membrana se puede escribir como:



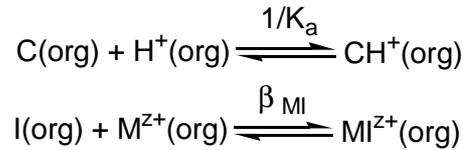
Este equilibrio heterogéneo puede separarse en varias etapas:

a) Equilibrio de partición de los iones entre la fase acuosa y la membrana:



donde k_H y k_M son los coeficientes de partición del protón y del analito, respectivamente.

b) Equilibrio ácido/base del cromo(fluro)ionóforo y equilibrio de formación del complejo analito-ionóforo:



donde K_a es la constante de acidez del cromo(fluro)ionóforo CH^+ en la membrana y β_{MI} es la constante de formación del complejo analito-ionóforo en la membrana.

Asumiendo que los coeficientes de actividad en la membrana son constantes o se aproximan a la unidad para todas las especies cargadas, la constante de extracción del equilibrio global (K_{ex}) se puede expresar como:

$$K_{ex} = \frac{(a_H)^z [C]^z [MI^{z+}]}{a_M [I] [CH^+]^z} = \left(\frac{K_a}{k_H} \right)^z k_M \beta_{MI} \quad (8)$$

Si se define α como la relación de concentraciones entre la especie desprotonada de cromo(fluro)ionóforo (C) respecto a la concentración total C_T y α' como la relación entre la del ionóforo no complejado respecto a la concentración total de ionóforo I_T , entonces:

$$[C] = \alpha C_T \quad ; \quad [CH^+] = (1 - \alpha) C_T \quad (9)$$

$$[I] = \alpha' I_T \quad ; \quad [MI^{z+}] = (1 - \alpha') I_T \quad (10)$$

Finalmente, combinando las ecuaciones (7-10), se obtiene la siguiente función sigmoideal de respuesta de un optodo que sigue un mecanismo de intercambio catiónico:

$$K_{\text{ex}} \frac{a_M}{(a_H)^z} = \frac{\alpha^z [1/z \{R_T - (1-\alpha)C_T\}]}{(1-\alpha)^z [I_T - 1/z \{R_T - (1-\alpha)C_T\}]} \quad (11)$$

donde se observa que ésta depende de la relación de actividades entre el protón y el analito M^{z+} .

La ecuación (11) se puede simplificar para casos concretos, por ejemplo, cuando la concentración de aditivo iónico y cromo(fluro)ionóforo son iguales ($C_T=R_T$). En estas condiciones se obtiene que:

$$K_{\text{ex}} \frac{a_M}{(a_H)^z} = \frac{\alpha^{z+1}}{z(1-\alpha)^z \left[\frac{I_T}{C_T} - \frac{\alpha}{z} \right]} \quad (12)$$

Además, y dado que en general las membranas incorporan un exceso de ionóforo, se puede considerar que $I_T/C_T \gg \alpha/z$. Englobando todos los términos constantes en una nueva constante K , la ecuación queda entonces reducida a:

$$\frac{a_M}{(a_H)^z} = K \frac{\alpha^{z+1}}{(1-\alpha)^z} \quad (13)$$

El término α se puede relacionar con la señal del optodo teniendo en cuenta que la magnitud medida es la absorbancia del cromo(fluro)ionóforo a una determinada longitud de onda (A):

$$\alpha = (A_{\text{CH}^+} - A) / (A_{\text{CH}^+} - A_C) \quad (14)$$

donde A_{CH^+} es la absorbancia cuando $\alpha=0$ (cromo(fluro)ionóforo totalmente protonado) y A_C es la absorbancia cuando $\alpha=1$ (cromo(fluro)ionóforo totalmente desprotonado).

La ecuación obtenida (13) también se puede utilizar para un sistema que contenga un único cromo(fluro)ionóforo selectivo a cationes en la membrana. En este caso $\beta_{MI} = 1$ y $[MI^{z+}] = 0$.

A su vez, la absorbancia puede relacionarse con la concentración de analito mediante la ley de Lambert-Beer (ecuación 1), por lo que las curvas de calibración se expresan representando la absorbancia en función de la concentración o de la actividad.

En el caso de tratarse de un optodo basado en medidas de fluorescencia, se pueden obtener relaciones análogas a éstas, considerando la ecuación (2), que relaciona la intensidad de fluorescencia emitida con la concentración.

1.3.2.2. Mecanismo de co-extracción

El mecanismo de co-extracción que se describe a continuación describe el funcionamiento de un optodo que contiene un ionóforo neutro (I) y un cromo(fluro)ionóforo desprotonado (C). El primero reconoce selectivamente al analito, un anión X^{z-} , extrayéndolo de la fase acuosa a la membrana, a la vez que el cromo(fluro)ionóforo extrae, de igual forma, un protón (**Figura 1.7**). Así, la electroneutralidad se mantiene en la fase membrana.

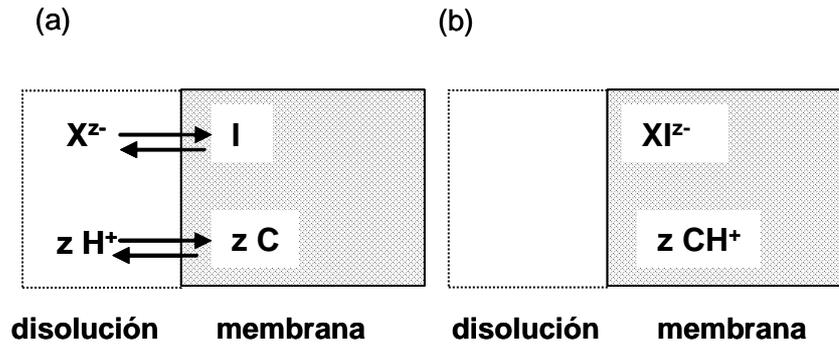
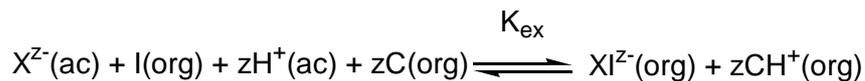


Figura 1.7. Esquema de una membrana basada en el mecanismo de co-extracción. X^{z-} es el analito, I el ionóforo neutro y C el cromo(fluro)ionóforo neutro.

Análogamente al caso anterior (ver apartado § 1.3.2.1), al cumplirse la electroneutralidad en la fase membrana, el balance de cargas es:

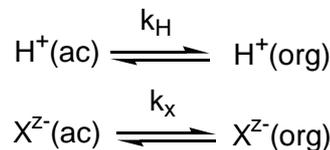
$$[XI^{z-}] = z [CH^+] \quad (15)$$

El equilibrio total de co-extracción entre la disolución (ac) y la membrana (org) se describe como:

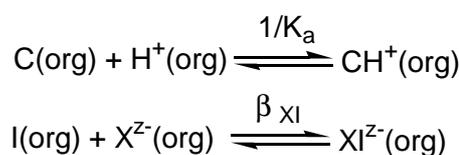


que puede separarse en:

- a) Equilibrio de partición de los iones entre la fase acuosa y la membrana donde k_H y k_x son los coeficientes de partición del protón y del analito, respectivamente.



- b) Equilibrio ácido/base del cromo(fluro)ionóforo y de formación del complejo analito-ionóforo



donde K_a es la constante de acidez del cromo(fluro)ionóforo CH^+ y β_{MI} es la constante de formación del complejo XI^{z-} , ambas en la membrana.

Si los coeficientes de actividad en la membrana son constantes o se aproximan a la unidad para todas las especies cargadas, la constante de co-extracción del equilibrio global (K_{ex}) se puede expresar como:

$$K_{ex} = \frac{[CH^+]^z [XI^{z-}]}{(a_{H^+})^z a_{X^{z-}} [C]^z [I]} = \left(\frac{k_H}{K_a} \right)^z \beta_{XI} k_X \quad (16)$$

Expresando las formas no complejada del ionóforo (I) y del cromo(fluro)ionóforo (C) respecto a las cantidades totales I_T y C_T en función de α y α' respectivamente:

$$[C] = \alpha C_T \quad ; \quad [CH^+] = (1 - \alpha) C_T \quad (17)$$

$$[I] = \alpha' I_T \quad ; \quad [XI^{z-}] = (1 - \alpha') I_T \quad (18)$$

y combinando las ecuaciones (15-18), se obtiene una función sigmoideal de respuesta del optodo que sigue un mecanismo de co-extracción. Esta ecuación se puede simplificar si se cumplen algunas condiciones, como que la concentración total de ionóforo equivalga a la concentración total de cromo(fluro)ionóforo ($I_T = C_T$) y que exista un exceso de ionóforo I_T respecto al cromo(fluro)ionóforo C_T . Entonces se cumple que $I_T/C_T \gg 1/z$, por lo que finalmente, englobando los términos constantes en una nueva constante K , la función sigmoideal de respuesta es:

$$(a_H)^z a_{X^{z-}} = K \frac{(1 - \alpha)^{z+1}}{\alpha^z} \quad (19)$$

Según la ecuación (19), un optodo que sigue el mecanismo de co-extracción responde al producto de las actividades de los iones involucrados en éste.

Los sistemas basados en un solo cromo(fluro)ionóforo también se describen por la misma ecuación (19). Considerando que $\beta_{XI}=1$ y que $[I] \text{ (org)}=0$, esta ecuación se transforma en la ecuación (20), a través de la cual es posible calcular aproximadamente las constantes de acidez de indicadores en la fase orgánica (K_{aMEM}):

$$a_{H^+} = \frac{1}{K_{aMEM}} \frac{(1 - \alpha)^{z+1}}{\alpha^z} \quad (20)$$

Si el cromo(fluro)ionóforo utilizado no fuera neutro, sino cargado negativamente, y se emplearan ionóforos cargados positivamente, se obtendrían expresiones similares.

Igual que en los equilibrios de intercambio iónico, α se relaciona con la señal medida, y ésta, a su vez, con la concentración de cromo(fluro)ionóforo analito.

1.4. LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS NIR SELECTIVOS A PROTÓN

La variación en las propiedades ópticas de la mayoría de cromo(fluoro)ionóforos comercialmente disponibles se verifica, tradicionalmente, en la zona visible del espectro electromagnético. La instrumentación analítica convencional basada en la explotación de esta región electromagnética es, en algunos casos, incompatible con el concepto de sensor basado en componentes ópticos miniaturizados. Un ejemplo de ello es el uso de láseres de diodo como fuentes de luz (ver apartado § 1.2.2.1). Una solución a este problema es la obtención de cromo(fluoro)ionóforos con absorciones significativas a las longitudes de onda de emisión de éstos láseres de diodo. Por otro lado, la zona del visible lejano e infrarrojo cercano (entre 670 y 1800 nm) presenta una serie de ventajas en el ámbito de la química analítica. Por un lado, la absorción de la matriz es prácticamente nula en la mayoría de las aplicaciones, ya que existen escasos compuestos que presenten absorción o fluorescencia en esta zona del espectro electromagnético. Por otro, los cromo(fluoro)ionóforos sensibles a estas longitudes de onda suelen exhibir altos coeficientes de absorción molar. Así, los cromo(fluoro)ionóforos absorbentes en la zona NIR han sido utilizados en química analítica y bioanalítica como sondas y marcadores, con múltiples aplicaciones, incluyendo secuenciación del ADN, inmunoensayos, etc. [88,89]

La escasa disponibilidad de indicadores comerciales que absorban en las longitudes de onda de emisión de los láseres de diodo ha generado la necesidad de sintetizar nuevos compuestos. [4] Además, hasta el momento, la mayor parte de ellos son solubles en agua y por lo tanto, insolubles en los disolventes orgánicos generalmente utilizados como plastificantes en optodos.

Así pues, las características más relevantes que los nuevos colorantes deben presentar como posibles cromo(fluoro)ionóforos son:

- han de ser lipofílicos, para ser solubles en el solvente mediador, ser estables en la membrana y no exudar.
- su K_a ha de ser del mismo orden que la constante de estabilidad del complejo ionóforo/analito.
- han de presentar un alto coeficiente de absorción molar (si se mide absorbancia) o bien un alto rendimiento cuántico (si se mide fluorescencia), para obtener una alta sensibilidad de la respuesta.
- la longitud de onda de absorción máxima ha de ser lo más cercana a la longitud de onda de emisión de fuentes miniaturizadas comerciales como LEDs y diodos láser.

1.4.1. Colorantes con absorciones en la zona del visible lejano y NIR

Los colorantes con absorciones intensas ($\log \epsilon > 4.5$) en la zona del visible lejano e infrarrojo cercano son compuestos orgánicos, generalmente solubles en agua (a diferencia de los denominados pigmentos, que son especies normalmente insolubles y cuyas propiedades físicas permanecen inalteradas al dar color), que incluyen en su estructura sistemas conjugados. Cuanto más deslocalizados son estos sistemas conjugados, absorben a longitudes de onda más largas. Así, las absorciones en la zona NIR son consecuencia de transiciones $\pi-\pi^*$, que en algunos casos conllevan un cierto carácter de transferencia de carga en la molécula. En cambio, si las transiciones que tienen lugar son sólo en parte debidas al sistema electrónico π (como por ejemplo en transiciones $\pi-\sigma^*$, $n-\pi^*$ o $\sigma-\pi^*$), entonces las absorciones en la zona NIR resultantes son de baja intensidad ($\log \epsilon \sim 2$).

Los conocimientos empíricos y las aproximaciones semiempíricas de la química cuántica (métodos π : HMO o PPP) permiten el diseño de colorantes con absorciones a longitudes de onda determinadas dentro de la región del visible lejano y el NIR. Es decir, las relaciones entre el color y la estructura de los colorantes son cada vez más conocidas (sobre todo para estructuras cerradas).

Los colorantes vis lejano-NIR más empleados (por ejemplo, en aplicaciones médicas, en almacenamiento óptico de datos, en fotografía infrarroja o en filtros láser) se pueden clasificar, según su estructura química, en: [90] ftalocianinas y naftalocianinas, colorantes de complejo metálico, colorantes polimetínicos, difenilmetanos y trifenilmetanos, quinonas, y colorantes azo (**Figura 1.8**). [93]

En este trabajo nos centraremos en el estudio y aplicación en optodos de un tipo de colorantes polimetínicos, denominados cianinas. A pesar de que la mayoría de estos compuestos no son apropiados para ser empleados en disolventes apolares, la presencia de carga en algunas moléculas ha permitido su disolución en membranas poliméricas para medidas de pH. La elección de estos compuestos está motivada tanto por la facilidad para modular la longitud de onda de absorción mediante pequeñas variaciones en su estructura, como por sus altos coeficientes de absorción molar.

Los colorantes polimetínicos se caracterizan por la presencia de un sistema cromofórico formado por una cadena de grupos metínicos enlazada a dos grupos terminales, que pueden ser cíclicos (carbocíclicos o heterocíclicos) o acíclicos. Los dobles enlaces de la cadena son resonantes, presentan una alternación de cargas, siendo así de igual longitud y, en su forma más estable, son de geometría *trans*.

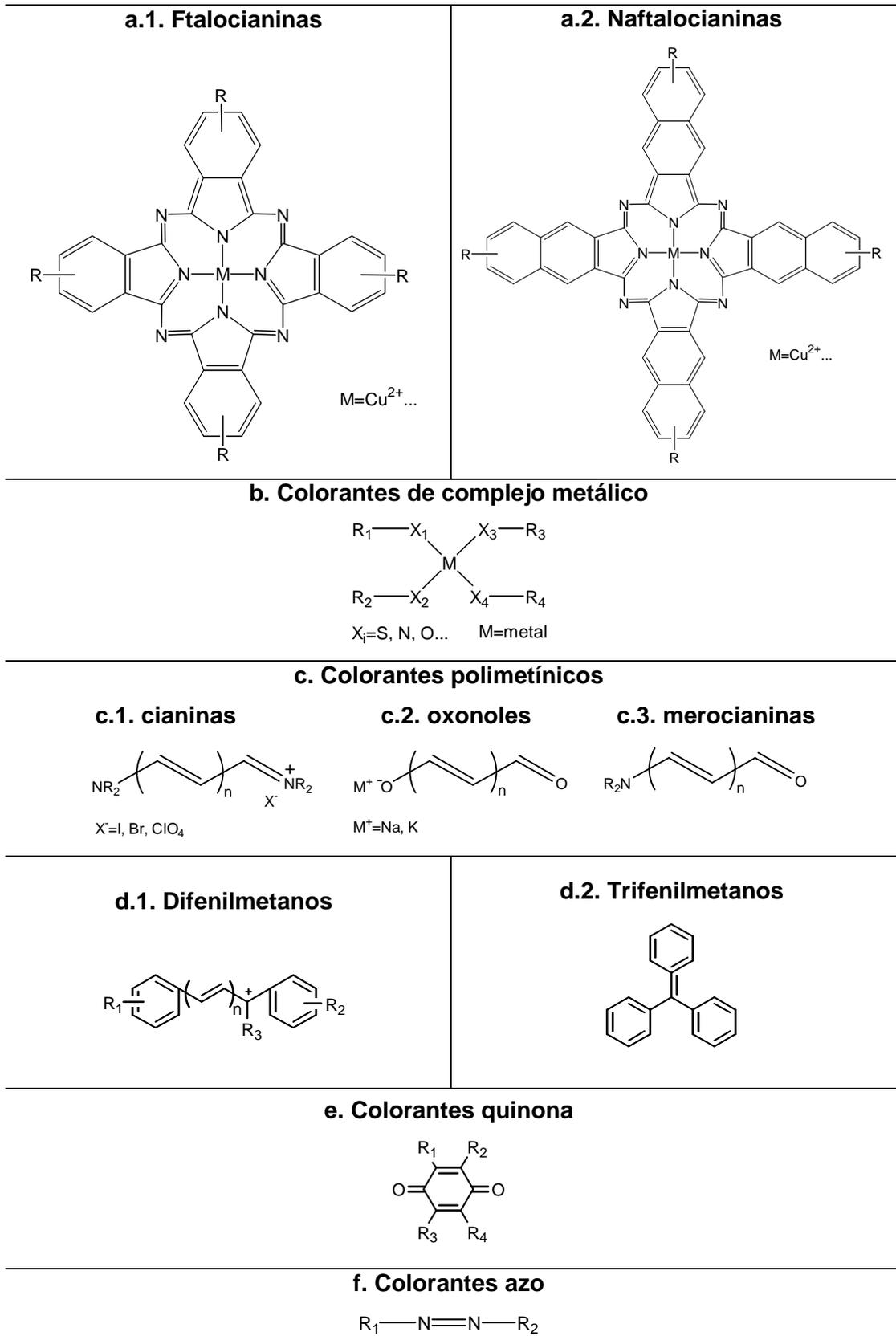


Figura 1.8. Estructura básica de los distintos tipos de colorantes Vis lejano-NIR más usados, donde R son grupos alquilo.

Este tipo de compuestos exhiben bandas de absorción estrechas e intensas y cubren una amplia región de longitudes de onda, ya que cuantos más grupos vinílicos, mayor es la longitud de onda de absorción. La mayoría de compuestos que se reportan son trimetínicos ($n=1$) o pentametínicos ($n=2$), aunque también existen colorantes con cadenas más largas, y menos estables. Según el sistema cromofórico, se clasifican en cianinas y hemicianinas (cargadas positivamente); colorantes oxonol (cargados negativamente) y merocianinas (o neutrocianinas, sin carga) (**Figura 1.8c**).

1.4.2. Los colorantes cianina

El primer colorante tipo cianina fue descubierto por G. Williams en 1856 (año en el que W. H. Perkin descubrió la mauveína, el primer colorante sintético comercial). Al calentar quinolina (que contenía lepidina) con ioduro de isoamil y sosa cáustica, obtuvo un colorante azul al que llamó *cianina*. Más tarde se supo que se trataba de la siguiente estructura: (**Figura 1.9**)

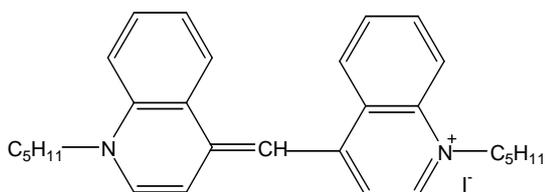


Figura 1.9. Estructura química del primer colorante cianina descubierto en 1856 por G. Williams.

En 1875 se descubrieron las propiedades de este tipo de compuestos como sensibilizadores ópticos de los haluros de plata, en el campo de la fotografía. En 1905 König descubrió el colorante azul *Pinacianol*, y fue el primer sensibilizador de la luz roja. A partir de ese momento, las cianinas despertaron gran interés y fueron ampliamente estudiadas. [91] En los últimos años, y debido a su gran versatilidad, sus usos se han extendido a otros campos. Su intervalo de absorción es fácilmente predecible, muchas presentan fluorescencia y sus propiedades ópticas no lineales son prometedoras. Algunas de sus aplicaciones incluyen la serigrafía, la fotoreprografía, la grabación óptica, la medicina (como fotosensibilizadores en tratamiento de tumores), la cosmética, los polímeros, como marcadores fluorescentes, como *dye lasers* (colorantes láser) e incluso como conversores fotoeléctricos para la producción de energía solar.

1.4.2.1. Estructura química y características ópticas de las cianinas

Las cianinas están basadas en dos átomos de nitrógeno, uno de ellos cargado positivamente, enlazados a través de una cadena conjugada formada por un número impar de átomos de carbono. En su estructura química pueden distinguirse dos partes:

- el *sistema cromofórico* (cadena polimetínica) constituido por el sistema ión-amidinio (**Figura 1.10**).
- los *grupos amino terminales* (o grupos auxocromo) que pueden formar parte de heterociclos y estar o no sustituidos.

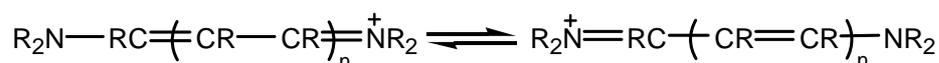


Figura 1.10. Estructura de las formas resonantes del sistema ión-amidinio.

La cadena polimetínica es el factor estructural más importante en los colorantes orgánicos, [92,93] ya que determina en gran medida las características ópticas del colorante; sus sustituyentes y los grupos terminales (tanto por el carácter electrodonador de los heterociclos, como por su sustitución) pueden no obstante, también modularlas.

Según la disposición de los grupos terminales, las cianinas pueden dividirse en simétricas o asimétricas.

En general, las cianinas (tanto las simétricas como las asimétricas) son moléculas débilmente fluorescentes y exhiben espectros de fluorescencia relativamente estrechos y estructurados, acompañados de un desplazamiento de Stokes pequeño. [94,95] La disposición molecular (es decir, el diseño del sistema π donador-aceptor) y las propiedades fotofísicas resultantes poseen un gran potencial para el diseño de fluorocromóforos. [96] La introducción de un receptor específico a un ión en la posición aceptora o donadora de la molécula, puede dar lugar a marcadores fluorescentes que presenten desplazamientos espectrales al enlazarse con el analito. Los efectos son mayores si los receptores forman parte del sistema cromofórico y participan de las transiciones ópticas. Hasta el momento, la mayoría de marcadores son específicos a cationes debido a centros receptores del tipo mono y poliazas éteres corona. [97]

La cadena polimetínica y sus sustituyentes

Se han usado modelos teóricos para predecir la longitud de onda de los máximos de absorción de los colorantes. [98] En cianinas simétricas se cumple que cada grupo vinílico implica un desplazamiento batocrómico en la longitud de onda de 100 nm (a excepción de los primeros miembros de la serie). [99] Además, generalmente, al aumentar la longitud de

onda de absorción, el coeficiente de absorción molar es mayor. En cambio, en los colorantes asimétricos, el valor de la longitud de onda de máxima absorción es aproximadamente igual a la media de las longitudes de onda de los correspondientes colorantes simétricos. [100] Por otro lado, cuanto más difieren en basicidad los heterociclos y más larga es la cadena polimetínica, menor es la longitud de onda respecto a la esperada.

A la vez, cuanto más larga es la longitud de la cadena polimetínica, más inestable es el colorante. [101] Una posibilidad para estabilizar estructuras con cinco o más átomos es la incorporación de dos o más grupos vinílicos en un anillo, que constituye el grupo central. La presencia de anillos centrales provoca un ensanchamiento de bandas y un efecto batocrómico respecto a los colorantes con hidrógenos en la cadena polimetínica. En ocasiones también se ha observado una disminución del rendimiento cuántico. Si el grupo central es un ciclopentano, el colorante absorbe a longitudes de onda mayores que si es un ciclohexano.

La longitud de la cadena polimetínica también condiciona la forma de las bandas de absorción, debido a la influencia competitiva de las interacciones vibrónicas (interacciones electrón-vibración nuclear) y las intermoleculares que tienen lugar. Las primeras son más débiles al aumentar n (**Figura 1.10**) y provocan un estrechamiento de las bandas y un aumento en asimetría y estructura (número de picos). En cambio, las fuerzas intermoleculares son más fuertes cuando la cadena es más larga, lo que se traduce en un ensanchamiento de bandas.

Las propiedades espectrales luminiscentes también varían en función de la longitud de la cadena polimetínica. En el caso de varias cianinas simétricas, su desplazamiento de Stokes disminuye al elongarse la cadena, debido a la debilitación de las interacciones vibrónicas. Al mismo tiempo, el rendimiento cuántico aumenta hasta una cierta longitud de cadena en que el rendimiento cuántico disminuye. Cuanto mayor es la longitud efectiva de los heterociclos, antes sucede esta disminución (para n menores). La atenuación de fluorescencia va asociada al incremento de conversión interna que tiene lugar al alargarse la cadena. Contrariamente a lo que sucede con los espectros de absorción, cuando n aumenta, las fuerzas predominantes son las interacciones vibrónicas (y no las intermoleculares). Son éstas las que causarán modificaciones en la forma de las bandas luminiscentes (independientemente de la naturaleza electrodonadora de los heterociclos o del solvente).

Los sustituyentes de la cadena polimetínica provocan variaciones menores en la posición del máximo de absorción y de fluorescencia. Las variaciones que producen dependen de la naturaleza electrodonadora del sustituyente, de su posición en la cadena y

de factores estéricos que interfieran en la coplanaridad de la molécula. [102-104] Así, la sustitución de hidrógenos en posiciones pares de la cadena por grupos electrodonadores (considerando como posición cero, la del heteroátomo), genera desplazamientos batocrómicos (a longitudes de onda mayores), mientras que en posiciones impares, provoca desplazamientos hipsocrómicos (hacia longitudes de onda menores). Análogamente, los sustituyentes electroaceptores causan desplazamientos batocrómicos en posiciones impares e hipsocrómicos en posiciones pares. [102]

Los grupos terminales

La introducción de grupos acíclicos o arílicos en las posiciones amino terminales provoca un desplazamiento batocrómico de la longitud de onda del máximo de absorción, que aumenta con la capacidad electrodonadora del sustituyente.

Cuando el grupo terminal es un heterociclo, la longitud de onda de absorción en cianinas simétricas aumenta con la basicidad (siguiente serie): pirrolina, tiazolina, benzoxazol, benzimidazol, tiazol, 3-H-indol, benzotiazol, 2-piridina, 4-piridina y 2-quinolina. [99,105,106] Para cianinas asimétricas, cuanto más difieran en basicidad los grupos terminales, mayor será la diferencia entre longitud de onda esperada y observada.

Los grupos heterocíclicos terminales pueden, a su vez, estar sustituidos, tanto en los anillos, como en el nitrógeno. En general, la longitud de onda de absorción aumenta siempre con la sustitución en los anillos. [107] Heterociclos que constan de más anillos, todavía presentan longitudes de onda mayores.

Por último, aunque el efecto de la sustitución en el nitrógeno sobre la longitud de onda de absorción es despreciable, éste sí influye en la solubilidad y agregación de las cianinas (apartado § 1.4.2.3).

1.4.2.2. Equilibrios ácido-base

Las cianinas son ácidos débiles cuyas formas ácida y básica presentan propiedades ópticas distintas, y por tanto, son indicadores ácido-base. Como tales, presentan un equilibrio ácido-base regido por una constante de acidez. Este valor determinará en gran medida el intervalo de trabajo de un optodo selectivo de iones o de pH.

Uno de los factores determinantes en el valor de pK_a es el carácter electrodonador de los sustituyentes de los grupos terminales, aunque éstos no participan directamente del equilibrio ácido-base. [108] En general, los sustituyentes electroaceptores provocan un aumento en la acidez, mientras que los electrodonadores la disminuyen. La magnitud de este efecto se correlaciona, en muchos casos, con los valores de sigma (σ) de Hammett:

$$pK_a^0 - pK_a = \rho \cdot \sigma \quad (20)$$

donde ρ y σ son las constantes de sustitución de Hammett y pK_a^0 y pK_a , corresponden a la acidez de la cianina sin y con sustituyente, respectivamente. La relación de Hammett se denomina relación lineal de energía libre, pues se basa en la existencia de una relación lineal entre el cambio de la energía libre y el efecto que ejerce un sustituyente. Así, se puede justificar y pronosticar, por ejemplo, la acidez relativa de un conjunto de ácidos, y la podemos correlacionar cuantitativamente con la acidez relativa de otro conjunto, o incluso con la velocidad relativa de un conjunto de reacciones. Son estas relaciones las que se asumen en la ecuación de Hammett, la cual es válida para numerosos conjuntos de reacciones.

Finalmente, cambios estructurales que alteran la planaridad del colorante o bien la existencia de interacciones entre moléculas de colorante que dan lugar a agregados, pueden afectar al cálculo del pK_a mediante medidas espectroscópicas y provocar desviaciones respecto el valor real. [109]

1.4.2.3. Agregación

La agregación consiste en la formación de dímeros o asociaciones moleculares de orden superior (polímeros), que son consecuencia de interacciones de Van der Waals entre moléculas de colorante. En las cianinas, este fenómeno sucede en disoluciones acuosas y no acuosas en las que la solubilidad es limitada. La tendencia a la agregación, no solo depende del medio (polaridad del disolvente, concentración, pH, fuerza iónica, temperatura, etc.), sino también de la estructura del colorante. [110]

Los agregados absorben a longitudes de onda distintas, por lo que la aparición de agregados se verifica en su espectro de absorción. Su formación provoca la aparición de nuevas bandas, a la vez que la de mayor intensidad, que corresponde al monómero (banda M), disminuye. [111,112]

Las bandas que aparecen a longitudes de onda inferiores al monómero se llaman bandas D (de *dímero*) y bandas H (de *efecto hipsocrómico*). Las bandas que aparecen a longitudes de onda mayores, se denominan bandas J (de Jelly, E. E., pionero en la investigación de este tipo de bandas). Las bandas H y J corresponden a estados de agregación superiores que las D (dímero), y a veces van acompañadas de precipitación de colorante en la disolución.

1.4.2.4. Efecto del disolvente: solvatocromismo

Cuando un colorante está disuelto en un medio, existen interacciones moleculares entre ambos, que pueden afectar tanto al espectro de absorción como al de fluorescencia de los cromo(fluro)óforos. La posición, la intensidad y la forma de las bandas pueden cambiar, así como el rendimiento cuántico o el desplazamiento de Stokes. [111] Sin embargo, generalmente estos efectos son reducidos en las cianinas, especialmente en las simétricas. Solo las merocianinas son más sensibles al disolvente. [113,114] Por ejemplo, en las cetocianinas (un tipo de merocianinas con un grupo ciclopentanona central) el máximo de fluorescencia se desplaza hacia longitudes de onda mayores, y su rendimiento cuántico aumenta, cuanto más polar es el disolvente. [115,118]

Los efectos del disolvente son más pronunciados cuanto más polar es éste, (p.e. un disolvente con dipolos permanentes), y más polares son las cianinas que se disuelven en él. En este caso, el disolvente, al ordenarse alrededor del colorante, produce una estabilización del estado fundamental de la molécula minimizando la energía del sistema. De esta forma, cuando la cianina absorbe radiación pasa rápidamente (aprox. en 10^{-15} s) al estado excitado sin que el disolvente tenga tiempo de reestructurarse (estado de Franck-Condon). Si el estado excitado es más apolar que el fundamental, o tiene una distribución de cargas distinta, la ordenación del disolvente no será la adecuada para estabilizar el estado excitado. El disolvente, entonces, disminuye más la energía del estado fundamental que la del estado excitado, produciendo así un efecto hipsocrómico (solvatocromismo negativo).

En cambio, cuando la molécula es más apolar en su estado fundamental que en su estado excitado, el disolvente polar estabiliza más el estado excitado y produce un efecto batocrómico (solvatocromismo positivo). [103] Algunos colorantes pueden incluso variar su comportamiento solvatocrómico a un valor determinado de polaridad (solvatocromismo inverso).

Como medidas orientativas de la polaridad de un disolvente se han empleado el momento dipolar, la constante dieléctrica o el índice de refracción. Sin embargo, uno de los parámetros empíricos que más se ha empleado es la energía de transición de un colorante ET^N en $Kcal\ mol^{-1}$ que permite relacionar los desplazamientos observados en las bandas de absorción de los colorantes con una gran sensibilidad en función de la polaridad del disolvente.

1.4.2.5. Fotoestabilidad

Las cianinas, como la mayoría de colorantes polimetínicos, tienden a fotodegradarse al combinarse la acción de la luz con la presencia de compuestos con propiedades redox,

como pueden ser el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), los peróxidos o los superóxidos. El proceso que tiene lugar es una fotooxidación, posterior a la absorción de radiación por parte del colorante. En la mayoría de ocasiones, desde un estado triplete excitado del colorante (que tiene un mayor tiempo de vida que el singlete) se produce una relajación energética hasta el estado fundamental del oxígeno. La fotodescomposición es provocada por una reacción bimolecular. Se trata de una adición 1,2- del oxígeno singlete en un doble enlace carbono-carbono exocíclico (de la cadena polimetínica) que tiene lugar incluso en ausencia luz, aunque su presencia lo acelera. Cuanto más larga es la cadena polimetínica, más rápida es la fotodescomposición y por tanto, más inestable es la molécula. La naturaleza electrodonadora de los sustituyentes de los grupos terminales también influye en el proceso.

La baja fotoestabilidad es una de las mayores desventajas en cuanto a la aplicación de este tipo de colorantes (y de muchos otros), especialmente en el campo de los optodos, donde juega un papel relevante en el tiempo de vida del sensor y es todavía más crítico, si la medida implica una irradiación continua del colorante. Sin embargo, existen diversas estrategias para decelerar la fotodegradación, que comprenden tanto modificaciones en los colorantes, como en el medio. Una de ellas es la introducción de sustituyentes electroaceptores (como halógenos, grupos nitro o ciano) en los heterociclos terminales. Además, hay que tener en cuenta, que según el tipo de heterociclo que incluye la molécula, ésta puede ser más estable química y fotoquímicamente, como sucede en el caso de las cianinas con grupos indol en las posiciones terminales de la cadena polimetínica. [93] Otra posibilidad, como ya se ha apuntado en el apartado § 1.4.2.1, es la inclusión de parte de la cadena polimetínica en un anillo. [102] Un ejemplo de ello son las norescuarocianinas, [119] las norindocrococianinas [120] y las cetocianinas. En las primeras, el anillo central es un tetraciclo, derivado del ácido escuárico; las norindocrococianinas son derivadas del ácido crocónico (ciclopentano) y las cetocianinas tienen un grupo ciclopentanona en la cadena polimetínica.

En relación a modificaciones en el medio, se puede mejorar la fotoestabilidad de las cianinas mediante la adición de compuestos con baja energía de ionización (p.e. complejos de ditiolato de platino, cobalto o níquel) que reaccionan con el oxígeno responsable de la fotodegradación. Estos compuestos pueden introducirse añadiéndolos al medio, enlazándolos al colorante o bien como contraiones del colorante. Son las denominadas trampas de oxígeno (*oxygen trap*). [121,122] Otros aditivos que pueden actuar capturando radicales que se generan durante el proceso de fotooxidación son los derivados de 2,2,6,6-tetrametilpiperidina, los denominados HALS (*Hindered Amine Light Stabilizers*).

También existen trabajos en los que se demuestra la mejora de la fotoestabilidad de colorantes cianinas disueltos en membranas de PVC plastificado mediante la adición de estabilizadores UV. [123] Entre éstos, figuran los absorbentes de luz UV, comúnmente empleados en la industria de los polímeros (Ciba® Chimassorb®, Tinuvin®). Son compuestos derivados de benzofenonas y benzotriazoles, que exhiben una alta absorción de radiación entre 295 y 400 nm y una absorción nula en la región del visible (por encima de 400 nm). Estos compuestos presentan, al ser irradiados, una transferencia de un protón, lo que lleva a un estado mesomérico excitado que relaja al estado fundamental mediante una transición no radiante. El mecanismo de protección de los absorbentes UV se ilustra en la **Figura 1.11**. No obstante, su uso en optodos está limitado debido a que deben emplearse en una gran proporción respecto a otros componentes de la membrana, alterando así sus propiedades físico-químicas.

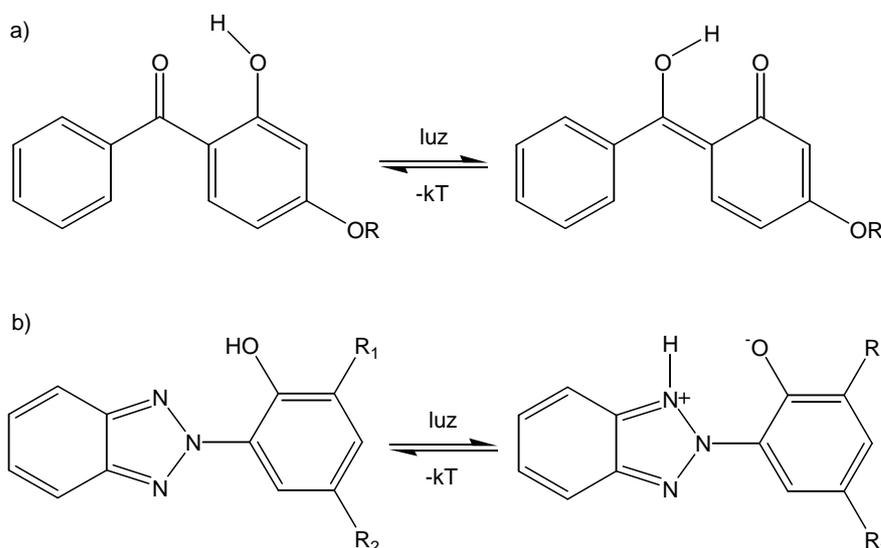


Figura 1.11. Equilibrios mesoméricos de absorbentes UV cuando reciben luz. **a)** Basados en benzofenonas y en **b)** benzotriazoles. R, R₁, R₂=alquilo.

Por otro lado, algunos estudios demuestran que la inclusión de cianinas en la cavidad de ciclodextrinas mejora la fotoestabilidad de los colorantes. [111,124,125] Las ciclodextrinas son unidades de glucopiranosas enlazadas entre sí mediante enlaces α (1-4). Cuantas más unidades, mayor es el diámetro de la cavidad donde pueden encajarse otras moléculas, formando compuestos de inclusión estables. [126] Para el caso de las cianinas, la formación del complejo entre la cadena polimetínica y la ciclodextrina dificulta, en muchos casos y por impedimentos estéricos, la transferencia de carga entre el colorante y el oxígeno singlete responsable de la fotodegradación; asimismo, se ha observado una disminución en la formación del oxígeno singlete excitado, aumentando la fotoestabilidad del colorante.

Por último, una alternativa para aumentar el tiempo de vida de un optodo que contiene un cromo(fluro)ionóforo de fotoestabilidad limitada, es disminuir el tiempo de exposición del colorante a la radiación mediante el uso de fuentes de luz pulsadas, en vez de continuas, o la realización de medidas puntuales en vez de continuas.

1.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alegret, S. *Industria farmacéutica*, 1990, 11/12, 33-43.
- [2] Pérez, C. *Sensores Ópticos*. Valencia: Universitat de València, 1996, p. 21-38.
- [3] Nylander, C. "Chemical and biological sensors". *Journal of Physics E: Scientific Instruments*, 1985, 18 (9), 736-750.
- [4] Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 1998.
- [5] Göpel, W.; Hesse, J.; Zemel, J. N. (eds.). *Chemical and Biochemical Sensors: Part I*. En: Göpel, W.; Jones, T. A.; Kleitz, M.; Lundström, I.; Seiyama, T. (eds.). *Sensors. A comprehensive survey*. Vol. 2. Weinheim: Wiley-VCH, 1991.
- [6] Göpel, W.; Jones, T. A.; Kleitz, M.; Lundström, I.; Seiyama, T. (eds.). *Chemical and Biochemical Sensors: Part II*. En: Göpel, W.; Hesse, J.; Zemel, J. N. (eds.). *Sensors. A comprehensive survey*. Vol. 3. Weinheim: Wiley-VCH, 1991.
- [7] Wolfbeis, O. S. *Fiber optic chemical sensors and biosensors*. Graz: CRC Press, 1991, p. 1-23.
- [8] Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. "Chemical sensors definitions and classification". *Pure and Applied Chemistry*, 1991, 63, 1247-1250.
- [9] Fernández-Sánchez, J. F.; Cannas, R.; Spichiger, S.; Steiger, R.; Spichiger-Keller, U. E. "Optical CO₂-sensing layers for clinical application based on pH-sensitive indicators incorporated into nanoscopic metal-oxide supports". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2007, B128, 145-153.
- [10] Sahney, R.; Puri, B. K.; Srivastava, R. C. "A conductometric cholesterol sensor based on the permeability effect on BLM and its application in clinical analysis". *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2006, 1(6), 566-572.
- [11] Lifescan, Inc. [en línea]. *Lifescan, Inc – OneTouch Blood Glucose Meters for people with diabetes*. (1996-2008). <<http://www.lifescan.com>> [Consulta: 27 enero 2010].
- [12] Wolfbeis, O. S.; Boisdé, G. *Applications of Optochemical Sensors for Measuring Chemical Quantities*. En: Göpel W.; Hesse J.; Zemel J. N. (eds.). *Sensors: A Comprehensive Survey*. Vol. 3, Weinheim: VCH, 1991.
- [13] Freitag R. (ed.). *Biosensors in analytical biotechnology*. Texas: Landes Press, 1996.
- [14] Rogers, K. R.; Poziomek, E. J. "Fiber optic sensors for environmental monitoring". *Chemosphere*, 33 (6), 1996, 1151-1174.
- [15] De Marco, R.; Clarke, G.; Pejicic, B. "Ion-selective electrode potentiometry in environmental analysis". *Electroanalysis*, 2007, 19(19-20), 1987-2001.
- [16] Kautsky, H.; Hirsch, A. "Detection of traces of oxygen by phosphorescence destruction". *Zeitschrift fuer anorganische und allgemeine Chemie*, 1935, 222, 126-134.
- [17] Bergman, I. "Rapid-response atmospheric oxygen monitor based on fluorescence quenching". *Nature*, 1968, 218, 396-396.
- [18] Luebbers, D. W.; Opitz, N. "The pCO₂-/pO₂-optode. New probe for measurement of partial pressure of carbon dioxide or partial pressure of oxygen in fluids and gases". *Zeitschrift fuer Naturforschung, teil C*, 1975, 30, 532-533.

- [19] Hesse, H. C. *East German Patent* 106,086, 1974.
- [20] Boisdé, G.; Harmer, A. *Chemical and biochemical sensing with optical fibers and waveguides*. Boston, London: Artech House Optoelectronics Library, 1995.
- [21] Holst, G.; Mizaikoff, B. *Fiber optic sensors for environmental applications*, p. 729-755. En: Lopez-Higuera J. M. (ed.). *Handbook of Optical Fibre Sensing Technology*. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd., 2002.
- [22] Moulin, C.; Rougeault, S.; Hamon, D.; Mauchien, P. "Uranium determination by remote time-resolved laser-induced fluorescence". *Applied Spectroscopy*, 1993, 47, 2007-2012.
- [23] Gauglitz, G. Ingenhoff, J. "Integrated optical sensors for halogenated and non-halogenated hydrocarbons". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1993, 11, 207-212.
- [24] Freeman, M. K.; Bachas, L. G. "Fiber optic sensor for NOx nitrogen oxides". *Analytica Chimica Acta*, 1992, 256, 269-275.
- [25] Kar, S.; Arnold, M. A. "Cylindrical sensor geometry for absorbance-based fiber-optic ammonia sensors". *Talanta*, 1994, 41, 1051-1058.
- [26] Xavier, M. P.; García-Fresnadillo, D.; Moreno-Bondi, M. C.; Orellana, G. "Oxygen sensing in nonaqueous media using porous glass with covalently bound luminescent Ru(II) complexes". *Analytical Chemistry*, 1998, 70, 5184-5189.
- [27] Milanovich, F. P.; Brown, S. B.; Colston, B. W.; Daley, P. F.; Langry, K. C. "A fiber-optic sensor system for monitoring chlorinated hydrocarbon pollutants". *Talanta*, 1994, 41, 2189-2194.
- [28] Puyol, M.; Salinas, I.; Garces, I.; Villuendas, F.; Llobera, A.; Dominguez, C.; Alonso, J. "Improved integrated waveguide absorbance optodes for ion-selective sensing". *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 3354-3361.
- [29] Wygladacz, K.; Radu, A.; Xu, C.; Qin, Y.; Bakker, E. "Fiber-optic microsensor array based on fluorescent bulk optode microspheres for the trace analysis of silver ions". *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 4706-4712.
- [30] Badr, I. H. A.; Johnson, R. D.; Madou, M. J.; Bachas, L. G. "Fluorescent ion-selective optode membranes incorporated onto a centrifugal microfluidics platform". *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 5569-5575.
- [31] Hecht, H.; Kolling, M. "A low-cost optode-array measuring system based on 1 mm plastic optical fibers - new technique for in situ detection and quantification of pyrite weathering processes". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2001, B81, 76-82.
- [32] Homola, J. "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species". *Chemical Reviews*, 2008, 108, 462-493.
- [33] Zhu, L.; Lee, C. S.; DeVoe, D. L. "Integrated microfluidic UV absorbance detector with attomol-level sensitivity for BSA". *Lab on a Chip*, 2006, 6, 115-120.
- [34] Van der Sneppen, L.; Wiskerke, A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Ubachs, W. "Improving the sensitivity of HPLC absorption detection by cavity ring-down spectroscopy in a liquid-only cavity". *Analytica Chimica Acta*, 2006, 558, 2-6.
- [35] Ro, K. W.; Lim, K.; Shim, B. C.; Hahn, J. H. "Integrated light collimating system for extended optical-path-length absorbance detection in microchip-based capillary electrophoresis". *Analytical Chemistry*, 2005, 77, 5160-5166.

- [36] Mota da Silva, V.; Veloso, M. C. da C.; de Oliveira, A. S.; Santos, G. V.; Pereira, P. A. de P.; de Andrade, J. B. "Determination of simple bromophenols in marine fishes by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)". *Talanta*, 2005, 68, 323-328.
- [37] Burger, F.; Dawson, M.; Roux, C.; Maynard, P.; Doble, P.; Kirkbride, P. "Forensic analysis of condom and personal lubricants by capillary electrophoresis". *Talanta*, 2005, 67, 368-376.
- [38] Rijke, E.; Aardenburg, L.; Dijk, J.; Ariese, F.; Ernst, W. H. O.; Gooijer, C.; Brinkman, U. A. "Changed isoflavone levels in red clover (*Trifolium pratense* L.) leaves with disturbed root nodulation in response to waterlogging". *Journal of Chemical Ecology*, 2005, 31, 1285-1298.
- [39] Lee, H. W.; Won, K. J.; Cho, S. H.; Ha, Y. H.; Park, W. S.; Yim, H. T.; Baek, M.; Rew, J. H.; Yoon, S. H.; Yim, S. V.; Chung, J. H.; Lee, K. T. "Quantitation of niflumic acid in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection and its application to a bioequivalence study of talniflumate tablets". *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005, 821, 215-220.
- [40] Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. "Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics". *Chemical Reviews*, 1997, 97, 3083-3132.
- [41] Puyol, M.; Villuendas, F.; Domínguez, C.; Cadarso, V.; Llobera, A.; Salinas, I.; Garcés, I.; Alonso, J. "Absorbance-based integrated optical sensors". Orellana, G.; Moreno-Bondi, M. C. (eds.). *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, 3 (Frontiers in Chemical Sensors)*, Heidelberg: Springer, 2005, 1-44.
- [42] Kim, S. B.; Kang, T. Y.; Cha, G. S.; Nam, H. "Quantitative determination of heparin levels in serum with microtiter plate-format optode". *Analytica Chimica Acta*, 2006, 557, 117-122.
- [43] Valeur, B.; Brochon, J. C. (eds.). *New trends in fluorescence spectroscopy. Application to chemical and life sciences*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2001.
- [44] Wolfbeis, O. S. (ed.). *Fluorescence spectroscopy. New methods and applications*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.
- [45] Schulman, S. G. (ed.). *Molecular luminescence spectroscopy, part III: methods and applications*. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- [46] Ichinose, N.; Schwedt, G.; Schnepel, F. M.; Adachi, K. *Fluorometric analysis in biomedical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 1987.
- [47] Lakowicz, J. R. (ed.). *Topics in fluorescence spectroscopy, Volume 4, Probe design and chemical sensing*. New York: Plenum Press, 1994.
- [48] Liebsch, G.; Klimant, I.; Wolfbeis, O. S. "Luminescence lifetime temperature sensing based on sol-gels and poly(acrylonitrile)s dyed with ruthenium metal-ligand complexes". *Advanced Materials*, 1999, 11, 1296-1299.
- [49] Birch, D. J. S.; Rolinski, O. J.; Hatrick, D. "Fluorescence lifetime sensor of copper ions in water". *Review of scientific instruments*, 1996, 67, 2732-2737.
- [50] Kieslinger, D.; Draxler, S.; Trznadel, K.; Lippitsch, M. E. "Lifetime-based capillary waveguide sensor instrumentation". *Sensors and Actuators B*, 1997, 29, 300-304.
- [51] Anzenbacher, P.; Tyson, D. S.; Jursíková, K.; Castellano, F. N. "Luminescence lifetime-based sensor for cyanide and related anions". *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124, 6232-6233.

- [52] Lippitsch, M. E.; Draxler, S.; Kieslinger, D. "Luminescence lifetime-based sensing: new materials, new devices". *Sensors and Actuators B*, 1997, 29, 96-102.
- [53] Szmecinski, H.; Lakowicz, J. R. *Lifetime-based sensing*. En: Lakowicz, J. R. (ed). *Topics in fluorescence spectroscopy, Volume 4, Probe design and chemical sensing*. New York: Plenum Press, 1994, p. 295-334.
- [54] Oehme, I.; Prattes, S.; Wolfbeis, O. S.; Mohr, G. J. "The effect of polymeric supports and methods of immobilization on the performance of an optical copper(II)-sensitive membrane based on the colourimetric reagent Zincon". *Talanta*, 1998, 47, 595-604.
- [55] Kawabata, Y.; Kamichika, T.; Imasaka, T.; Ishibashi, N. "Ion-selective optrode using hexadecyl-acridine orange attached on poly(vinyl chloride) membrane". *Analytical Chemistry*, 1990, 62, 2054-2055.
- [56] Baker, M. E. J.; Narayanaswamy, R. "The modelling of the pH response of an immobilised indicator". *Sensors and Actuators, B*, 1995, 29, 368-373.
- [57] Uttamlal, M.; Sloan, W. D.; Millar, D. "Covalent immobilization of fluorescent indicators in photo- and electropolymers for the preparation of fibreoptic chemical sensors". *Polymer International*, 2002, 51, 1198-1206.
- [58] Qin Y.; Bakker, E. "A copolymerized dodecacarborane anion as covalently attached cation exchanger in ion-selective sensors". *Analytical Chemistry*, 2003, 75, 6002-6010.
- [59] Nivens, D. A.; Schiza, M. V.; Angel, S. M. "Multilayer sol-gel membranes for optical sensing applications: single layer pH and dual layer CO₂ and NH₃ sensors". *Talanta*, 2002, 58, 543-550.
- [60] Zhang, Z.; Seitz, W. R. "A fluorescence sensor for quantifying pH in the range from 6.5 to 8.5". *Analytical Chimica Acta*, 1984, 160, 47-55.
- [61] Fuh, M. R. S.; Burgess, L. W.; Hirschfeld, T.; Christian, G.D.; Wang, F." Single fibre optic fluorescence pH probe". *Analyst*, 1987, 112, 1159-1163.
- [62] Nivens, D. A.; Zhang, Y.; Angel, S. M. "A fiber-optic pH sensor using base-catalyzed organo-silica sol-gel". *Analytica Chimica Acta*, 1998, 376, 235-245.
- [63] Carter, J. C.; Alvis, R. M.; Brown, S. B.; Langry, K. C.; Wilson, T. S.; McBride, M. T.; Myrick, M.L.; Cox, W. R.; Grove, M. E.; Colston, B. W. "Fabricating optical fiber imaging sensors using inkjet printing technology: A pH sensor proof-of-concept". *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21, 1359-1364.
- [64] Shortreed, M. R.; Barker, S. L. R.; Kopelman, R. "Anion-selective liquid-polymer optodes with fluorescent pH chromoionophores, tunable dynamic range and diffusion enhanced lifetimes". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 1996, 35-36, 217-221.
- [65] Hamamatsu Photonics K. K. [en línea]. *Hamamatsu Photonics*. <http://jp.hamamatsu.com/products/light-source/index_en.html> [Consulta: 27 enero 2010].
- [66] Photonics.com [en línea]. Laurin Publishing (1996-2007). *Photonics.com: Optical, Laser and Fiber Optics Resource* <<http://www.photonics.com>> [Consulta: 27 enero 2010].
- [67] CVI laser, LLC & Auburn Seewolf, LLC [en línea]. *CVI laser Optics, Components and Assemblies*.(2000-2007)<<http://www.cvilaser.com/Catalog/Pages/nav4.aspx?plid=961&filter=0>> [Consulta: 27 junio 2009].
- [68] Chu, C.; Lo, Y. "A plastic optical fiber sensor for the dual sensing of temperature and oxygen". *IEEE Photonics Technology Letters*, 2008, 20, 63-65.

- [69] Rieke, G. H. *Detection of light*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994.
- [70] Singh Nalwa, H. (ed.). *Photodetectors and Fiber Optics*. San Diego (CA): Academic Press, 2001.
- [71] Bürck, J.; Zimmermann, B.; Mayer, J.; Ache, H.-J. "Integrated optical NIR-evanescent wave absorbance sensor for chemical analysis". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 1996, 354, 284-290.
- [72] White, J.; Kauer, J. S.; Dickinson, T. A.; Walt, D. R. "Rapid analyte recognition in a device based on optical sensors and the olfactory system". *Analytical Chemistry*, 1996, 68, 2191-2202.
- [73] Grygolicz-Pawlak, E.; Plachecka, K.; Wolanin, B.; Malinowska, E. "Towards miniaturized sensors for determination of exchangeable potassium in soil samples". *International Agrophysics*, 2006, 20, 101-105.
- [74] Adasa Sistemas [en línea]. *Adasa Sistemas* <<http://www.adasasistemas.com>> [Consulta: 27 enero 2010].
- [75] Eugster, R.; Rosatzin, T.; Rusterholz, B.; Aebersold, B.; Pedrazza, U.; Rüegg, D.; Schmid, A.; Spichiger, U. E.; Simon, W. "Plasticizers for liquid polymeric membranes of ion-selective chemical sensors". *Analytica Chimica Acta*, 1994, 289, 1-13.
- [76] Dulic, N.; Horváth, L. "Dielectric behaviour of PVC membranes plasticized with dioctyl sebacate or o-nitrophenyl-octyl ether". *Electroanalysis*, 1990, 2, 533-537.
- [77] *Selectophore: Ionophores, membranes, mini-ISE*. Catálogo Fluka Chemie AG: Buchs, Suiza, 1996.
- [78] Covington, A. K.; Kumar, N. "Use of the ionophore antibiotic A23187 in liquid ion-exchange ion-selective electrodes". *Analytica Chimica Acta*, 1976, 85, 175-178.
- [79] Suzuki, K.; Tohda, K.; Aruga, H.; Matsuzoe, M.; Inoue, H.; Shirai, T. "Ion-selective electrodes based on natural carboxylic polyether antibiotics". *Analytical Chemistry*, 1988, 60, 1714-1721.
- [80] Feinstein, M. B.; Felsenfeld, H. "The detection of ionophorous antibiotic-cation complexes in water with fluorescent probes". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1971, 68, 2037-2041.
- [81] Eyal, E.; Rechnitz, G. A. "Mechanistic studies on the valinomycin-based potassium electrode". *Analytical Chemistry*, 1971, 43, 1090-1093.
- [82] Valeur, B.; Leray, I. "Design principles of fluorescent molecular sensors for cation recognition". *Coordination Chemistry Reviews*, 2000, 205, 3-40.
- [83] Schaller, U.; Bakker, E.; Spichiger, U. E.; Pretsch, E. "Ionic additives for ion-selective electrodes based on electrically charged carriers". *Analytical Chemistry*, 1994, 66, 391-398.
- [84] Eugster, R.; Spichiger, U. E.; Simon, W. "Membrane model for neutral-carrier-based membrane electrodes containing ionic sites". *Analytical Chemistry*, 1993, 5, 689-695.
- [85] Rosatzin, T.; Bakker, E.; Suzuki, K.; Simon, W. "Lipophilic and immobilized anionic additives in solvent polymeric membranes of cation-selective chemical sensors". *Analytica Chimica Acta*, 1993, 280, 197-208.
- [86] Bakker, E.; Pretsch, E. "Lipophilicity of tetraphenylborate derivatives as anionic sites in neutral carrier-based solvent polymeric membranes and lifetime of corresponding ion-selective electrochemical and optical sensors". *Analytica Chimica Acta*, 1995, 309, 7-17.

- [87] Seiler, K. *Ion-Selective Optode Membranes*. Buchs, Suiza: Fluka Chemie AG, 1993.
- [88] Tanisaka, H.; Kizaka-Kondoh, S.; Makino, A.; Tanaka, S.; Hiraoka, M.; Kimura, S. "Near-infrared fluorescent labeled peptosome for application to cancer imaging". *Bioconjugate Chemistry*, 2008, 19, 109-117.
- [89] Patonay, G.; Strekowski, L.; Nguyen, D.-N.; Seok, K. J. "Near-infrared dyes and upconverting phosphors as biomolecule labels and probes". *Proceedings of SPIE-The International Society for Optical Engineering*, 2007, 6449 (Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV).
- [90] Fabian, J.; Nakazumi, H.; Matsuoka, M. "Near-infrared absorbing dyes". *Chemical Reviews*, 1992, 92, 1197-1226.
- [91] Hamer, F. M. *Cyanine Dyes and Related Compounds*. En: Weissberg, A. (ed.). *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, vol. 18. New York: Interscience, 1964.
- [92] Tyutyulkov, N.; Fabian, J.; Mehlhorn, A.; Dietz, F.; Tadjer, A. *Polymethine dyes. Structure and Properties*. Sofia: St. Kliment Ohridski University Press, 1991, 249.
- [93] Matsuoka, M. (ed.). *Infrared Absorbing Dyes*. New York-London: Plenum Press, 1990, pp. 220.
- [94] Sczepan, M.; Rettig, W.; Bricks, Y. L.; Slominski, Y. L.; Tolmachev, A. I. "Unsymmetric cyanines: chemical rigidization and photophysical properties". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemical*, 1999, 124, 75-84.
- [95] Ishchenko, A. A. "The length of the polymethine chain and the spectral-luminescent properties of symmetrical cyanine dyes". *Russian Chemical Bulletin*, 1994, 43, 1161-1174.
- [96] Rettig, W.; Rurack, K.; Sczepan, M. *From cyanines to styryl bases- Photophysical properties, photochemical mechanisms and cation sensing abilities of charged and neutral polymethinic dyes*. En: Valeur, B.; Brochon, J.-C. (eds.). *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*. Springer Series on Fluorescence, 2. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2001.
- [97] Valeur, B. *Principles of fluorescent probe design for ion recognition*. En: Lakowicz J. R. (ed.). *Topics in fluorescence spectroscopy, volume 4: Probe design and chemical sensing*. New York: Plenum, 1994.
- [98] Brooker, L. G. S.; Sklar, A. L.; Cressman, H. W. J.; Keyes, G. H.; Smith, L. A.; Sprague, R. H.; Van Lare, E.; Van Zandt, G.; White, F. L.; Williams, W. W. "Color and Constitution. VII. Interpretation of absorptions of dyes containing heterocyclic nuclei of different basicities". *Journal of American Chemical Society*, 1945, 67, 1875-1889.
- [99] Fry, D. J. *Cyanine dyes and related compounds*. En: Coffey, S. (ed.). *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds, IVB Heterocyclic compounds*, New York: Elsevier, 1977, cap. 15.
- [100] Brooker, L. G. S.; Sprague, R. H.; Cressman, H. W. J. "Color and Constitution. VIII.¹ Absorption of Unsymmetrical Carbocyanines". *Journal of American Chemical Society*, 1945, 67, 1889-1893.
- [101] Brooker L. G. S. *The search for longer conjugated chains in cyanine dyes*. En: Gore T. S.; Joshi B. S.; Sunthakar S. V.; Tilak B. D. (eds.), *Recent Progress in Chemistry of natural and synthetic colouring matters and related fields*. New York: Academic Press, 1962, p. 573
- [102] Emmelius M.; Pawlowski G.; Vollmann H. W. "Materials for optical data storage". *Angewandte Chemie International Edition*, 1989, 28, 1445-1471.
- [103] Griffiths J. *Colour and constitution of organic molecules*. London: Academic Press, 1976.

- [104] Reynolds G. A.; Drexhage K. H. "Stable heptamethine pyrylium dyes that absorb in the infrared". *Journal of Organic Chemistry*, 1977, 42, 885-888.
- [105] Knott, E. B.; Williams, L. A. "The colour of organic compounds. Part III. A new method of assessing the M effect of heterocyclic nuclei". *Journal of Chemical Society*, 1951, 1586-1589.
- [106] Lifshits, E. B.; Karpova, Y. M.; Ushomirskii, M. N. "Correlation of polymethine dye basicity with parameters of the terminal heterocyclic nuclei". *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 1990, 1071-1078.
- [107] Sturmer, D. M.; Diehl, D. R.; *Polymethine dyes*. En: Grayson, M.; Eckroth, D.; (eds.). *Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology*, 3rd ed., New York: John Wiley & Sons, 1982, p. 848.
- [108] Herz A. H. "Protonation equilibria of cyanines in solution and at AgBr". *Society of Photographic Scientists & Engineers*, 1974, 18, 207-215.
- [109] Lipowska, M.; Patterson, S. E.; Patonay, G.; Strekowsky, L. "A highly selective hydrogen-deuterium exchange in indolium heptamethine cyanines". *Journal of the Heterocyclic Compounds*, 1993, 30, 1177-1180.
- [110] West, W.; Pearce, S. "The dimeric state of cyanines". *The Journal of Physical Chemistry*, 1965, 69, 1894-1903.
- [111] Mishra A.; Behera R. K.; Behera P. K.; Mishra B. K.; Behera G. B. "Cyanines during the 1990s: a review". *Chemical Reviews*, 2000, 100, 1973-2011.
- [112] Khairutdinov, R. F.; Serpone, N. "Photophysics of cyanine dyes: subnanosecond relaxation dynamics in monomers, dimers and H- and J-aggregates in solution". *The Journal of Physical Chemistry, B*. 1997, 101, 2602-2610
- [113] Baraldi, I.; Brancolini, G.; Momicchioli, F.; Ponterini, G.; Vanossi, D. "Solvent influence on absorption and fluorescence spectra of merocyanine dyes: a theoretical and experimental study". *Chemical Physics*. 2003, 228, 309-325.
- [114] Kessler, M. A.; Wolfbeis, O. "New highly fluorescent ketocyanine polarity probes". *Spectrochimica Acta*. 1991, 47A, 187-192.
- [115] Doroshenko, A. O.; Pivovarenko, V. G. "Fluorescence quenching of the ketocyanine dyes in polar solvents: anti-TICT behaviour". *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. 2003, 156, 55-64.
- [116] Pivovarenko, V. G.; Klueva, A. V.; Doroshenko, A. O.; Demchenko, A. P. "Bands separation in fluorescence spectra of ketocyanine dyes evidence for their complex formation with monohydric alcohols". *Chemical Physics Letters*, 2000, 325, 389-398.
- [117] Banerjee, D.; Bagchi, S.; Mondal, S.; Ghosh, S. "Fluorometric study of solvation characteristics of ketocyanine dyes in mixed binary solvents". *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. 1995, 90, 171-176.
- [118] Doroshenko, A. O.; Bilokin, M.; Pivovarenko, V. G. "New fluorescent dye of dibenzylcyclopentanone series possessing increased solvatochromism and "energy gap law" regulated fluorescence quenching in polar solvents. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. 2004, 163, 95-102."
- [119] Ajayaghosh, A. "Chemistry of squaraine-derived materials: near-IR dyes, low band gap systems, and cation sensors". *Accounts of Chemical Research*, 2005, 38, 449-459.

[120] Encinas, C.; Otazo, E.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, J. "Croconines: new acidochromic dyes for the near infrared region". *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 8391-8393.

[121] Martinez, G. R.; Garcia, F.; Catalani, L. H.; Cadet, J.; Oliveira, M. C. B.; Ronsein, G. E.; Miyamoto, S.; Medeiros, M. H. G.; Di Mascio, P. "Synthesis of a hydrophilic and non-ionic anthracene derivative, the N,N'-di-(2,3-dihydroxypropyl)-9,10-anthracenedipropanamide as a chemical trap for singlet molecular oxygen detection in biological systems". *Tetrahedron*, 2006, 62, 10762-10770.

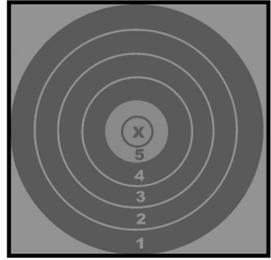
[122] Gould, D. M.; Spiro, M.; Griffith, W. P. "Mechanism of bleaching by peroxides. Part 6. Kinetics of the peroxide bleaching of methyl orange catalysed by MoO_4^{2-} and WO_4^{2-} at pH 10". *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2005, 234, 145-150.

[123] Puyol, M.; Barros, C.; Alonso, J. *Strategies to avoid photodecomposition of cyanine dyes in PVC membranes*. IX Trobada Transfronterera sobre Sensors i Biosensors, Tarragona, 2004. Comunicación póster.

[124] Ohashi, M.; Katasani, K.; Shinohara, H.; Sato, H. "Molecular mechanics studies on inclusion compounds of cyanine dye monomers and dimers in cyclodextrin cavities". *Journal of the American Chemical Society*. 1990, 112, 5824-5830.

[125] Rao, T. V. S.; Huff, J. B.; Bieniarz, C. "Supramolecular control of photophysical properties of cyanine dyes". *Tetrahedron*, 1998, 54, 10627-10634.

[126] Emara, S.; Morita, I.; Tamura, K.; Razee, S.; Masujima, T.; Mohamed, H. A., El-Gizawy, S. M.; El-Rabbat, N. A. "Effect of cyclodextrins on the stability of adriamycin, adriamycinol, adriamycinone and daunomycin". *Talanta*, 2000, 51, 359-364.



OBJETIVOS

2. Objetivos

La presente tesis se enmarca en un proyecto multidisciplinar realizado en conjunción con el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Zaragoza y el Grupo de Tecnologías Fotónicas I3A de la Universidad de Zaragoza, en el que se pretenden desarrollar nuevos sensores ópticos miniaturizados basados en fluorescencia. El empleo de fluorescencia representa intrínsecamente una ventaja en términos de sensibilidad y minimización de interferencias, ya que existen muy pocas moléculas que sean fluorescentes, y menos aún en la zona vis-NIR del espectro electromagnético. El trabajo conjunto, realizado bajo el impulso del *Grup de Sensors i Biosensors* (GSB), tiene como objetivo común la obtención de sensores robustos y versátiles, de pequeño tamaño y de fácil acoplamiento a fibras ópticas. Asimismo, los sensores deben ser de uso sencillo, de respuesta reproducible y proporcionar una alta sensibilidad y selectividad.

Con el fin de alcanzar este objetivo global, los hitos a alcanzar a lo largo de la presente tesis son los siguientes:

1. Diseño, síntesis y caracterización de nuevos colorantes cianina que presenten absorciones a las longitudes de onda de emisión de láseres de diodo, así como una intensa emisión de fluorescencia, para su uso como cromo(fluoro)ionóforos en membranas de PVC plastificado. Desde un punto de vista estrictamente analítico, la zona del infrarrojo cercano del espectro electromagnético es muy interesante ya que se caracteriza por ser una zona relativamente libre de interferencias. La obtención de moléculas con propiedades espectroscópicas en esta zona es necesaria debido a su poca disponibilidad comercial. Asimismo, las moléculas deben cumplir un conjunto de requisitos adicionales como que

sean compatibles con la instrumentación miniaturizada y suficientemente lipofílicas como para ser solubles y estables en optodos.

2. Caracterización espectroscópica (absorbancia y fluorescencia) de los colorantes cianina sintetizados como indicadores de pH en medio etanol.

3. Formulación y optimización de membranas de PVC plastificado incorporando los colorantes sintetizados como cromo(fluro)ionóforos de pH.

4. Formulación y optimización de optodos selectivos a iones por combinación de un ionóforo selectivo a un determinado analito y un colorante cianina sintetizado como fluoróionóforo de protón. Caracterización de su respuesta en instrumentación convencional.

5. Construcción de una plataforma fluorosensora constituida por componentes ópticos discretos y miniaturizados. Activación y validación de su funcionamiento en condiciones de flujo continuo utilizando membranas ópticas de parámetros seleccionados.

6. Construcción de una sonda de fluorescencia acoplada a la plataforma sensora que permita realizar medidas *in-situ* y en discontinuo, con el objetivo de obtener un dispositivo portátil y de membrana fácilmente intercambiable. Activación química y aplicación de la sonda fluorosensora con las membranas selectivas previamente optimizadas.



EXPERIMENTAL

3. Experimental

3.1. REACTIVOS

3.1.1. Disoluciones

Para el estudio de los cromo(fluro)ionóforos en disolución, éstos se disolvieron en etanol 96% (v/v) (Panreac, Barcelona, España) a una concentración aproximadamente 10^{-5} M. En el caso de los cromo(fluro)ionóforos **c5** y **c7** y para mejorar su solubilidad, se añadió un 10% de dimetilformamida (Panreac, Barcelona, España) a la disolución etanólica. El pH de las disoluciones tamponadas y de las etanólicas de (cromo(fluro)ionóforos se modificó realizando pequeñas adiciones de disoluciones concentradas de HCl (Panreac, Barcelona, España) y NaOH (Fluka, Buchs, Suiza) preparadas en agua bidestilada. Siempre se empleó agua bidestilada para la preparación de las disoluciones.

Disoluciones tampón

Para modificar el pH de los optodos y obtener así las curvas de calibrado de los cromo(fluro)ionóforos en el medio membrana, se preparó un tampón combinado. Éste consiste en una disolución 4.0×10^{-3} M de fosfato sódico dodecahidratado (Merck, Darmstadt, Alemania), 4.5×10^{-3} M de tetraborato sódico decahidratado (Merck, Darmstadt, Alemania) y 14.7×10^{-3} M de citrato sódico anhídrido (Carlo Erba, Milan, Italia), disueltos en agua bidestilada.

Las disoluciones tampón empleadas en los estudios de los optodos selectivos a potasio fueron: 0.05 M tris(hidroximetil)aminometano (Merck, Darmstadt, Alemania) ajustado a pH=8 con ácido clorhídrico (Panreac, Barcelona, España); y una disolución 0.05 M de acetato de magnesio (Merck, Darmstadt, Alemania) ajustada a distintos valores de pH (pH=3, 4 y 5) mediante adición de ácido acético concentrado (Panreac, Barcelona, España).

Los tampones empleados en los estudios de la sonda de fluorescencia desarrollada para medidas de plomo fueron disoluciones de acetato de magnesio (Merck, Darmstadt,

Alemania) a distintas concentraciones ajustadas a un determinado pH con ácido acético concentrado (Panreac, Barcelona, España).

Patrones

Todos los reactivos empleados en la preparación de patrones fueron de calidad para análisis (pa).

Para los calibrados de potasio se prepararon dos disoluciones madre a partir de las que se obtuvieron patrones a distintas concentraciones por dilución directa: uno consistía en una disolución 0.1 M de cloruro potásico (Panreac, Barcelona, España) en tampón de tris(hidroximetil)aminometano (Merck, Darmstadt, Alemania) 0.05 M ajustado a pH=8; y el otro, en una disolución 0.1 M de cloruro potásico (Panreac, Barcelona, España) en tampón de acetato de magnesio 0.05 M (Merck, Darmstadt, Alemania) ajustada a distintos pH (pH=3, 4 y 5), según el estudio.

Los patrones 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M y 1×10^{-2} M de plomo (II) utilizados para preparar disoluciones de concentraciones distintas y realizar el calibrado de la sonda de fluorescencia fueron obtenidos mediante dilución de una disolución madre 5×10^{-2} M de nitrato de plomo (II) (Merck, Darmstadt, Alemania).

En las adiciones estándar realizadas para la determinación de plomo en extractos acéticos de suelos (muestras naturales) se añadieron volúmenes conocidos de una disolución madre 0.1 M de nitrato de plomo (II) (Merck, Darmstadt, Alemania) en tampón de acetato de magnesio 0.05 M (Merck, Darmstadt, Alemania) a pH=6.

3.1.2. Reactivos para síntesis de precursores y cromo(fluro)ionóforos

Todos los reactivos empleados en la síntesis de precursores y cromo(fluro)ionóforos fueron de calidad *para síntesis* (ps).

3.1.3. Componentes de membrana

Los componentes empleados para la preparación de las membranas ópticas son de Selectophore® (Fluka, Buchs, Suiza), excepto el tetrahidrofurano (Panreac, Barcelona, España) que se usó como disolvente volátil de los cócteles sensores.

Polímero

La matriz de todas las membranas preparadas en el presente trabajo está basada en cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC).

Plastificantes

Los plastificantes ensayados fueron sebacato de di-(2-etilhexilo), fosfato de tris(2-etilhexilo) y fenilfosfonato de dioctilo.

Ionóforos

Para la determinación de potasio, el ionóforo usado fue la valinomicina (Ionóforo de Potasio I, Potassium Ionophore I) y para la determinación de plomo, el ionóforo de plomo Lead ionophore III, ETH 5435 (N,N,N',N'-Tetradodecil-3,6-dioxaoctanoditioamida).

Cromo(fluro)ionóforos

Los cromo(fluro)ionóforos selectivos a protón empleados en el presente trabajo fueron sintetizados en los laboratorios del *Grup de Sensors i Biosensors de la Universitat Autònoma de Barcelona*.

Aditivos iónicos

Como aditivo aniónico se empleó el tetrakis(*p*-clorofenilborato) de potasio y como aditivo catiónico, el bromuro de tetraoctilamonio.

3.2. INSTRUMENTACIÓN PARA LA CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES, CROMO(FLURO)IONÓFOROS Y OPTODOS

Espectroscopia

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron registrados en el *Servei de Ressonància Magnètica Nuclear* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*. Los espectros de protón de 250 MHz y de carbono de 62.5 MHz, así como los espectros de aumento sin distorsión por transferencia de polarización (*Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer*, DEPT) y correlación $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ fueron registrados en un aparato Bruker AC 250 a 298 K. Los desplazamientos se dan en δ (ppm), utilizando como referencia interna el propio disolvente residual no deuterado. Las abreviaturas empleadas para describir la multiplicidad de las absorciones observadas son las siguientes: s (singlete), d (doblete), t (triplete), q (cuadruplete), m (multiplete) y J para indicar la constante de acoplamiento.

Para la obtención de los espectros en la región UV-vis-NIR, y para determinar la longitud de onda del máximo de absorción y la absortividad molar de las moléculas sintetizadas, se usó un espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-vis-NIR -310PC (Kyoto, Japón).

El espectrofluorímetro empleado para las medidas de fluorescencia es el modelo LS50 de Perkin Elmer (Norwalk, USA).

Espectrometría

Los espectros de masas fueron registrados en el *Institut de Biologia Fonamental* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, empleando la técnica de desorción/ionización láser asistida por la matriz (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*, MALDI). Todos los espectros se realizaron sin matriz.

El método de referencia utilizado para el análisis de plomo de muestras naturales fue la espectrometría de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) y se realizó en el *Servei d'Anàlisi Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*.

Análisis elementales

Los análisis elementales orgánicos (C, H, N, S) fueron realizados en el *Servei d'Anàlisi Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, en un instrumento EuroVector 3011.

Instrumentación miniaturizada basada en medidas de fluorescencia

En el presente trabajo, se construyeron, en colaboración con el Grupo de Tecnologías Fotónicas (GTF) de la Universidad de Zaragoza, dos tipos de dispositivos miniaturizados diferentes que hacen uso de componentes ópticos discretos. Éstos se activaron químicamente con optodos para su aplicación en la determinación de analitos iónicos, basándose en medidas de intensidad de fluorescencia. Se diseñó y construyó una plataforma sensora para realizar medidas en sistemas de flujo, y una sonda de fluorescencia para realizar medidas in-situ y en discontinuo (*batch*). Ambos sistemas de medida se describen a continuación:

a) Plataforma sensora de fluorescencia

La plataforma sensora consiste en un soporte de aluminio de 6.0x10.0x3.5 cm, en el que una ventana de vidrio de 0.8x0.6 cm permite colocar una celda de flujo donde va insertada la membrana sensora depositada en un portaobjetos de vidrio. En la estructura base se incluye: un soporte para el extremo de una fibra óptica con una lente GRIN responsable de conducir la luz de excitación proveniente de un láser semiconductor (Photonic Products, U.K.) modulado por un *lock-in*, que emite a 650 nm; un soporte para la inserción de un filtro óptico (CVI laser, U.K.) centrado a 680 nm, con una densidad óptica de bloqueo o *blocking O. D.* de 4, y de 10 nm de anchura a media altura (FWHM, *Full Width at Half Maximum*) encargado de filtrar la luz emitida por el optodo; otros dos soportes para incluir dos lentes (CVI laser, U.K.) para focalizar la luz y un preamplificador de transimpedancia conectado a un fotodiodo de silicio PIN (Hamamatsu, Japan). La electrónica se conecta a una fuente de 12 V. La señal se amplifica con un amplificador *lock-in* SR810 DSP (Stanford Research Systems, U.S.A.). Para proteger la plataforma sensora de la luz ambiental, el sistema está dotado de una tapa de aluminio ajustada a sus dimensiones y de interior negro (**Figura 3.1a**).

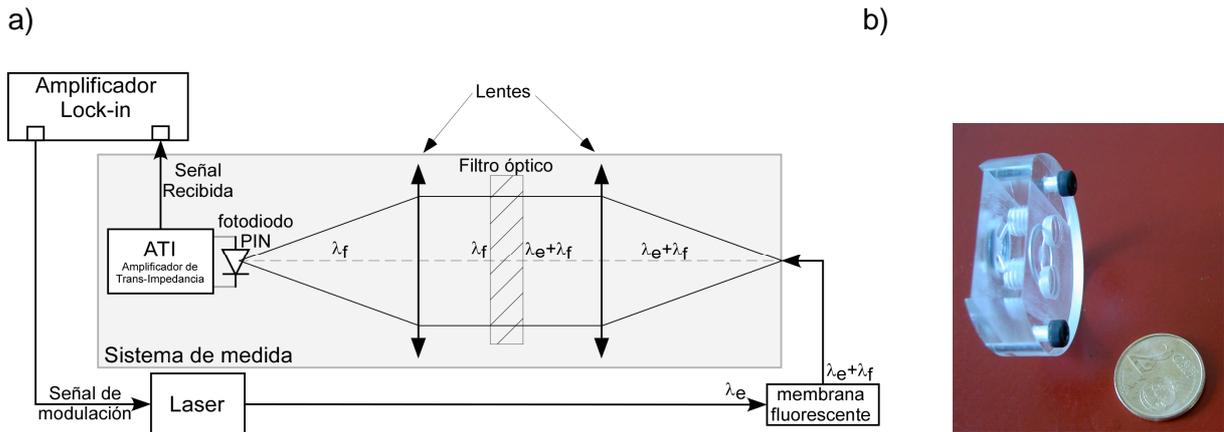


Figura 3.1. a) Esquema de la plataforma fluorosensora; λ_e es la longitud de onda de excitación y λ_f es la longitud de onda de la luz fluorescente emitida. **b)** Celda de flujo.

La celda de flujo se diseñó en el *Grup de Sensors i Biosensors* (GSB) de la UAB. Es una estructura de metacrilato de 4.0x1.1 cm que incluye una hendidura donde colocar la membrana depositada en un portaobjetos, una entrada y una salida (cerradas mediante racores) que llevan el flujo a una cámara de 4 mm de diámetro (donde incide la luz), y una junta toroidal de viton (*Epidor, S.A.*) de 1.3 mm de diámetro interno para asegurar la estanqueidad cuando la celda se atornilla a la plataforma sensora (**Figura 3.1b**).

b) Sonda de fluorescencia

La sonda de fluorescencia consiste en un cilindro hueco de metacrilato de 12.0x2.2 cm de diámetro que encapsula dos fibras pegadas (empleando un adhesivo óptico UV-Curing Norland NOA61) a una pieza de aluminio. Ésta fue diseñada y construida tras un proceso de optimización en el GTF. Las fibras están colocadas a 45° para recoger la máxima intensidad de fluorescencia. Las fibras que emplea son poliméricas, POF (Polymer Optical Fibre). La fibra que lleva la luz desde el emisor es de baja apertura numérica (NA, Numerical Aperture) para inyectar luz (PMUCD1002–22-E) mientras que la que recoge y transporta la luz emitida hacia el detector es de alta NA (ESKA-PREMIER-GH4001). Sobre la pieza de aluminio, se pega un portaobjetos de vidrio, el cual separa físicamente el sistema óptico del químico y en el que se deposita la membrana sensora (**Figura 3.2**). Como sistema de detección se emplea la plataforma sensora descrita anteriormente, adaptándola a la fibra de recogida de luz. La fibra de inyección de luz se conecta a un láser semiconductor (Photonic Products, U.K.) que emite a 650 nm y está modulado por un *lock-in* SR810 DSP (Stanford Research Systems, U.S.A.).



Figura 3.2. Sonda de fluorescencia construida.

Miscelánea

En los estudios realizados con los cromo(fluro)ionóforos, tanto en disolución como en membrana, se determinó el pH mediante un electrodo combinado (Ingold 62-03) conectado a un pH-metro Crisol-micro pH 2002.

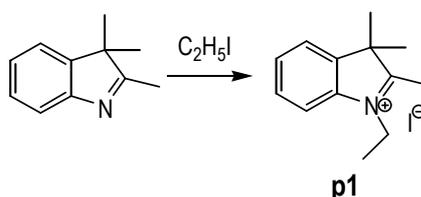
Las membranas fueron depositadas mediante un aparato de rotación controlada (*spin-coater*) Rotofilm, rotacional casting, ICL.

Los puntos de fusión de precursores y cromo(fluro)ionóforos se midieron en un microscopio Kofler de platina calefactora de la firma Reichert y no están corregidos.

3.3. PROCEDIMIENTOS SINTÉTICOS

3.3.1. Síntesis de los precursores

3.3.1.1. Obtención de yoduro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1**; de la correspondiente sal de bromuro (**p1b**) y de perclorato (**p1c**)



En un matraz esférico provisto de tapón hermético se disponen 4.40 g (27 mmol) de 2,3,3-trimetilindolenina (*Aldrich*, 98%) y 5 ml (9.70 g, 62 mmol) de yoduro de etilo (*Aldrich*, *ps*). Se cierra el matraz herméticamente y se calienta a 100 °C durante 4 horas en un baño de agua hirviendo (100 °C), hasta que la muestra solidifica. Los cristales rojizos que precipitan se filtran, separando el exceso de yoduro de etilo, se lavan con éter y se

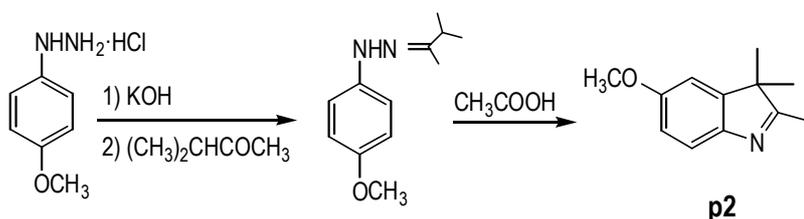
recristalizan en metanol. Se obtienen 8.20 g de producto (26 mmol, 96%) y se identifican como yoduro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1**.

Para obtener bromuro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1b**, y perclorato de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1c**, se disuelve el yoduro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1**, en unos 20 ml de metanol, se añaden unas gotas de trietilamina para obtener la forma básica libre, se purifica, y se vuelve a la sal añadiendo unas gotas de HBr en el caso de **p1b** y de HClO₄ en el de **p1c**.

Punto de fusión de **p1**: 225-228 °C

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.44 (t, J=7.4 Hz, 3H: CH₃), 1.53 (s, 6H: 2 CH₃), 2.82 (s, 3H: CH₃), 4.49 (q, J=7.4 Hz, 2H: CH₂), 7.61-7.64 (m, 2H: H_{arom}), 7.82-7.85 (m, 1H: H_{arom}), 7.95-7.99 (m, 1H: H_{arom}). ¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆): δ 12.81 (CH₃), 14.11 (CH₃), 22.03 (2 CH₃), 43.24 (CH₂), 53.24 (C), 115.43 (CH, C-Ar), 123.67 (CH, C-Ar), 129.05 (CH, C-Ar), 129.48 (CH, C-Ar), 140.82 (C), 142.07 (C), 196.19 (C). DEPT y correlación ¹H/¹³C registrados (Anexo).

3.3.1.2. Obtención de 2,3,3-trimetil-5-metoxindolenina, **p2** [1]

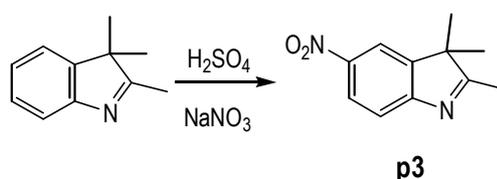


En un matraz erlenmeyer provisto de agitación magnética, se suspenden 14.50 g (81 mmol) de hidrocloreto de p-metoxifenilhidrazina (*Aldrich*, 98%) en 50 ml de etanol absoluto. Se añade bajo agitación una disolución de 4.60 g (82 mmol) de hidróxido de potasio en 30 ml de etanol absoluto. La disolución se vuelve de color beige y el precipitado de cloruro potásico se separa por filtración al vacío en un matraz esférico, lavando varias veces la sal con etanol absoluto. Seguidamente, se añaden 13.3 ml (123 mmol) de 3-metil-2-butanona (*Aldrich*, 99%) a la disolución resultante y se refluxe durante 3 horas. A continuación, se eliminan todos los componentes volátiles, evaporando a presión reducida. Al aceite resultante se añaden 50 ml de ácido acético glacial y esta mezcla se lleva a reflujo durante 5 horas. Posteriormente, el ácido acético se evapora a presión reducida y al aceite resultante se añaden 100 ml de agua. Finalmente, se neutraliza la mezcla (hasta pH≈7) con una disolución saturada de carbonato sódico. El producto se extrae en benceno (3x25 ml). Se

seca la fase bencénica con sulfato sódico anhidro y se filtra por gravedad en un filtro de pliegues. Se evapora el benceno a presión reducida y se destila al vacío el residuo aceitoso de color negro. A 168-170 °C y a 0.05 mm Hg destila un líquido amarillo que a temperatura ambiente solidifica. Se obtienen 9.43 g (50 mmol, 61%) del sólido amarillo identificado como 2,3,3-trimetil-5-metoxindolenina, **p2**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.21 (s, 6H: 2 CH₃), 2.15 (s, 3H: CH₃), 3.75 (s, 3H: OCH₃), 6.80 (dd, J_{6,7}=8.4 Hz, J_{6,4}=2.5 Hz, 1H: H₆), 7.03 (d, J_{4,6}=2.5 Hz, 1H: H₄), 7.30 (d, J_{7,6}=8.4 Hz, 1H: H₇). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 14.98 (CH₃), 22.76 (2 CH₃), 53.43 (C), 55.55 (CH₃, CH₃O), 108.29 (CH, C₄-Ar), 112.31 (CH, C₆-Ar), 119.59 (CH, C₇-Ar), 147.29 (C), 147.67 (C), 157.52 (C), 185.32 (C). **DEPT** y correlación **¹H/¹³C** registrados (Anexo).

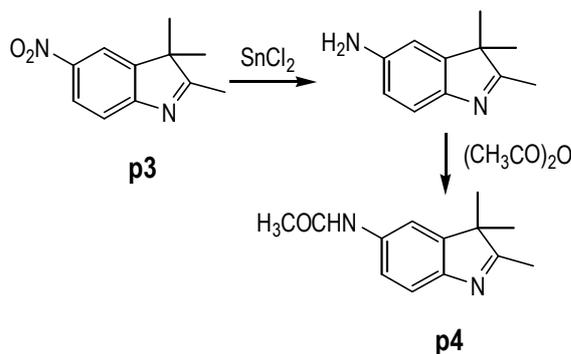
3.3.1.3. Obtención de 2,3,3-trimetil-5-nitroindolenina, **p3**



En un vaso de reacción de 250 ml, sumergido en un baño de hielo con NaCl, y provisto de agitación magnética y termómetro, se dispone una disolución de 6.50 g (40 mmol) de 2,3,3-trimetilindolenina, (*Aldrich*, 98%) en 50 ml de ácido sulfúrico 96%. Manteniendo la temperatura entre -5 °C y 0 °C, se adiciona gota a gota una disolución, también en baño de hielo, de 3.40 g (40 mmol) de nitrato de sodio disuelto en 50 ml de ácido sulfúrico 96%. Tras acabar la adición, se mantiene la agitación durante 30 minutos más. La disolución resultante se diluye con aproximadamente 100 g de hielo. A continuación se añade cuidadosamente hidróxido de sodio hasta que el pH es 10. Aparece un precipitado marrón que se filtra al vacío y se lava varias veces con agua. Se extrae el producto de las aguas madres con acetato de etilo (4x25 ml). Se seca con sulfato sódico anhidro y se filtra por gravedad mediante filtro de pliegues. Se evapora el acetato de etilo a presión reducida y se une el residuo marrón obtenido al precedente de la filtración. Finalmente, se recristaliza este precipitado en una mezcla (1:1) de cloruro de metileno/hexano. Se obtienen 5.80 g (28 mmol, 71%) de 2,3,3-trimetil-5-nitroindolenina, **p3**.

Punto de fusión de **p3**: 127-130 °C

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.32 (s, 6H: 2 CH₃), 2.30 (s, 3H: CH₃), 7.63 (d, J_{7,6}=8.5 Hz, 1H: H₇), 8.22 (dd, J_{6,7}=8.5 Hz, J_{6,4}=2.3, 1H: H₆), 8.40 (d, J_{4,6}=2.3 Hz, 1H: H₄) (Anexo A).

3.3.1.4. Obtención de 5-acetilamino-2,3,3-trimetilindolenina, **p4** [2]

En un matraz esférico provisto de agitación magnética y de refrigerante de reflujo, se disponen 5.22 g (26 mmol) de 2,3,3-trimetil-5-nitroindolenina, **p3**, 34.12 g (151 mmol) de cloruro de estaño (II) dihidratado (*Sigma-Aldrich*, 98%) y 160 ml de ácido clorhídrico 37%. La mezcla se refluje durante 2 horas. Una vez ha alcanzado temperatura ambiente, se filtra el precipitado beige obtenido y se seca al vacío. Éste se disuelve en la mínima cantidad de agua (unos 50 ml) y la disolución marrón obtenida se neutraliza añadiendo unos 150 ml de una disolución de hidróxido de sodio 1M. El precipitado beige identificado como 5-amino-2,3,3-trimetilindolenina, se filtra al vacío, se seca y se recrystaliza en hexano; se obtienen 2.80 g (16 mmol, 62%).

Punto de fusión de 5-amino-2,3,3-trimetilindolenina: 192 °C

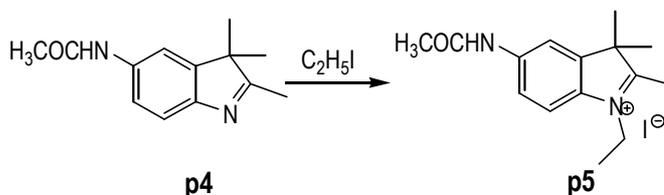
¹H-RMN (250MHz, CDCl₃) δ 1.41 (s, 6H), 2.25 (s, 3H), 3.52 (s ancho, 3H), 6.53–7.20 (m, 3H), 10.1 (s, 1H) (Anexo).

Se disponen 2.80 g de 5-amino-2,3,3-trimetilindolenina en un matraz esférico con 30 ml de dioxano (*Fluka*, 98%) y 10.00 g (114 mmol) de anhídrido acético (*Sigma-Aldrich*, 98%). Se calienta la mezcla durante 2 horas en un baño de agua hirviendo. Seguidamente, se evaporan los componentes volátiles. Al aceite marrón resultante se le añaden unos 25 ml de benceno (*Sigma-Aldrich*, 99%) y se extraen con 15 ml de agua. La fase bencénica se seca con sulfato sódico anhidro, el cual es filtrado posteriormente por gravedad con un filtro de pliegues. Se evapora el benceno a presión reducida y se obtienen 2.70 g (12 mmol, 48%) de un aceite marrón, identificado como 5-acetilamino-2,3,3-trimetilindolenina, **p4**.

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): δ 1.39 (s, 6H: 2 CH₃), 2.16 (s, 3H: CH₃), 2.49 (s, 3H: NHCOCH₃), 7.14 (dd, J_{6,7}=8.8 Hz, J_{6,4}=2.2 Hz, 1H: H₆), 7.50 (s ancho, 1H: NHCOCH₃), 7.65 (d, J_{4,6}=2.2 Hz, 1H: H₄), 7.92 (d, J_{7,6}=8.8 Hz, 1H: H₇). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 14.02

(2 CH₃), 22.85 (CH₃), 30.80 (CH₃, NHCOCH₃), 47.30 (C), 53.43 (C), 97.59 (C), 119.24 (CH, C-Ar), 128.81 (C, C-Ar), 131.62 (C-Ar), 167.08 (C), 168.04 (C), 168.19 (C). **DEPT** registrado (Anexo).

3.3.1.5. Obtención de yoduro de 5-acetilamino-1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p5**

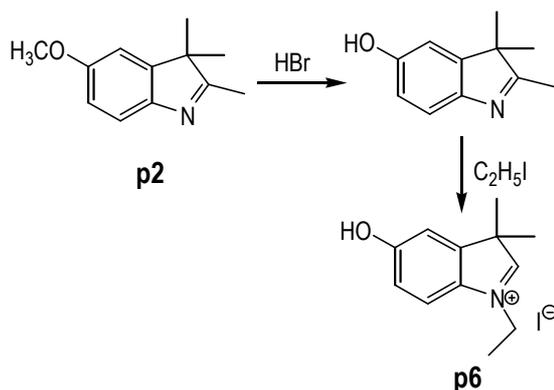


Se sigue la metodología descrita en el apartado § 3.3.1.1 partiendo de 2.70 g del aceite marrón identificado como 5-acetilamino-2,3,3-trimetilindolenina, **p4**, 5 ml (62 mmol) de yoduro de etilo (*Aldrich*, *ps*) y 10 ml de acetonitrilo (*Panreac Química*, 99%). La reacción se completa a las 10 horas cuando la mezcla oscurece. Cuando alcanza la temperatura ambiente se reserva en la nevera durante 12 horas. Posteriormente, se filtran los cristales de color granate que precipitan y se lavan varias veces con acetona (*Panreac*, 98%). Posteriormente, se disuelven en la mínima cantidad de metanol y se obtiene un precipitado por adición de éter. Se obtienen 3.52 g (9 mmol, 79%) de cristales de color granate identificados como yoduro de 5-acetilamino-1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p5**.

Punto de fusión de **p5**: 296–300 °C (descomposición).

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.43/1.50 (t, J=7.2 Hz/s, 9H: CH₃/2 CH₃), 2.09 (s, 3H: CH₃), 2.79 (s, 3H: NHCOCH₃), 4.45 (q, J=7.2 Hz, 2H: CH₂), 7.65 (d, J=8.7 Hz, 1H: H_{arom}), 7.90 (d, J=8.7 Hz, 1H: H_{arom}), 8.03 (s, 1H: H₄). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 12.86 (CH₃), 13.88 (CH₃, NHCOCH₃), 22.23 (2 CH₃), 24.20 (CH₃), 43.24 (CH₂), 54.12 (C), 113.78 (CH, C₄-Ar), 115.92 (CH, C-Ar), 119.26 (CH, C-Ar), 135.78 (C), 140.66 (C), 142.89 (C), 168.91 (C), 194.05 (C). **DEPT** y correlación **¹H/¹³C** registrados (Anexo).

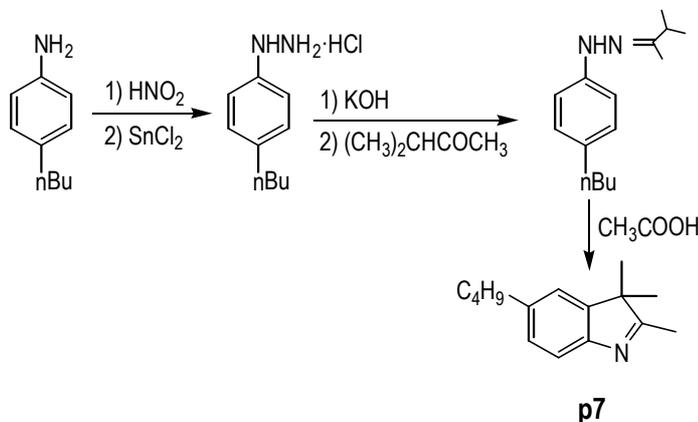
3.3.1.6. Obtención de yoduro de 1-etil-5-hidroxi-2,3,3-trimetilindolenio, **p6**



En un matraz esférico provisto de agitación magnética y de refrigerante de reflujo, se añaden 5.97 g de 2,3,3-trimetil-5-metoxindolenina, **p2**, y 10 ml de ácido bromhídrico (*Panreac Química*, 48%). Se refluje la mezcla durante 6 horas. Para comprobar que la reacción se completa, se toma una muestra y se intenta disolver en una disolución acuosa de hidróxido sódico al 5%. La reacción se considera acabada cuando la muestra se disuelve totalmente. El exceso de ácido bromhídrico se elimina evaporando a presión reducida. La sal resultante se disuelve en la mínima cantidad de agua, se neutraliza con una disolución de hidrogenocarbonato de sodio (*Sigma-Aldrich*, 99.5%) y se extrae con éter (3x25 ml). A continuación, se seca la fase orgánica con sulfato sódico anhidro y se filtra por gravedad en un filtro de pliegues. El éter se evapora a presión reducida y se obtienen 3.81 g (22 mmol, 68%) de un precipitado marrón de 5-hidroxi-2,3,3-trimetilindolenina. Se añaden 1.74 g (10 mmol) de 5-hidroxi-2,3,3-trimetilindolenina y se mezclan con 3 ml (37 mmol) de yoduro de etilo (*Aldrich*, ps) y con 5 ml de acetonitrilo en un matraz esférico. Se cierra herméticamente y se calienta el matraz en un baño de agua hirviendo (100 °C) durante 4 horas. Cuando la mezcla alcanza la temperatura ambiente, se evaporan los componentes volátiles a presión reducida. Los cristales marrones de yoduro de 5-hidroxi-2,3,3-trimetilindolenio, **p6**, se recristalizan en metanol. Se obtienen 2.24 g (7 mmol, 68%).

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.41 (t, J=7.3 Hz, 3H: CH₃), 1.48 (s, 6H: 2 CH₃), 2.76 (s, 3H: CH₃), 4.42 (q, J=7.3 Hz, 2H: CH₂), 6.94 (dd, J_{6,7}=8.8 Hz, J_{6,4}=2.1 Hz, 1H: H₆), 7.14 (d, J_{4,6}=2.1 Hz, 1H: H₄), 7.76 (d, J_{7,6}=8.8 Hz, 1H: H₇), 10.24 (s, 1H: OH). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 12.97 (CH₃), 13.79 (CH₃), 22.20 (2CH₃), 43.13 (CH₂), 53.75 (C), 110.67 (CH, C₄-Ar), 115.34 (CH, C₆-Ar), 116.46 (CH, C₇-Ar), 132.78 (C), 144.25 (C), 159.13 (C), 191.93 (C). **DEPT** y correlación **¹H/¹³C** registrados (Anexo).

3.3.1.7. Obtención de 5-butil-2,3,3-trimetilindolenina, **p7**



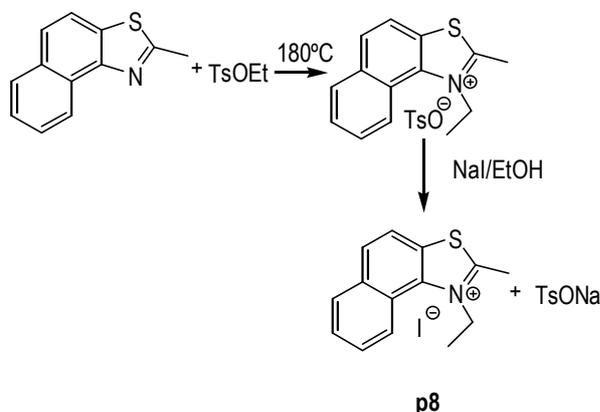
Se añaden, durante 15 minutos, 4.80 g (69 mmol) de nitrito sódico en 20 ml de agua en un vaso de reacción provisto de agitación magnética y sobre un baño de hielo, donde se ha preparado una suspensión de 10.00 g (65 mmol) de 4-butilanilina (*Aldrich*, 97%) y 80 ml de ácido clorhídrico 6M (*Sigma-Aldrich*). Se mantiene la agitación durante 30 minutos más en el baño de hielo y se añaden lentamente 44.50 g (193 mmol) de cloruro de estaño (II) dihidratado (*Sigma-Aldrich*, 98%) en 80 ml de HCl 6M. La suspensión obtenida se agita a 0 °C durante 4 horas. A continuación, se filtra el sólido resultante y se disuelve en una mezcla de 100 ml de KOH al 40% y 100 ml de acetato de etilo (*Panreac*, 98%). Se separa la fase orgánica y se extrae el producto de la fase acuosa con acetato de etilo (3x100 ml). Se juntan las fracciones orgánicas y se agitan con 50 ml de HCl al 10% hasta que se forma un sólido incoloro en la fase orgánica. El producto se filtra y se recrystaliza en etanol para dar 9.43 g (47 mmol, 72%) de hidrocloreto de p-butilfenilhidrazina.

En un matraz erlenmeyer provisto de agitación magnética se suspenden 8.43 g (42 mmol) de hidrocloreto de p-butilfenilhidrazina en 25 ml de etanol absoluto. A continuación se añade una disolución de 2.30 g de KOH en 15 ml de etanol absoluto. El precipitado de cloruro potásico se separa por filtración al vacío directamente en un matraz esférico, lavando varias veces la sal con etanol absoluto. Seguidamente, se añaden 6.7 ml (62 mmol) de 3-metil-2-butanona (*Aldrich*, 99%) a la disolución amarronada resultante y se refluye la mezcla durante 3 horas. A continuación, se eliminan todos los componentes volátiles a presión reducida. Se añaden 25 ml de ácido acético glacial al aceite resultante y la mezcla se mantiene a reflujo durante 5 horas. Se evapora el ácido acético y se añaden 50 ml de agua. Finalmente, se neutraliza la mezcla (hasta pH≈7) añadiendo una disolución saturada de carbonato sódico. Se extrae el producto de la disolución resultante con benceno (3x25 ml), se seca la fase bencénica con sulfato sódico anhidro y se filtra por gravedad en un filtro de pliegues. El benceno se evapora a presión reducida y el aceite resultante se destila también a presión reducida a 175-177°C (0.05 mm Hg). Se obtienen 4.52 g (21 mmol, 50%) de un líquido rojizo identificado como 5-butil-2,3,3-trimetilindolenina, **p7**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 0.88 (t, J=7.3 Hz, 3H: (CH₂)₃CH₃), 1.20 (s, 6H: 2 CH₃), 1.30 (m, 2H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 1.54 (m, 2H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 2.17 (s, 3H: CH₃), 2.58 (t, J=7.7 Hz, 2H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 7.05 (dd, J_{6,7}=7.6 Hz, J_{6,4}=1.7 Hz, 1H: H₆), 7.19 (d, J_{4,6}=1.7 Hz, 1H: H₄), 7.29 (d, J_{7,6}=7.6 Hz, 1H: H₇). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 13.90 (CH₃, (CH₂)₃CH₃), 15.04 (CH₃), 22.00 (CH₂, CH₂(CH₂)₂CH₃), 22.79 (2 CH₃), 33.72 (CH₂, CH₂(CH₂)₂CH₃), 35.08 (CH₂, CH₂(CH₂)₂CH₃), 53.07 (C), 118.94 (CH, C₇-Ar), 121.58 (CH, C₄-

Ar), 127.21 (CH, C₆-Ar), 139.17 (C), 146.11 (C), 151.82 (C), 186.65 (C). **DEPT** y correlación ¹H/¹³C registrados (Anexo).

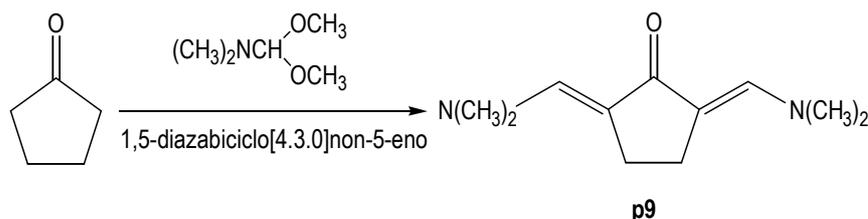
3.3.1.8. Obtención de yoduro de 3-etil-2-metilnafto[1,2-d]tiazolio, **p8**



En un matraz esférico sumergido en un baño de silicona con control de temperatura se añaden 0.20 g (1 mmol) de 3-etil-2-metilnafto[1,2-d]tiazolio (*Aldrich, ps*) y 0.60 g (3 mmol) de tosilato de etilo (*Aldrich, ps*). La mezcla se mantiene durante 12 horas a 180 °C. Una vez ha alcanzado la temperatura ambiente, se disuelve el crudo de reacción en etanol. Se añade una disolución de 0.30 g (2 mmol) de yoduro sódico (*Aldrich, ps*) en etanol y se deja bajo agitación durante 1 hora. Se filtran los cristales de color amarillento identificados como yoduro de 3-etil-2-metilnafto[1,2-d] tiazolio, **p8**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.68 (t, J=7.0 Hz, 3H: CH₃), 3.31 (s, 3H: CH₃), 5.15 (q, J=7.0 Hz, 2H: CH₂), 7.85-7.99 (absorción compleja, 2H: H_{arom}), 8.30-8.43 (absorción compleja, 3H: H_{arom}), 8.76 (d, J=8.4 Hz, 1H: H_{arom}). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 13.50 (CH₃), 17.43 (CH₃), 48.30 (CH₂), 120.23 (CH, C-Ar), 121.64 (CH, C-Ar), 122.19 (C), 128.09 (CH, C-Ar), 129.30 (CH, C-Ar), 129.56 (CH, C-Ar), 129.82 (CH, C-Ar), 130.32(C), 133.63 (C), 136.39 (C), 174.52 (C). **DEPT** y correlación ¹H/¹³C registrados (Anexo).

3.3.1.9. Obtención de 2,5-bis(dimetilaminometil) ciclopentanona, **p9**

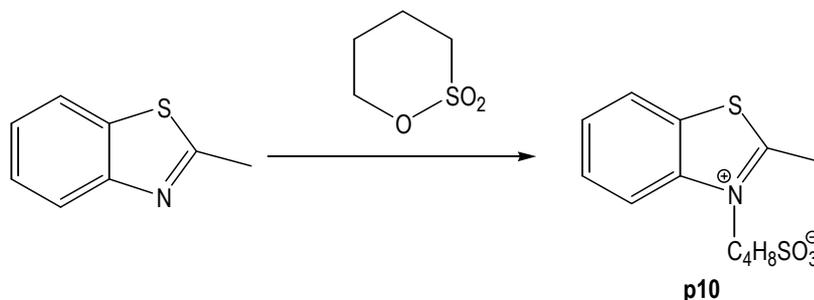


A un matraz esférico de 50 ml sumergido en un baño de silicona (con control de temperatura), provisto de agitación magnética y de una columna de destilación fraccionada se acopla, en la parte superior de ésta, una trampa Dean-Stark y, a continuación, un refrigerante. Se introduce un termómetro a la salida del montaje de manera que la temperatura de los vapores de la columna de destilación pueda ser medida. Se disponen 8.50 g (100 mmol) de ciclopentanona (*Aldrich*, 99%), 31.69 g (250 mmol) de 1,1-dimetoxitrimetilamina (*Aldrich*, 94%) y 0.2 ml de 1,5-diazabicyclo[4,3,0]non-5-eno (*Aldrich*) como catalizador en 30 ml de dimetilformamida (*Aldrich*, *ps*) en el matraz esférico. Se incrementa gradualmente la temperatura del baño de silicona de 160 °C a 190 °C. Durante 10 horas se destilan 16 ml de metanol. El residuo rojo que queda en el matraz esférico se disuelve en 20 ml de acetona y se calienta hasta ebullición. Cuando la disolución está a temperatura ambiente, se reserva en la nevera durante 2 horas. Los cristales rojizos de 2,5-bis(dimetilaminometileno) ciclopentanona se secan al vacío. Se obtienen 9.71 g (50 mmol, 50%).

Punto de fusión de **p9**: 137-138 °C

¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃): δ 2.84 (s, 4H: 2 CH₂), 3.01 (s, 12H: 2 CH₃), 7.10 (s, 2H: 2 CH). ¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆): δ 23.98 (CH₂), 41.76 (2 CH₃), 105.65 (C), 142.54 (CH), 192.15 (C). DEPT registrado (Anexo).

3.3.1.10. Obtención de 2-metil-3-(4-sulfonatobutil)benzotiazolio, **p10**

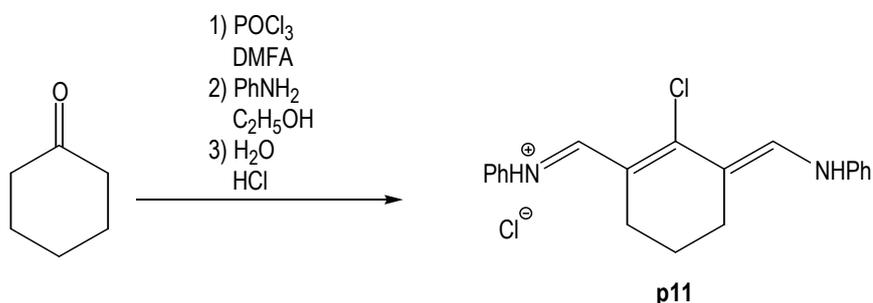


Se sigue la metodología descrita en el apartado § 3.3.1.1, partiendo de 3.0 g (20 mmol) de 2-metilbenzotiazol (*Aldrich*, GC 99%) y 5.40 g (40 mmol) de butanosultona (*Fluka*) como agente alquilante. Se mantiene la reacción durante 3 horas a 100 °C, obteniéndose 4.9 g (17.2 mmol, 86%) de 2-metil-3-(4-sulfonatobutil)benzotiazolio, **p10**.

Punto de fusión de **p10**: 276.4-276.8 °C.

¹H-RMN (250MHz, D₂O): δ 1.77 (m, 2H), 1.96 (m, 2H), 2.81 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.01 (s, 3H), 4.58 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 7.56 - 7.95 (absorbancia compleja, 4H) (Anexo).

3.3.1.11. Obtención de cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-ilideno] anilinio, **p11** [3]

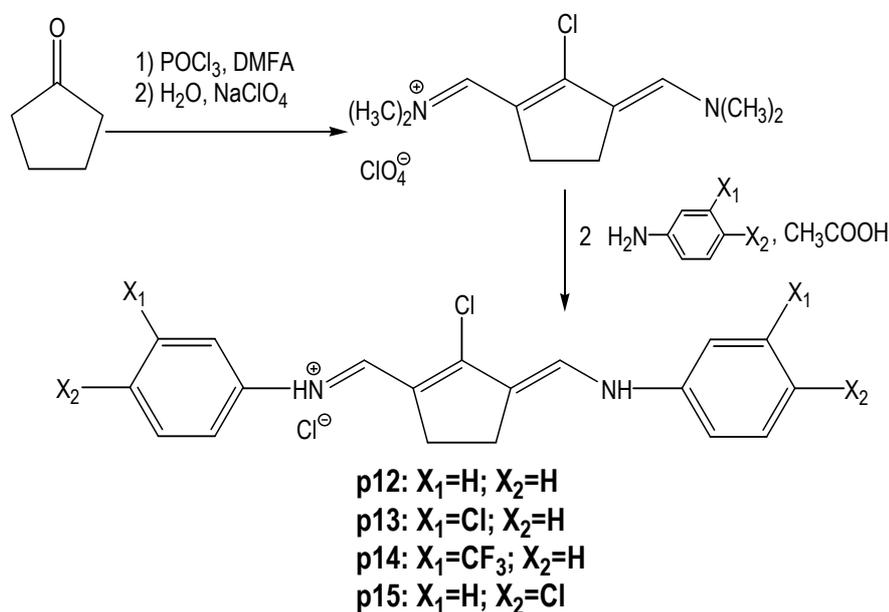


Se disponen 39 ml de N,N-dimetilformamida (DMFA, *Aldrich ACS*, 99.8%) en un matraz esférico de tres bocas provisto de embudo de adición, termómetro y agitador magnético y sobre un baño de acetona y dióxido de carbono a 0 °C. Se añaden lentamente 33 ml (54.28 g, 350 mmol) de cloruro de fosforilo (*Panreac, ps*) a través del embudo de adición. Se prepara una disolución de 7.50 g (76 mmol) de ciclohexanona, (*Merck, ps*) en 15 ml de diclorometano (*Panreac, ps*) y se añade mediante el embudo de adición. Se calienta la mezcla en un baño a 100 °C durante una hora, manteniendo agitación. A continuación, se vuelve a enfriar la mezcla a 0 °C y se añade gota a gota una disolución de 27 ml de anilina (*Panreac, 99.5% ACS*) en 27 ml de etanol a través del embudo de adición, controlando que la reacción no hierva. Seguidamente, se vierte la mezcla de reacción sobre 300 ml de agua destilada a la que se han añadido 30 ml de ácido clorhídrico concentrado y se ha enfriado a 0 °C. La mezcla resultante se deja unas 12 horas en la nevera y los cristales obtenidos se filtran al vacío, se lavan con agua, con éter y finalmente se secan al vacío. La purificación del producto se lleva a cabo disolviéndolo en 100 ml de etanol hirviendo, y añadiendo, posteriormente 1 ml de ácido clorhídrico al 37%. Los cristales se filtran al vacío. Se obtienen 21.60 g (60.5 mmol, 80%) de producto identificado como cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(propano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-ilideno] anilinio, **p11**.

Punto de fusión de **p11**: 225-228 °C (Lit.: 222 °C).

VIS-NIR (metanol): $\lambda=520.5$ nm, $\epsilon=7.6 \times 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹ (Lit.: $\lambda=520$ nm, $\epsilon=7.4 \times 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹).

3.3.1.12. Obtención de cloruro de *N*-[5-anilino-3-cloro-2,4-(etano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-ilideno] anilinio, **p12**, y derivados, **p13**, **p14** y **p15**



Se disponen 39 ml de *N,N*-dimetilformamida (DMFA, *Aldrich ACS*, 99.8%) en un matraz esférico de tres bocas provisto de embudo de adición, termómetro y agitador magnético, y sobre un baño de acetona y dióxido de carbono a 0 °C. Se añaden lentamente 33 ml (54.28 g, 350 mmol) de cloruro de fosforilo (*Panreac*, *ps*) a través del embudo de adición). Se prepara una disolución de 6.38 g (76 mmol) de ciclopentanona, (*Aldrich*) en 15 ml de diclorometano y se añade ésta al matraz mediante el embudo de adición. La mezcla se calienta en un baño a 100 °C durante una hora, manteniendo agitación; se enfría y se añaden 20 ml de una disolución de perclorato sódico (*Sigma-Aldrich*, 98%) en agua 0.1 M. A continuación, se vuelve a enfriar a 0 °C y se añade gota a gota una disolución de 27 ml de anilina (*Panreac*, 99.5% ACS) en 27 ml de etanol a través del embudo de adición, cuidando que la reacción no hierva. Seguidamente, se vierte la mezcla de reacción a 300 ml de agua destilada a la que se han añadido 30 ml de ácido acético concentrado y se ha enfriado a 0 °C. La mezcla resultante se deja unas 12 horas en la nevera y los cristales obtenidos se filtran al vacío, se lavan con agua, con éter y finalmente se secan al vacío. La purificación del producto se lleva a cabo disolviéndolo en 100 ml de etanol hirviendo, y añadiendo, posteriormente 1 ml de ácido clorhídrico al 37%. Los cristales se filtran al vacío. Se obtienen 26.17 g (64 mmol, 84%) y son identificados como *N*-[5-anilino-3-cloro-2,4-(etano-1,3-diil)-2,4-pentadien-1-ilideno] anilinio, **p12**.

En la obtención de **p13**, se siguió el mismo procedimiento que para la síntesis de **p12**, empleando 3-cloroanilina (*Aldrich*, 99%) en vez de anilina; para **p14**, 3-(trifluorometil)anilina

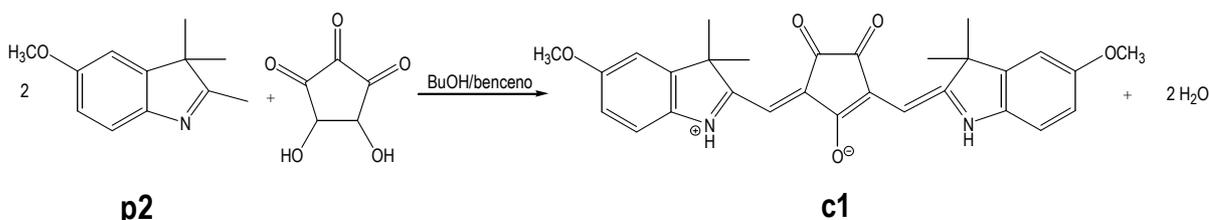
(Aldrich, 99%) y para **p15**, 4-cloroanilina (Aldrich, 98%). Partiendo cada vez de 6.38 g (76 mmol) de ciclopentanona, (Aldrich, 99%) se obtuvieron de cada uno: 29.41 g de **p13** (62 mmol, 81%); 31.06 g de **p14** (57 mmol, 75%) y 28.69 g de **p15** (60 mmol, 79%).

VIS-NIR (etanol): p12: $\lambda = 435.0$ nm, $\epsilon = 5.5 \times 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹; **p13:** $\lambda = 419.5$ nm, $\epsilon = 6.1 \times 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹; **p14:** $\lambda = 416.0$ nm, $\epsilon = 4.9 \times 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹; **p15:** $\lambda = 429.5$ nm, $\epsilon = 6.0 \times 10^4$ l·mol⁻¹·cm⁻¹.

3.3.2. Síntesis de los cromo(fluro)ionóforos

3.3.2.1. Obtención de croconinas

Obtención de 3-[(3,3-dimetil-5-metoxi-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(3,3-dimetil-5-metoxi-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c1** (**3d** en [4])



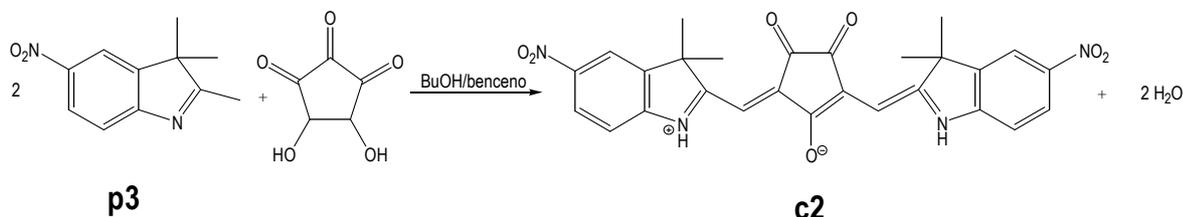
Se disponen 0.19 g (1 mmol) de 2,3,3-trimetil-5-metoxindolenina, **p2**, 0.07 g (0.5 mmol) de ácido crocónico (Aldrich, 98%), 6 ml de benceno (Sigma-Aldrich, 99%), 14 ml de butanol (BuOH, Panreac, 99,5%) y 0.05 g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (Panreac, PS) como catalizador en un matraz esférico, que está sumergido en un baño de silicona, provisto de agitación magnética y acoplado a una trampa Dean-Stark y ésta a un refrigerante de reflujo. Se lleva la mezcla a ebullición y se controla la reacción mediante la realización de espectros UV-vis-NIR en etanol y acidificando con una gota de HCl. El primer control se efectúa al cabo de 10 minutos de que la mezcla hierve y empieza a destilar el azeótropo. Se observa la aparición de un pico mayoritario sobre los 570 nm, correspondiente al producto de monoación, y otro de minoritario a 794 nm, que corresponde al cromo(fluro)ionóforo. La mezcla se deja destilando unas 4 horas, hasta que se observa la desaparición casi completa del pico a 570 nm. Se evapora la mezcla a presión reducida. Se lavan los cristales negros resultantes con unos 10 ml de éter y se recristalizan con metanol. Se obtienen 0.09 g (0.2 mmol, 36%) de producto. Se identifican como 3-[(3,3-dimetil-5-metoxi-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(3,3-dimetil-5-metoxi-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c1**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1.48 (s, 6H: 2 CH_3), 3.80 (s, 3H: OCH_3), 5.88 (s ancho, 1H: CH), 6.93 (dd, $J_{6,7}=8.9$ Hz, $J_{6,4}=2.0$ Hz, 1H: H_6), 7.25 (d, $J_{4,6}=2.0$ Hz, 1H: H_4), 7.44 (d ancho, $J_{7,6}=8.9$ Hz, 1H: H_7). **$^{13}\text{C-RMN}$ (62.5 MHz, DMSO-d_6):** δ 25.53 (CH_3), 50.26 (C), 55.97 (CH_3 , OCH_3), 94.39 (CH), 109.89 (CH, C-Ar), 113.98 (CH, 2 C-Ar), 123.76 (C), 134.76 (C), 142.92 (C), 144.21 (C), 157.89 (C), 159.62 (C), 185.34 (C). **DEPT** registrado (Anexo).

MALDI m/z 541 ($\text{M}^+ + \text{C}_4\text{H}_9$, 100), 542 ($\text{M}^+ + \text{C}_4\text{H}_9 + \text{H}$, 35), 484 (M^+ , 14).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_5$: C, 71.88; H, 5.82; N, 5.78. Experimental: C, 69.44; H, 5.39; N, 5.73.

Obtención de 3-[(3,3-dimetil-5-nitro-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(3,3-dimetil-5-nitro-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c2** (3e en [4])



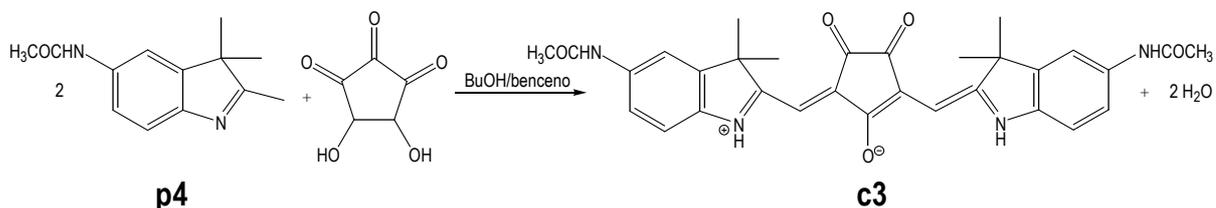
Se sigue la metodología descrita en el apartado anterior para **c1**, partiendo de 0.35 g (1.7 mmol) de 2,3,3-trimetil-5-nitroindolenina, **p3**, 0.13 g (0.9 mmol) de ácido crocónico (Aldrich, 98%), 0.05 g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (Panreac, PS), 8 ml de benceno y 17 ml de butanol. La banda correspondiente al producto de monoación está localizada a 470 nm y la del cromo(fluro)ionóforo a 793 nm. El tiempo de reacción es de 2 horas. Se obtienen 0.32 g (0.6 mmol, 70%) de cristales negros, identificados como 3-[(3,3-dimetil-5-nitro-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(3,3-dimetil-5-nitro-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c2**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1.58 (s, 6H: 2 CH_3), 6.15 (s, 1H: CH), 7.75 (d, $J_{7,6}=8.9$ Hz, 1H: H_7), 8.32 (dd, $J_{6,7}=8.9$ Hz, $J_{6,4}=2.1$ Hz, 1H: H_6), 8.55 (d, $J_{4,6}=2.1$ Hz, 1H: H_4) (Anexo A).

MALDI m/z 627 ($\text{M}^+ + 2 \text{C}_4\text{H}_9 - \text{H}$, 100), 628 ($\text{M}^+ + 2 \text{C}_4\text{H}_9$, 34), 514 (M^+ , 17), 755 (no asignado, 9).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_7$: C, 63.03; H, 4.31; N, 10.89. Experimental: C, 62.80; H, 4.48; N, 10.39.

Obtención de 3-[(5-acetilamino-3,3-dimetil-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(5-acetilamino-3,3-dimetil-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c3** (**3f** en [4])



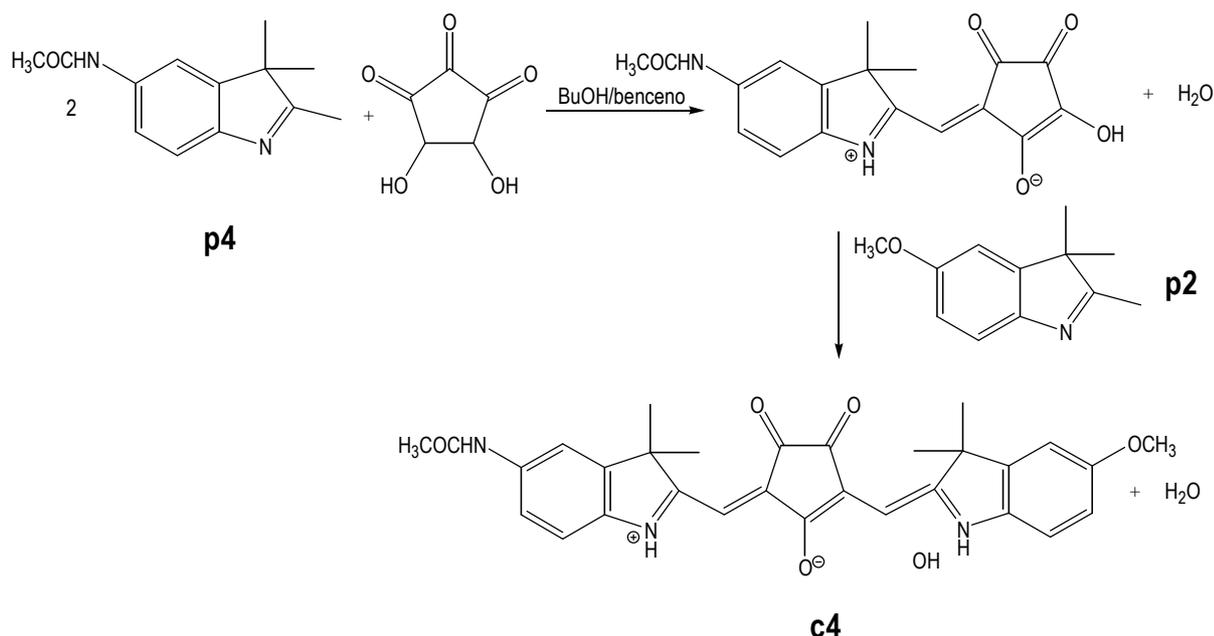
Se sigue la metodología descrita para **c1**, partiendo de 2.60 g (12 mmol) de 5-acetilamino-2,3,3-trimetilindolenina, **p4**, 0.87 g (6 mmol) de ácido crocónico (*Aldrich*, 98%), 0.05 g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (*Panreac*, *PS*), 12 ml de benceno y 28 ml de butanol. La banda correspondiente al producto de monoación está localizada a 580 nm y la del cromo(fluro)ionóforo a 799 nm. El tiempo de reacción es de 45 minutos. En ese momento, la disolución negra resultante se reserva en la nevera durante 2 horas. A continuación, se induce la precipitación del cromo(fluro)ionóforo mediante adición de éter. Se obtienen 1.13 g (2 mmol, 35%) de cristales negros, que se identifican como 3-[(5-acetilamino-3,3-dimetil-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(5-acetilamino-3,3-dimetil-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c3**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1.47 (s, 6H: 2 CH_3), 2.05 (s, 3H: 2 NHCOCH_3), 5.92 (s, 1H: CH), 7.42-7.51 (absorbancia compleja, 2H: H_{arom}), 7.79 (s, 1H: H_{arom}), 10.10 (s, 1H: NHCOCH_3). **DEPT** registrado (Anexo).

MALDI m/z 651 ($\text{M}^+ + 2 \text{C}_4\text{H}_9^- - \text{H}$, 100), 652 ($\text{M}^+ + 2 \text{C}_4\text{H}_9$, 36), 480 (no asignado, 19), 609 (no asignado, 6), 465 (no asignado, 6), 538 (no asignado, 5), 765 (no asignado, 4).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{31}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_5$: C, 69.13; H, 5.61; N, 10.40. Experimental: C, 63.71; H, 5.45; N, 9.39.

Obtención de 3-[(5-acetilamino-3,3-dimetil-2-indoliniliden)metil]-5-[(3,3-dimetil-5-metoxi-2-indolinil)-2-metilen]ciclopentan-1,2,4-triona, **c4**



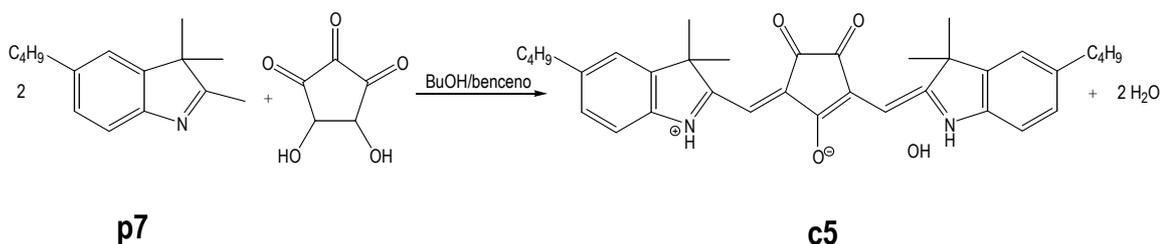
Se sigue la metodología descrita para **c1**, partiendo de 0.22 g (1 mmol) de 5-acetilamino-2,3,3-trimetilindolenina, **p4**, 0.14 g (1 mmol) de ácido crocónico (Aldrich, 98%), 0.05 g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (Panreac, PS), 8 ml de benceno y 17 ml de butanol. Cuando aparece la banda correspondiente al producto de monoación ($\lambda=580$ nm) se adicionan 0.19 g (1 mmol) de 2,3,3-trimetil-5-metoxindolenina, **p2**. La reacción se controla mediante espectrofotometría, considerando que la banda correspondiente al cromo(fluro)ionóforo está localizada a $\lambda=799$ nm. El tiempo de reacción es de 45 minutos. La precipitación del cromo(fluro)ionóforo se induce por adición de éter al crudo de reacción. Se obtienen 0.18 g (0.4 mmol, 35%) de cristales negros, que se identifican como 3-[(5-acetilamino-3,3-dimetil-2-indoliniliden)metil]-5-[(3,3-dimetil-5-metoxi-2-indolinil)-2-metilen]ciclopentan-1,2,4-triona, **c4**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.48 (s, 12H: 4 CH₃), 2.05 (s, 3H: NHCOCH₃), 3.80 (s, 3H: OCH₃), 5.91 (s ancho, 2H: 2 CH), 6.91-6.96 (m, 2H: H_{arom}), 7.24 (s, 2H: H_{arom}), 7.46-7.50 (m, 2H: H_{arom}) (Anexo).

MALDI m/z 597 (M⁺ + 2Na + K, 100), 598 (M⁺ + 2Na + K + H, 46), 624 (no asignado, 16), 625 (no asignado, 10), 439 (no asignado, 6).

Análisis elemental: Calculado para C₃₀H₂₉N₃O₅: C, 70.44; H, 5.71; N, 8.21. Experimental: C, 67.28; H, 5.91; N, 5.80.

Obtención de 3-[(5-butil-3,3-dimetil-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(5-butil-3,3-dimetil-2-indoliniliden) metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c5** (**3b** en [4])



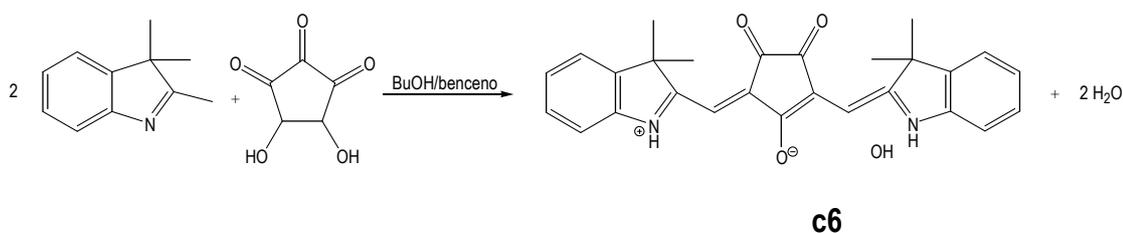
Se sigue la metodología descrita para **c1**, partiendo de 0.21 g (1 mmol) de 5-butil-2,3,3-trimetilindolenina, **p7**, 0.07 g (0.05 mmol) de ácido crocónico (*Aldrich*, 98%), 0.05 g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (*Panreac*, *ps*), 6 ml de benceno y 14 ml de butanol. La banda correspondiente al producto de monoación está localizada en la región del visible y la del cromo(fluro)ionóforo **c5** en $\lambda=775$ nm. El tiempo de reacción es de 10 minutos. La precipitación del cromo(fluro)ionóforo se induce por adición de éter al crudo de reacción. Éste se evapora a presión reducida hasta sequedad y se lavan los cristales con éter de petróleo. Se obtienen 0.17 g (0.3 mmol, 63%) de cristales negros que se identifican como 3-[(5-butil-3,3-dimetil-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(5-butil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c5**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 0.91(t, J=7.3 Hz, 3H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 1.25-1.41 (m, 2H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 1.47 (s, 6H: 2 CH₃), 1.52-1.64 (m, 2H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 2.62 (t, J=7.7 Hz, 2H: CH₂(CH₂)₂CH₃), 5.92 (s, 1H: CH), 7.19 (d, J= 7.5 Hz, 1H: H_{arom}), 7.35-7.40 (absorbancia compleja, 2H: H_{arom}) (Anexo).

MALDI m/z 536 (M⁺, 100), 537 (M⁺ + H, 62).

Análisis elemental: Calculado para C₃₅H₄₀N₂O₃: C, 78.33; H, 7.51; N, 5.22. Experimental: C, 77.99; H, 7.65; N, 5.06.

Obtención de 3-[(3,3-dimetil-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(3,3-dimetil-2-indoliniliden) metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c6** (**3a** en [4])



Se sigue la metodología descrita para **c1**, partiendo de 0.16 g (1 mmol) de 2,3,3-trimetilindolenina (*Aldrich*, 98%), 0.07 g (0.05 mmol) de ácido crocónico (*Aldrich*, 98%), 0.05

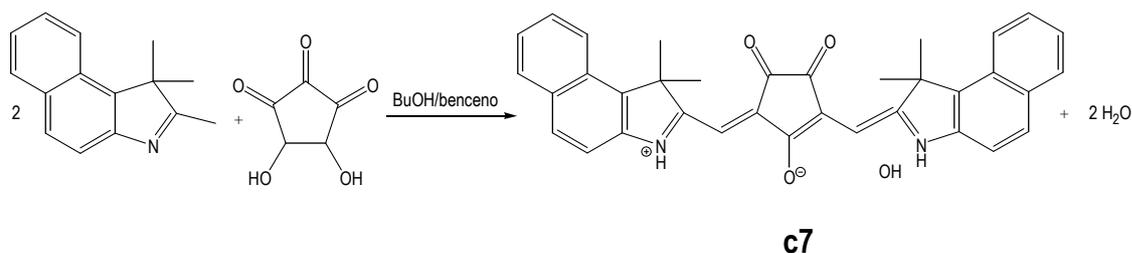
g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (*Panreac, ps*), 6 ml de benceno y 14 ml de butanol. La banda correspondiente al producto de monoación está localizada en la región del visible y la del cromo(fluro)ionóforo **c6** en $\lambda=759$ nm. El tiempo de reacción es de 1 hora. La precipitación del cromo(fluro)ionóforo se induce por adición de éter al crudo de reacción. Se obtienen 0.16 g (0.4 mmol, 75%) de cristales negros; se identifican como 3-[(3,3-dimetil-2-indolinil)-2-metilen]-5-[(3,3-dimetil-2-indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c6**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.50 (s, 6H: 2 CH₃), 5.97 (s, 1H: CH), 7.21-7.56 (absorbancia compleja, 4H: H_{arom}). **$^{13}\text{C-RMN}$ (62.5 MHz, DMSO- d_6):** δ 25.51 (CH₃), 50.11 (C), 93.21 (CH), 113.57 (CH, C-Ar), 123.21 (CH, C-Ar), 125.13 (CH, C-Ar), 128.75 (CH, C-Ar), 140.83 (C), 141.02 (C), 145.27 (C), 145.66 (C), 176.34 (C), 184.93 (C). **DEPT** registrado (Anexo).

MALDI m/z 424 (M⁺, 100), 447 (M⁺ + Na, 99), 463 (no asignado, 88), 448 (M⁺ + Na + H, 75), 425 (M⁺ + H, 67), 280 (no asignado, 67), 296 (no asignado, 66), 537 (no asignado, 32), 351 (no asignado, 26).

Análisis elemental: Calculado para C₂₇H₂₄N₂O₃: C, 76.40; H, 5.70; N, 6.60. Experimental: C, 74.90; H, 5.70; N, 6.30.

*Obtención de 3-[(1,1,2-trimetil-1H-benz[e]indolinil)-2-metilen]-5-[(1,1,2-trimetil-1H-benz[e]indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c7** (**3c** en [4])*



Se sigue la metodología descrita para **c1**, partiendo de 0.21 g (1 mmol) de 1,1,2-trimetil-1H-benz[e]indol (*ACROS*, 96%), 0.07 g (0.05 mmol) de ácido crocónico (*Aldrich*, 98%), 0.05 g (0.3 mmol) de ácido 4-toluensulfónico 1-hidrato (*Panreac, PS*), 6 ml de benceno y 14 ml de butanol. La banda correspondiente al producto de monoación está localizada en la región del visible y la del cromo(fluro)ionóforo **c7** en $\lambda=802$ nm. El tiempo de reacción es de 1 hora. Se obtienen 0.17 g (0.3 mmol, 65%) de cristales negros; se

identifican como 3-[(1,1,2-trimetil-1H-benz[e]indolinil)-2-metilen]-5-[(1,1,2-trimetil-1H-benz[e]indoliniliden)metil]ciclopentan-1,2,4-triona, **c7**.

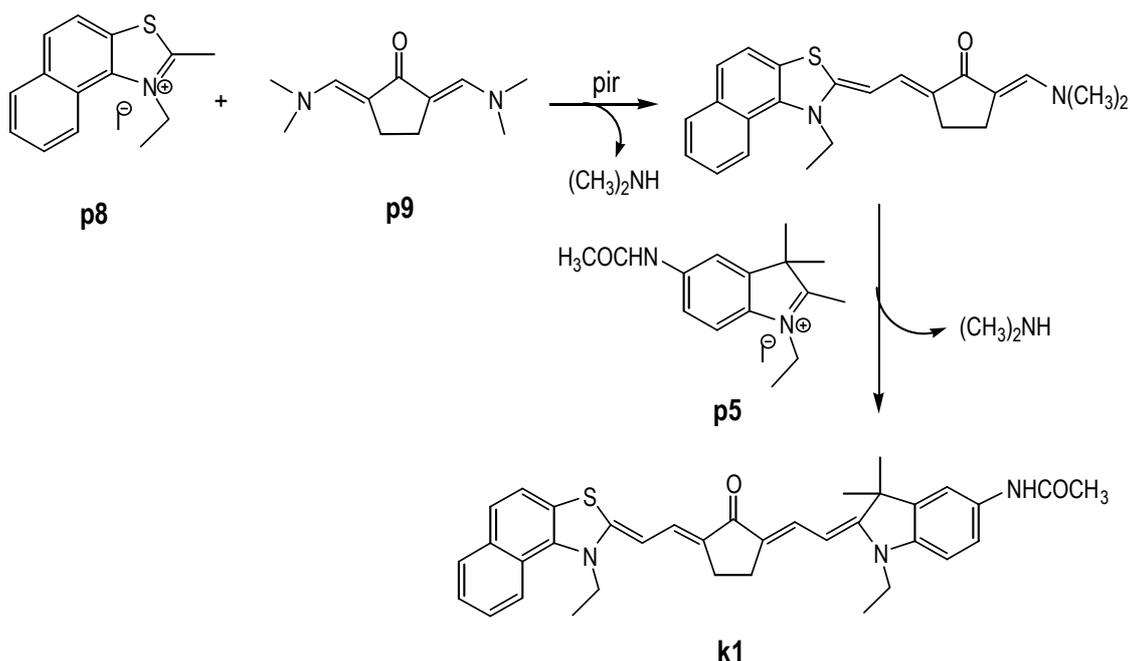
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.50 (s, 6H: 2 CH₃), 5.97 (s, 1H: CH), 7.21-7.59 (absorbancia compleja, 6H: H_{arom}) (Anexo).

MALDI m/z 637 (M⁺ + 2C₄H₉, 100), 195 (C₁₄H₁₃N, 86), 638 (M⁺ + 2C₄H₉ - H, 44), 851 (no asignado, 28).

Análisis elemental: Calculado para C₃₅H₂₈N₂O₃: C, 80.13; H, 5.38; N, 5.34. Experimental: C, 75.53; H, 5.38; N, 4.31.

3.3.2.2. Obtención de cetocianinas

Obtención de 2-[(5-acetilamino-1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]-5-[(1-etilnafto [1,2-d] tiazolin-2-iliden)etiliden]ciclopentanona, **k1**



En un matraz esférico provisto de agitación magnética, refrigerante de reflujo y baño de silicona, se disponen 0.36 g (1 mmol) de yoduro de 3-etil-2-metilnafto[1,2-d]tiazolio, **p8**, 0.19 g (1 mmol) de 2,5-bis(dimetilaminometil)ciclopentanona, **p9**, y 10 ml de piridina (*Sigma-Aldrich*, 99%). La mezcla se refluje durante 3 horas y la reacción se sigue mediante espectrofotometría de UV-vis-NIR. Cuando aparece el pico en la región del visible correspondiente al producto de monoación, se añaden 0.37 g (1 mmol) de yoduro de 5-

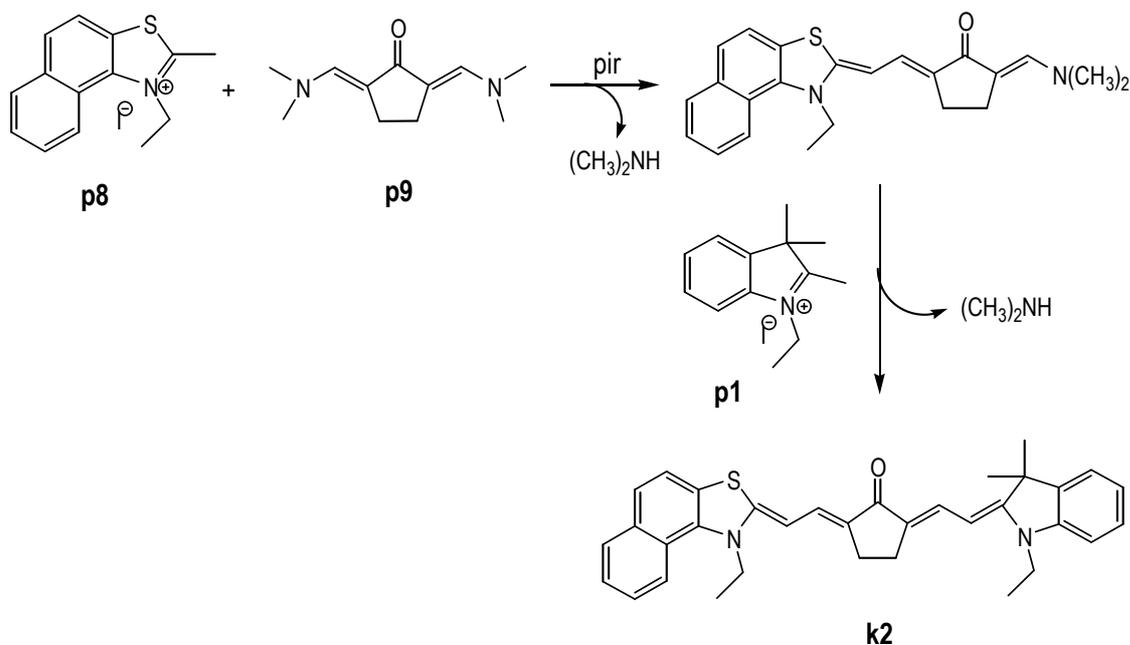
acetilamino-1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p5**. Se observa la desaparición de un pico en la región del visible y la formación de un pico en la región NIR, alrededor de los 750 nm. Se evapora la mezcla a presión reducida hasta sequedad. Para separar el posible cromo(fluro)ionóforo simétrico de la mezcla, se añaden unos 30 ml de metanol y, mientras se agita, se lleva a ebullición. Finalmente, se filtran los cristales en caliente. Se obtienen 0.14 g (0.2 mmol, 24%) de cristales negros, 2-[(5-acetilamino-1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]-5-[(1-etilnafto [1,2-d] tiazolin-2-iliden)etiliden]ciclopentanona, **k1**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.16 (t, J=6.8 Hz, 3H: CH₃), 1.53/1.58 (s/t, J=7.0 Hz, 9H: 2 CH₃/CH₃), 2.01 (s, 3H: NHCOCH₃), 2.67 (s, 4H: 2 CH₂), 3.77 (m, 2H: CH₂), 4.43 (m, 2H: CH₂), 5.34 (d, J=13.3 Hz, 1H: CH), 5.63 (d, J=12.4 Hz, 1H: CH), 6.28-8.33 (absorbancia compleja, 10H: H_{arom} y CH), 7.02 (d, J=12.4 Hz, 1H: CH), 9.81 (s, 1H: NHCOCH₃) (Anexo).

MALDI m/z 575 (M⁺, 100), 576 (M⁺ + H, 61), 592 (no asignado, 25), 591 (no asignado, 14).

Análisis elemental: Calculado para C₃₆H₃₇SN₃O₂: C, 75.10; H, 6.48; S, 5.57; N, 7.30. Experimental: C, 71.48; H, 6.00; S, 5.27; N, 6.44.

*Obtención de 2-[(1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]-5-[(1-etilnafto[1,2-d]tiazolin-2-iliden)etiliden]ciclopentanona, **k2** (5ha en [5])*



Se sigue la síntesis descrita en **k1** hasta obtener el producto de monoación (intermedio con pico en la región del visible). A continuación, se añaden a la mezcla 0.32 g

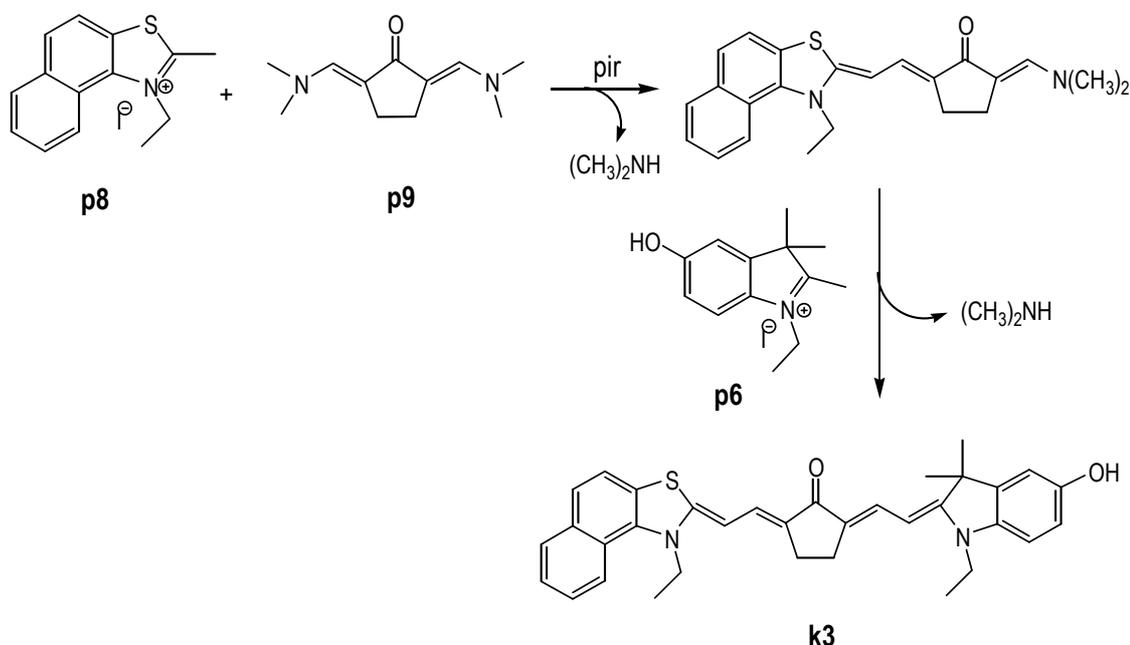
(1 mmol) de yoduro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1**. Se observa la desaparición del pico en la región del visible y la formación de un pico en la región del NIR, alrededor de 740 nm. Se evapora la mezcla a presión reducida hasta sequedad. Para separar el posible cromofluoróforo simétrico de la mezcla, se añaden unos 30 ml de metanol y, mientras se agita, se lleva a ebullición. Finalmente, se filtran los cristales en caliente. Se obtienen 0.11 g (0.2 mmol, 22%) de cristales negros, 2-[(1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]-5-[(1-etilnafto[1,2-d]tiazolin-2-iliden)etiliden]ciclopentanona, **k2**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.17 (t, J=7.0 Hz, 3H: CH₃), 1.55/1.58 (s/t, J=7.4 Hz, 9H: 2 CH₃/CH₃), 2.68 (s, 4H: 2 CH₂), 3.80 (m, 2H: CH₂), 4.43 (m, 2H: CH₂), 5.38 (d, J=13.0 Hz, 1H: CH), 5.64 (d, J=12.4 Hz, 1H: CH), 6.87-8.31 (absorbancia compleja, 10H: H_{arom}), 7.05 (d, J=12.4 Hz, 1H: CH), 7.45 (d, J=13.0 Hz, 1H:CH) (Anexo).

MALDI m/z 518 (M⁺, 100), 519 (M⁺ + H, 51), 520 (no asignado, 20), 516 (no asignado, 20), 517 (no asignado, 18).

Análisis elemental: Calculado para C₃₄H₃₄SN₂O: C, 78.73; H, 6.61; S, 6.18; N, 5.40. Experimental: C, 68.30; H, 5.91; S, 5.28; N, 4.40.

Obtención de 2-[(1-etil-5-hidroxi-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]-5-[(1-etilnafto[1,2-d]tiazolin-2-iliden)etiliden]ciclopentanona, **k3** (**5hb** en [5])



Se sigue la síntesis descrita en **k1** hasta obtener el producto de monoación (intermedio con pico en la región del visible). A continuación se añaden a la mezcla 0.33 g (1 mmol) de yoduro de 1-etil-5-hidroxi-2,3,3-trimetilindolenio, **p6**. Se observa la desaparición

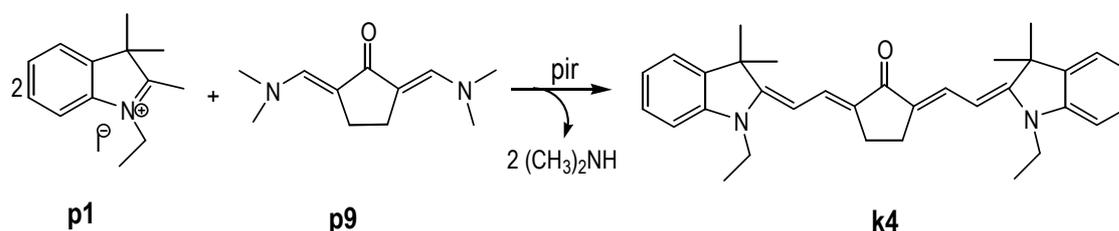
del pico en la región del visible y la formación de un pico en la región del NIR, alrededor de 760 nm. Se evapora la mezcla a presión reducida hasta sequedad. Para separar el posible cromo(fluro)ionóforo simétrico de la mezcla, se añaden unos 30 ml de metanol y, mientras se agita, se lleva a ebullición. Finalmente, en caliente, se filtran los cristales. Se obtienen 0.20 g (0.4 mmol, 36%) de cristales verdosos de 2-[(1-etil-5-hidroxi-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]-5-[(1-etilnafto[1,2-d]tiazolin-2-iliden)etiliden]ciclopentanona, **k3**.

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.14 (t, J=7.0 Hz, 3H: CH₃), 1.52/1.58 (s/t, J=7.0 Hz, 9H: 2 CH₃/CH₃), 2.65 (s, 4H: 2 CH₂), 3.73 (q, J=7.1 Hz, 2H: CH₂), 4.41 (q, J=7.0 Hz, 2H: CH₂), 5.27 (d, J=12.9 Hz, 1H: CH), 5.62 (d, J=12.2 Hz, 1H: CH), 6.59-8.30 (absorbancia compleja, 10H: 9H_{arom} y CH), 7.00 (d, J=12.2 Hz, 1H: CH), 9.03 (s, 1H: OH). **¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆):** δ 11.05 (CH₃), 13.52 (2CH₃), 23.89 (CH₂), 24.37 (CH₂), 28.27 (CH₃), 36.79 (C), 38.85 (CH₂), 46.54 (CH₂), 89.46 (CH), 91.92 (CH), 107.77 (CH), 110.23 (CH), 113.96 (CH), 119.88 (CH), 120.45 (CH), 120.78 (CH), 121.29 (CH), 123.44 (C), 126.99 (C), 127.83 (CH), 128.25 (CH), 129.83 (CH), 130.58 (CH), 131.15 (C), 133.53 (C), 135.80 (C), 136.94 (C), 140.50 (C), 141.25 (C), 152.64 (C), 154.99 (C), 161.97 (C), 176.75 (C). **DEPT** registrado (Anexo).

MALDI m/z 534 (M⁺, 100), 535 (M⁺ + H, 85), 537 (no asignado, 30), 532 (no asignado, 21), 533 (no asignado, 17), 510 (no asignado, 8), 558 (no asignado, 7).

Análisis elemental: Calculado para C₃₄H₃₄SN₂O₂: C, 76.37; H, 6.41; S, 6.00; N, 5.24. Experimental: C, 70.91; H, 5.34; S, 5.89; N, 4.35.

*Obtención de 2,5-bis[(1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]ciclopentanona, **k4** (5aa en [6])*



En un matraz esférico provisto de refrigerante de reflujo y agitación magnética, se añaden 0.63 g (2 mmol) de yoduro de 1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p1**, 0.19 g (1 mmol) de 2,5-bis(dimetilaminometil)en-2-one, **p9**, y 10 ml de piridina. La mezcla se refluje durante 1 hora. El seguimiento de la reacción se hace mediante espectrofotometría de UV-vis-NIR. A medida que la reacción avanza, se observa la desaparición del pico

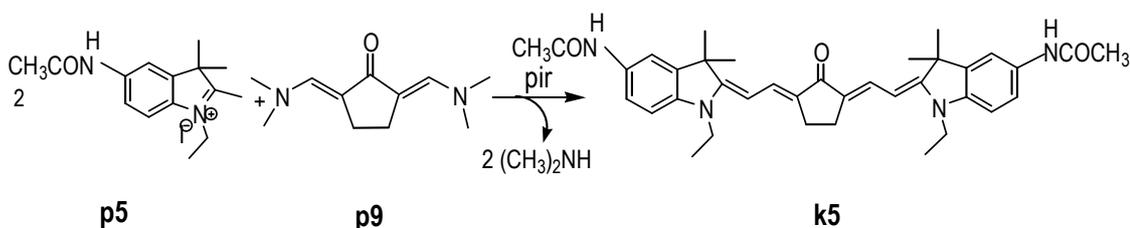
correspondiente a **p9** ($\lambda_{\text{máx}}=433$ nm) y la aparición de un pico en la región NIR, sobre los 720 nm. Se deja enfriar la mezcla a temperatura ambiente y se añaden 100 ml de agua. El sólido obtenido se filtra y se recristaliza con metanol. Se obtienen 0.35 g (0.73 mmol, 73%) de cristales negros identificados como 2,5-bis[(1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]ciclopentanona, **k4**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.19 (t, $J=6.9$ Hz, 3H: CH_3), 1.56 (s, 6H: 2 CH_3), 2.66 (s, 2H: CH_2), 3.77 (q, $J=6.9$ Hz, 2H: CH_2), 5.35 (d, $J=13.1$ Hz, 1H: CH), 6.81-6.90 (absorbancia compleja, 2H: H_{arom}), 7.14-7.26 (absorbancia compleja, 2H: H_{arom}), 7.50 (d, $J=13.1$ Hz, 1H: CH). **$^{13}\text{C-RMN}$ (62.5 MHz, DMSO- d_6):** δ 11.09 (CH_3), 23.27 (CH_2), 28.24 (2 CH_3), 36.67 (CH_2), 42.13 (C), 46.16 (C), 92.94 (CH), 107.34 (CH), 120.75 (CH, C-Ar), 122.02 (CH, C-Ar), 127.54 (CH, C-Ar), 128.09 (CH, C-Ar), 131.83 (C), 139.11 (C), 143.49 (C), 161.45 (C). **DEPT** registrado (Anexo).

MALDI m/z 478 (M^+ , 100), 479 ($\text{M}^+ + \text{H}$, 57), 476 (no asignado, 23), 477 (no asignado, 23), 174, (no asignado, 7), 173 (no asignado, 7).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}$: C, 82.80; H, 8.00; N, 5.85. Experimental: C, 82.21; H, 7.92; N, 5.80.

*Obtención de 2,5-bis[(5-acetilamino-1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden]ciclopentanona, **k5** (5cc en [6])*



Se sigue la metodología descrita en el apartado anterior para **k4**, partiendo de 0.74 g (2 mmol) de yoduro de 5-acetilamino-1-etil-2,3,3-trimetilindolenio, **p5**, 0.19 g (1 mmol) de 2,5-bis(dimetilaminometil)en)ciclopentanona, **p9** y 10 ml de piridina. El tiempo de reacción es de 1 hora. El pico de absorbancia correspondiente al cromo(fluro)ionóforo está alrededor de 740 nm. Se obtienen 0.43 g (0.72 mmol, 75%) de cristales rojizos, identificados como 2,5-bis[(5-acetilamino-1-etil-3,3-dimetil-2-indoliniliden)etiliden] ciclopentanona, **k5**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.16 (t, $J=7.0$ Hz, 3H: CH_3), 1.53 (s, 6H: 2 CH_3), 2.01 (s, 3H: NHCOCH_3), 2.64 (s, 2H: CH_2), 3.77 (q, $J=7.0$ Hz, 2H: CH_2), 5.35 (d, $J=13.1$ Hz, 1H: CH), 6.84 (d, $J_{7,6}=8.5$ Hz, 1H: H $_7$), 7.33 (dd, $J_{6,7}=8.5$ Hz, $J_{6,4}=1.8$ Hz, 1H: H $_6$), 7.45 (d, $J=13.1$

Hz, 1H: CH), 7.53 (d, $J_{4,6}=1.8$ Hz, 1H: H₄), 9.82 (s, 1H: NHCOCH₃). **DEPT** registrado (Anexo).

MALDI m/z 591 ($M^+ - H$, 100), 592 (M^+ , 46), 615 (no asignado, 42), 679 (no asignado, 21), 231 (no asignado, 14).

Análisis elemental: Calculado para C₃₇H₄₄N₄O₃: C, 74.97; H, 7.48; N, 9.45. Experimental: C, 69.27; H, 7.92; N, 8.66.

3.3.2.3. *Obtención de cianinas-anilinas: ca1, ca2, ca3, ca4, ca5, ca6, ca7 y ca8 [3,7] (3aA, 3bA, 3cA, 3bC, 3eB, 3bB, 3bD y 3bE respectivamente en [8])*

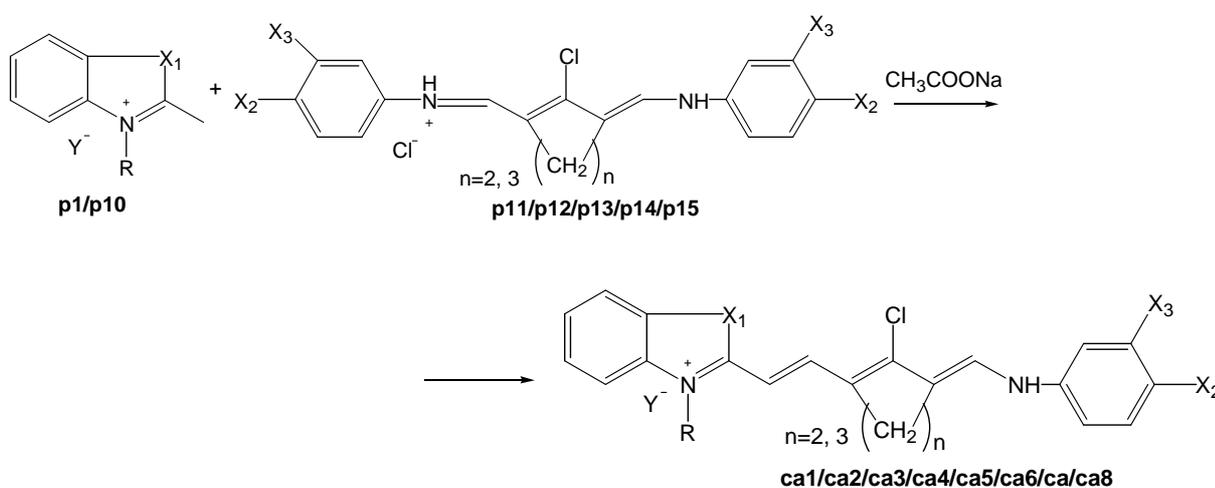


Tabla 1. Estructura química de los cromo(fluro)ionóforos cianina-anilina sintetizados

colorante	X ₁	X ₂	X ₃	Y ⁻	R
	n=3				
ca1	S	H	H	*	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻
ca2	S	H	H	I	CH ₂ CH ₃
ca3	C(CH ₃) ₂	H	H	Br	CH ₂ CH ₃
	n=2				
ca4	S	H	Cl	Br	CH ₂ CH ₃
ca5	C(CH ₃) ₂	H	H	ClO ₄	CH ₂ CH ₃
ca6	S	H	H	Br	CH ₂ CH ₃
ca7	S	H	CF ₃	Br	CH ₂ CH ₃
ca8	S	Cl	H	Br	CH ₂ CH ₃

*sin contraión

En un matraz esférico provisto de agitación magnética y de refrigerante de reflujo, sumergido en un baño de silicona, se disponen 2 mmol de la correspondiente sal del heterociclo cuaternizado (p10 para la obtención de ca1; yoduro de 3-etil-2-metilbenzotiazolio (Aldrich) para la obtención de ca2, ca4, ca6, ca7 y ca8; y p1 para la obtención de ca3 y

ca5) con 2 mmol de la sal pentametánica (**p11** para la obtención de **ca1**, **ca2** y **ca3**; **p12** para la obtención de **ca5** y **ca6**; **p13** para la obtención de **ca4**; **p14** para la obtención de **ca7** y **p15** para la obtención de **ca8**) y 200 mg de acetato sódico anhidro en 30 ml de etanol absoluto. Se calienta la mezcla durante 10 minutos y posteriormente se enfría y mantiene a -10 °C durante un día. Los cristales obtenidos se filtran y se lavan con éter. Se recrystalizan con metanol. En el caso de **ca3**, **ca4**, **ca6**, **ca7** y **ca8** los cristales se disuelven en 20 ml de etanol y se basifica la disolución añadiendo unas gotas de trietilamina. Esta reacción se sigue por espectrofotometría UV-vis. El disolvente se evapora a presión reducida y el crudo de reacción se extrae con éter (3x25 ml). El cromo(fluro)ionóforo simétrico se filtra y el éter se evapora a presión reducida. El crudo de reacción se disuelve en 30 ml de metanol y se añaden unas gotas de ácido bromhídrico, hasta que la mezcla es de color azul intenso. La disolución resultante se diluye con éter (1:5) y se enfría y mantiene durante 12 horas a -10 °C. Los cristales se filtran y se recrystalizan con metanol.

Identificación de los cromo(fluro)ionóforos:

- a) 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(propano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3-(4-sulfonatobutil)-benzotiazolio, **ca1**: 628 mg (1.2 mmol, 61%)

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.74-1.95 (m, 8H: ⁺NCH₂CH₂CH₂CH₂SO₃⁻, CCH₂CH₂CH₂C), 2.65 (t, J=5.5 Hz, 2H: CCH₂CH₂CH₂C), 2.73 (t, J 5.8 Hz, 2H: CCH₂CH₂CH₂C), 4.75 (t, J=7.4 Hz, 2H: ⁺NCH₂CH₂CH₂CH₂SO₃⁻), 7.01-7.11 (m, 2H: ⁺N=C(S)CHCHC, NHC₆H₅), 7.29-7.40 (m, 4H: NHC₆H₅), 7.64 (t, J=8.0 Hz, 1H: SCCHCHCHCHCN⁺), 7.75 (t, J=8.0 Hz, 1 H: SCCHCHCHCHCHCN⁺), 7.92 (d, J=13.0 Hz, 1H, ⁺N=C(S)CHCHC), 8.14-8.24 (m, 3H: SCCHCHCHCHCHCN⁺, CHNHPH), 9.60 (d, J=13.3 Hz, 1H: NHPH) (Anexo).

FABMS m/z 515.0 (M⁺, 100), 517.1 (32).

Análisis elemental: Calculado para C₂₆H₂₇ClN₂O₃S₂: C, 60.6; H, 5.3; N, 5.4; S, 12.45. Experimental: C, 59.0; H, 5.2; N, 5.3; S, 12.1.

- b) Yoduro de 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(propano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3-etilbenzotiazolio, **ca2**: 556 mg (1.0 mmol, 52%).

¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆): δ 1.40 (t, J=7.1 Hz, 3H: ⁺NCH₂CH₃), 1.86 (quinteto, 2H: CCH₂CH₂CH₂C), 2.66 (t, J= 6.5 Hz, 2H: CCH₂CH₂CH₂C), 2.71 (t, J=6.5 Hz, 2H: CCH₂CH₂CH₂C), 4.77 (q, J=7.0 Hz, 2H: ⁺NCH₂CH₃), 6.99 (d, J=12.8 Hz, 1H:

$^1\text{H-NMR}$ ($^1\text{N}=\text{C}(\text{S})\text{CHCHC}$), 7.07 (t, $J=7.5$ Hz, 1H: NHC_6H_5), 7.30-7.41 (m, 4H: NHC_6H_5), 7.65 (t, $J=7.5$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCN^+), 7.77 (t, $J=7.5$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCHCN^+), 7.94 (d, $J=12.8$ Hz, 1H: $^1\text{N}=\text{C}(\text{S})\text{CHCHC}$), 8.11 (d, $J=8.5$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCHCN^+), 8.21 (d, $J=7.3$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCHCN^+), 8.25 (s, 1H: CHNHPH), 9.63 (d, $J=12.5$ Hz, 1H: NHPh) (Anexo).

FABMS m/z 407.0 ($\text{M}^+ - \text{H}$, 100), 409.0 (33).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{ClIN}_2\text{S}$: C, 53.9; H, 4.5; N, 5.2; S, 6.0. Experimental: C, 53.35; H, 4.4; N, 5.15; S, 5.8.

c) Bromuro de 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(propano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-1-etil-3,3-dimetilindolenio, **ca3**: 267 mg (0.49 mmol, 32%).

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1.37 (t, $J=7.3$ Hz, 3H: $^1\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 1.71 (s, 6H: CMe_2), 1.88 (quinteto, $J=5.8$ Hz, 2H: $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 2.72 (m, 4H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 4.41 (q, $J=7.0$ Hz, 2H: $^1\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 6.54 (d, $J=15.0$ Hz, 1H: $^1\text{N}=\text{C}(\text{Me})_2\text{CHCHC}$), 7.18 (t, $J=6.3$ Hz, 1H, NHC_6H_5), 7.43 (t, $J=5.0$ Hz, 1H: $(\text{Me})_2\text{CCHCHCHCHCN}^+$), 7.45 (m, 4H: NHC_6H_5), 7.53 (t, $J=7.8$ Hz, 1H: $(\text{Me})_2\text{CCHCHCHCHCHCN}^+$), 7.64 (d, $J=7.5$ Hz, 1H: $(\text{Me})_2\text{CCHCHCHCHCHCN}^+$), 7.74 (d, $J=7.0$ Hz, 1H: $(\text{Me})_2\text{CCHCHCHCHCHCN}^+$), 8.23 (s, 1H: CHNHPH), 8.43 (d, $J=15.0$ Hz, 1H, $^1\text{N}=\text{C}(\text{Me})_2\text{CHCHC}$), 10.27 (s ancho, NHPh) (Anexo).

FABMS m/z 417.1 ($\text{M}^+ - \text{H}$, 100), 419.1 (30).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{BrN}_2\text{Cl}$: C, 59.5; H, 5.55; N, 5.1. Experimental: C, 63.1; H, 6.0; N, 5.5.

d) Bromuro de 2-[4'-cloro-6'-N-(3''-cloroanilino)-3',5'-(etano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3-etilbenzotiazolio, **ca4**: 319 mg (0.63 mmol, 31%).

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6): δ 1.41 (t, $J=7.3$ Hz, 3H: $^1\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 2.89 (t, $J=8.3$ Hz, 2H: $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 2.95 (t, $J=8.7$ Hz, 2H: $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 4.79 (q, $J=7.3$ Hz, 2H: $^1\text{NCH}_2\text{CH}_3$), 6.89 (d, $J=15.0$ Hz, 1H: $^1\text{N}=\text{C}(\text{S})\text{CHCHC}$), 7.00 (d, $J=8.3$ Hz, 1H: $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 7.15 (d, $J=3.3$ Hz, 1H: $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 7.31 (d, $J=7.8$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCHCN^+), 7.38 (s, 1H: $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 7.51 (t, $J=7.8$ Hz, 1H: $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 7.67 (t, $J=8.0$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCHCN^+), 7.70 (t, $J=8.0$ Hz, 1H: $\text{SCCHCHCHCHCHCHCN}^+$), 7.86 (d, $J=15.0$ Hz, 1H: $^1\text{N}=\text{C}(\text{S})\text{CHCHC}$), 8.13 (d, $J=8.5$ Hz, 1H: $\text{CHNHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 8.27 (d, $J=8.0$ Hz, 1H: SCCHCHCHCHCHCN), 9.45 (d, $J=12.5$ Hz, 1H: $\text{NHC}_6\text{H}_4\text{Cl}$) (Anexo).

FABMS m/z 427.0 ($\text{M}^+ - \text{H}$, 100), 429.0 (35), 431.0 (10).

Análisis elemental: Calculado para $C_{23}H_{21}Cl_2BrN_2S$: C, 54.35; H, 4.2; N, 5.5; S, 6.3. Experimental: C, 49.1; H, 3.75; N, 4.9; S, 5.3.

- e) Perclorato de 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(etano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-1-etil-3,3-dimetilindolenio, **ca5**: 840 mg (1.7 mmol, 60%).

1H -RMN (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.45 (t, J=7.4 Hz, 3H: $^+NCH_2CH_3$), 1.69 (s, 6 H: CMe₂), 2.97 (m, 4H: CCH₂CH₂C), 4.50 (q, J=7.4 Hz, 2H: $^+NCH_2CH_3$), 6.30 (d, J=14.5 Hz, 1H: $^+N=C(Me)_2CHCHC$), 7.16 (t, J=6.8 Hz, 1H: NHC₆H₅), 7.39-7.45 (m, 2H: Me₂CCHCHCHCHCN⁺), 7.62-7.65 (m, 4H: NHC₆H₅), 7.83-7.86 (m, 2H: $^+N=C(Me)_2CHCHC$, Me₂CCHCHCHCHCN⁺), 7.95-7.99 (m, 2H: CHNHPH, Me₂CCHCHCHCHCN⁺), 10.38 (s ancho, 1 H: NHPh) (Anexo).

FABMS m/z 403.1 (M⁺ - H, 100), 405.1 (33).

Análisis elemental: Calculado para $C_{28}H_{28}Cl_2N_2O_4$: C, 68.65; H, 8.1; N, 4.0. Experimental: C, 57.1; H, 6.0; N, 5.0.

- f) Bromuro de 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(etano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3-etilbenzotiazolio, **ca6**: 410 mg (1.0 mmol, 43%).

1H -RMN (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.39 (t, J=7.5 Hz, 3H: $^+NCH_2CH_3$), 2.90 (t, J=8.5 Hz, 2H: CCH₂CH₂C), 2.96 (t, J=8.5 Hz, 2H: CCH₂CH₂C), 4.73 (q, J=7.5 Hz, 2H: $^+NCH_2CH_3$), 6.80 (d, J=15.0 Hz, 1H: $^+N=C(S)CHCHC$), 7.04 (t, J=7.1 Hz, 1H: NHC₆H₅), 7.30-7.39 (m, 4H: NHC₆H₅), 7.61-7.68 (m, 2H: SCCHCHCHCHCN⁺), 7.73-7.76 (m, 1H: $^+N=C(S)CHCHC$), 7.80 (d, J=3.3 Hz, 1H: CHNHPH), 8.08 (d, J=8.0 Hz, 1H: SCCHCHCHCHCN⁺), 8.22 (d, J=7.3 Hz, 1H: SCCHCHCHCHCN⁺), 9.61 (d, J=12.4 Hz, 1H: NHPh) (Anexo).

FABMS m/z 392.9 (M⁺ - H, 100), 395.0 (33).

Análisis elemental: Calculado para $C_{23}H_{22}Cl_2BrN_2S$: C, 58.3; H, 4.7; N, 5.9; S, 6. Experimental: C, 51.8; H, 4.1; N, 5.1; S, 5.8.

- g) Bromuro de 2-[4'-cloro-6'-N-(3'''-trifluorometil-anilino)-3',5'-(etano-1'',2''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3-etilbenzotiazolio, **ca7**: 499 mg (0.92 mmol, 46%).

1H -RMN (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.42 (t, J=7.1 Hz, 3H: $^+NCH_2CH_3$), 2.90 (t, J=7.0 Hz, 2H: CCH₂CH₂C), 2.96 (t, J=7.0 Hz, 2H: CCH₂CH₂C), 4.78 (q, J=7.1 Hz, 2H: $^+NCH_2CH_3$), 6.92 (d, J=14.8 Hz, 1H: $^+N=C(S)CHCHC$), 7.29 (d, J=7.0 Hz, 1H: NHC₆H₄CF₃), 7.50-7.84 (m, 7H:

$^+N=C(S)CHCHC$, $CHNHC_6H_4CF_3$, $NHC_6H_4CF_3$, $SCCHCHCHCHCN^+$, 8.14 (d, J=8.5 Hz, 1H: $SCCHCHCHCHCN^+$), 8.27 (d, J=8.3 Hz, 1H: $SCCHCHCHCHCN^+$), 9.51 (d, J=12.3 Hz, 1H: $NHC_6H_4CF_3$) (Anexo).

FABMS m/z 461.0 ($M^+ - H$, 100), 463.0 (33).

Análisis elemental: Calculado para $C_{24}H_{21}F_3ClBrN_2S$: C, 53.2; H, 3.9; N, 5.2; S, 5.9. Experimental: C, 46.5; H, 3.4; N, 4.5; S, 4.9.

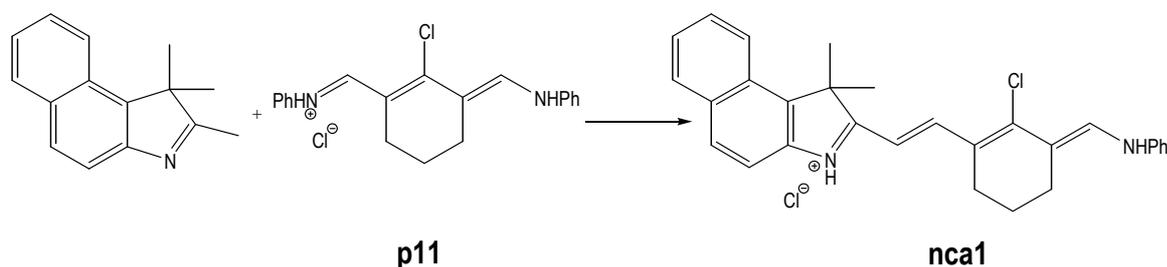
h) Bromuro de 2-[4'-cloro-6'-N-(4'''-cloroanilino)-3',5'-(etano-1'',2''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3-etilbenzotiazolio, **ca8**: 457 mg (0.90 mmol, 45%).

1H -RMN (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.39 (t, J=7.0 Hz, 3H: $^+NCH_2CH_3$), 2.83 (t, J=6.0 Hz, 2H: CCH_2CH_2C), 2.92 (t, J=6.0 Hz, 2H: CCH_2CH_2C), 4.70 (q, J=7.0 Hz, 2H: $^+NCH_2CH_3$), 6.75 (d, J=15.0 Hz, 1H: $^+N=C(S)CHCHC$), 7.24 (d, J=9.0 Hz, 2H: NHC_6H_4Cl), 7.28 (d, J=9.0 Hz, 2H: NHC_6H_4Cl), 7.47 (d, J=11.5 Hz, 1H: $CHNHC_6H_4Cl$), 7.61 (t, J=7.5 Hz, 1H: $SCCHCHCHCHCN^+$), 7.67 (d, J=15.0 Hz, 1H: $^+N=C(S)CHCHC$), 7.71 (t, J=8.0 Hz, 1H: $SCCHCHCHCHCN^+$), 8.05 (d, J=8.0 Hz, 1H: $SCCHCHCHCHCN^+$), 8.20 (d, J=8.0 Hz, 1H: $SCCHCHCHCHCN^+$), 9.49 (d, J=11.5 Hz, 1H: NHC_6H_4Cl) (Anexo).

FABMS m/z 427.0 ($M^+ - H$, 100), 429.0 (35), 431.0 (10).

Análisis elemental: Calculado para $C_{23}H_{21}Cl_2BrN_2S$: C, 54.35; H, 4.2; N, 5.5; S, 6.3. Experimental: C, 51.9; H, 4.0; N, 5.2; S, 6.0.

3.3.2.4. Obtención de un cromo(fluoro)ionóforo norcianina-anilina, cloruro de 2-[4'-cloro-6'-N-anilino-3',5'-(propano-1'',3''-diil)-1',3',5'-hexatrien-1'-il]-3,3-dimetil-1H-benz[e]indolio, **nca1** (**5fA** en [8])



Se disponen 419 mg (2 mmol) de 1,1,2-trimetil-1H-benz[e]indol (ACROS, 96%) y 714 mg (2 mmol) de **p11** en 30 ml de metanol en un matraz esférico provisto de agitación magnética y de refrigerante de reflujo y sumergido en un baño de silicona. La mezcla se refluje durante 10 minutos. La reacción se sigue por espectrofotometría de UV-vis. Cuando la banda correspondiente a la sal pentamética desaparece, se enfría la mezcla y se

mantiene a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante un día. Los cristales se filtran y se recrystalizan con metanol. Se obtienen 466 mg (1 mmol, 49%) de **nca1**.

$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6): δ 1.77 (s, 6H: $(\text{CH}_3)_2$), 1.86 (quinteto, $J=5.6$ Hz, 2H: $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 2.69 (m, 4H: $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 6.57 (d, $J=15.0$ Hz, 1H: $^+\text{N}=\text{C}(\text{Me})_2\text{CCHCHC}$), 7.10 (t, $J=6.0$ Hz, 1H: NHC_6H_5), 7.37 (s, 4H: NHC_6H_5), 7.56 (t, $J=7.5$ Hz, 1H: CCHCHCHCHC), 7.66 (d, $J=7.8$ Hz, 1H: CCHCHCNH^+), 8.04-8.10 (m, 3H: CHNPh , CCHCHCHCHC), 8.24 (d, $J=8.5$ Hz, 1H: CCHCHCNH^+), 8.62 (d, $J=15.0$ Hz, 1H: $^+\text{N}=\text{C}(\text{Me})_2\text{CCHCHC}$), 9.85 (s ancho, NHPh) (Anexo).

FABMS m/z 439.0 (M^+ , 100), 441.0 (30).

Análisis elemental: Calculado para $\text{C}_{29}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_2$: C, 73.3; H, 5.9; N, 5.9. Experimental: C, 72.4; H, 6.1; N, 5.8.

3.4. METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE ABSORCIÓN

3.4.1. Caracterización de los cromo(fluro)ionóforos en disolución etanólica

3.4.1.1. Determinación del coeficiente de extinción molar y de la longitud de onda del máximo de absorción

Se registra el espectro de absorbancia entre 400 y 1000 nm de una disolución 1×10^{-5} M del cromo(fluro)ionóforo en medio ácido usando un espectrofotómetro de doble haz. A continuación, se realiza el espectro en medio básico, siguiendo el mismo procedimiento. Se obtiene el coeficiente de extinción molar, ϵ , a partir del valor de máxima absorbancia para cada medio, conociendo exactamente la concentración del cromo(fluro)ionóforo en disolución, y aplicando la ley de Lambert-Beer (Ecuación 1).

3.4.1.2. Estudio del comportamiento ácido-base en disolución etanólica

En primer lugar, se prepara una disolución 1×10^{-5} M del cromo(fluro)ionóforo a estudiar en 100 ml de etanol. Se realiza la corrección del blanco empleando etanol y se trasvasa aproximadamente la mitad de esta disolución a un vaso de precipitados provisto de agitación magnética, donde se introduce un electrodo de vidrio combinado para monitorizar el pH. A continuación, se varía el pH de la disolución mediante la adición de pequeños volúmenes (del orden de microlitros) de una disolución concentrada de HCl o de NaOH. Se

registra el espectro de absorbancia a cada uno de los valores de pH (una vez su valor se ha estabilizado), tomando unos 3 ml de la disolución de cromo(fluro)ionóforo e introduciéndolos en la cubeta del espectrofotómetro. Los espectros se realizan tras cada modificación de pH, partiendo de valores de pH neutros hacia valores de pH ácidos (llegando aproximadamente a 3 en cetocianinas y cianinas-anilinas, y a 1.5 en croconinas). De cada espectro, se obtiene la longitud de onda del máximo de absorción y la intensidad de absorción. A continuación, se basifica la disolución hasta el valor de pH neutro inicial, para verificar la reversibilidad del proceso. Con otra alícuota de la disolución, se obtienen los espectros de absorbancia desde un pH neutro a un pH básico (aproximadamente de 8.5 en cetocianinas, de 12 en croconinas y de 13 en cianinas-anilinas) y se estudia la reversibilidad del mismo modo.

Las curvas de respuesta se obtienen representando la absorbancia a la longitud de onda del máximo en función del pH, siendo éstas normalmente sigmoidales. Los valores de la constante de acidez de los indicadores corresponden al punto de inflexión de estas curvas. Para determinar este punto, se calcula el valor de la segunda derivada de la función de respuesta. Así, el valor del pK_a se obtiene a partir de la expresión:

$$pKa = \frac{|A''_a|}{|A''_a| + |A''_d|} \cdot (pH''_d - pH''_a) + pH''_a \quad (20)$$

donde pH''_a y A''_a corresponden al valor de pH y de absorbancia de la segunda derivada para el último punto positivo y pH''_d y A''_d a los valores de pH y de absorbancia de la segunda derivada para el primer punto negativo.

A partir de los espectros de absorbancia se determina la reversibilidad. El proceso se considera reversible cuando la forma de la banda de absorción, el valor de la longitud de onda del máximo y el valor de la absorbancia de un cromo(fluro)ionóforo a un determinado pH, antes y después de un ciclo de pH, son iguales.

3.4.2. Caracterización de los cromo(fluro)ionóforos en membranas de PVC plastificado

3.4.2.1. Protocolo de preparación de membranas

Las membranas ópticas selectivas a iones que se estudiaron en este trabajo se obtienen a partir de la mezcla de los diferentes elementos que las componen que denominamos *cóctel sensor*. Primeramente, se determina la cantidad de cada cromo(fluro)ionóforo que es necesario pesar para obtener un nivel mínimo de señal de 0.2 u.a. Ésta se calcula a partir del valor de la absortividad molar en medio ácido a la longitud de

onda del máximo de absorbancia en disolución, para un camino óptico de 4 μm (grosor de las dos membranas que se usan en cada estudio) y teniendo en cuenta que se preparan unos 0.25 g de membrana. Las membranas selectivas a protón tienen la siguiente composición (porcentaje en peso): 0.5% de cromo(fluoro)ionóforo (indicador de pH), 0.5% de aditivo iónico (aniónico en el caso de las cetocianinas y las cianinas-anilinas, tetrakis(*p*-clorofenilborato) de potasio (KTPCIPB); catiónico en el caso de las croconinas, bromuro de tetraoctilamonio), 31% de PVC y 68% del plastificante (fosfato de tris(2-etilhexilo) (TOPh) en cetocianinas, y sebacato de di-(2-etilhexilo) (DOS) en croconinas y cianinas-anilinas). Todos los componentes de la membrana se pesan y disuelven en 1.5 ml de THF. Posteriormente, el cóctel sensor se reserva en la nevera, protegido de la luz, para su conservación.

Se obtienen membranas de 2 μm de grosor depositando 100 μl del cóctel sobre un portaobjetos de vidrio que se hace girar a 3000 rpm durante un minuto empleando un dispositivo de rotación controlada (o *spin-coater*).

3.4.2.2. Montaje experimental

El montaje experimental consta de un sistema de gestión de fluidos con un sistema supresor o atrapador de burbujas compuesto por una unidad de impulsión; una celda de flujo diseñada en el grupo de investigación (GSB); un espectrofotómetro UV-vis-NIR de doble haz y un sistema de adquisición de datos vía un ordenador. En los casos en los que se registran espectros en función del pH, se empleó también un electrodo de pH combinado conectado a un pHmetro (**Figura 3.3**).

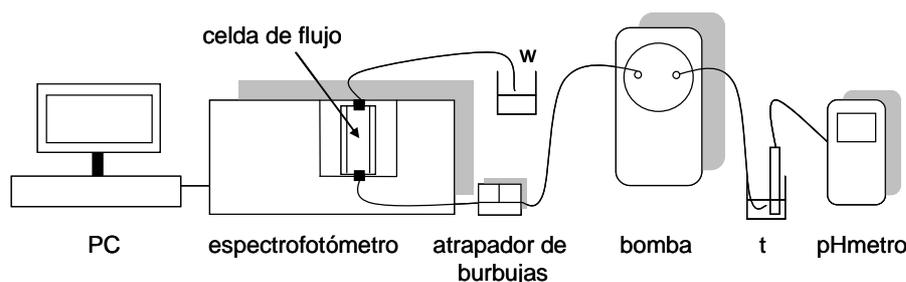


Figura 3.3. Esquema del montaje experimental para medidas de absorbancia de optodos en flujo continuo (**w** es residuo y **t**, disolución tampón).

La celda de flujo es de metacrilato, de configuración convencional, y permite la inserción de dos membranas ópticas, depositadas sobre portaobjetos de vidrio. Para mantener la estanqueidad, se ayuda de dos finas capas de goma opaca a la radiación, que, a su vez, definen la ventana óptica de la celda.

La unidad de impulsión consiste en una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3). El atrapador de burbujas es un bloque de metacrilato con entrada y salida de flujo, que retiene las posibles burbujas provenientes de la disolución. Todas las conducciones del sistema de gestión de fluidos se efectúan mediante tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno y se integran en el sistema mediante conectores de PVC. La estanqueidad de las conexiones se asegura mediante juntas toroidales de viton (*Epidor, S.A.*).

3.4.2.3. *Determinación de la longitud de onda del máximo de absorción*

Para establecer la longitud de onda del máximo de absorción, se hace circular una disolución tamponada ácida (pH=3 para cetocianinas y (nor)cianinas-anilinas; y pH=1.5 para croconinas) durante 5 minutos a través de la celda de flujo. Una vez se alcanza el estado estacionario de la señal, se registra el espectro de 400 a 1000 nm y se toma la longitud de onda del máximo. Análogamente, se determina la longitud de onda del máximo de absorción en medio básico (pH=8.5 para cetocianinas, pH=13 para (nor)cianinas-anilinas, y pH= 12 para croconinas).

3.4.2.4. *Estudio del comportamiento ácido-base*

Se sigue la respuesta a pH en un sistema de flujo en continuo. Los espectros de la membrana son registrados para cada pH una vez se alcanza el estado estacionario de la señal (aprox. 5 min). Se varía el pH de la disolución de 3 a 8.5 en cetocianinas; de 1.5 a 12 en croconinas y de 6 a 13 en (nor)cianinas-anilinas, adicionando pequeños volúmenes de disoluciones concentradas de HCl y NaOH y se monitoriza el pH continuamente con un electrodo de vidrio. Se realiza el cálculo de los valores de pK_{aMEM} de cada cromo(fluro)ionóforo ajustando los valores de la curva de calibrado experimental en la ecuación general de un optodo de pH, [9]

$$a_{H^+} = \frac{1}{K_{aMEM}} \cdot \frac{(1 - \alpha)}{\alpha} \quad (21)$$

donde α es el coeficiente de disociación del cromo(fluro)ionóforo; es decir, $\alpha = (A_f - A)/(A_f - A_0)$. A es la señal a un pH determinado, A_0 es la señal de la forma totalmente disociada (máximo pH), y A_f es el máximo señal de la forma totalmente protonada (mínimo pH).

3.4.2.5. *Estudios de fotoestabilidad*

Se estudia la fotodescomposición de los cromo(fluro)ionóforos bajo dos condiciones experimentales distintas. La primera consiste en exponer las membranas, previamente

acondicionadas con una disolución tampón ácida (pH=3) o básica (pH=8), a la longitud de onda del máximo de absorbancia de la forma ácida y de la básica respectivamente utilizando el haz de luz de un espectrofotómetro.

La segunda consiste en exponer las membranas en seco a la luz de una lámpara halógena (500 W), situada a 150 cm de distancia. Se sigue la modificación del espectro de absorción de la membrana. La temperatura durante los experimentos es de 23 ± 2 °C.

En ambos casos, se registra el espectro de absorbancia en intervalos de pocos minutos durante 2 horas. Se calcula el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de los cromo(fluro)ionóforos asumiendo una ecuación de velocidad de descomposición de primer orden, y normalizando la absorbancia en el $t = 0$ al 100% de señal.

3.4.2.6. Estudios de exudación de la membrana

El estudio de la exudación se realiza registrando el máximo de absorbancia de la forma ácida o de la básica cada pocos minutos, mientras la membrana, protegida de la luz, está en continuo contacto con una disolución tampón que circula en el sistema durante 2 horas. Los experimentos se llevan a término en medio ácido (pH=3) y básico (pH=8). Finalmente, se registra el espectro de la disolución tampón que ha circulado, contenida en un vaso de precipitados de 5 ml, para comprobar la posible presencia del cromo(fluro)ionóforo.

3.4.2.7. Estudio del tiempo de respuesta

Para determinar el tiempo de respuesta de las membranas se realizan registros en continuo de la absorbancia en función del tiempo fijando una longitud de onda (normalmente la del máximo de absorbancia). En primer lugar, se acondiciona la membrana con una disolución tampón que protona o desprotona completamente el cromoionóforo y, a continuación, se va variando el pH en intervalos de una unidad adicionando pequeños volúmenes de una disolución concentrada de HCl o NaOH. De esta forma, se obtienen señales escalonadas que permiten establecer el tiempo en el que la respuesta llega al estado estacionario. Para determinar el tiempo de respuesta se aplica un ajuste exponencial a cada escalón (Figura 3.4) y se calcula como el tiempo en el que la señal llega al 90% de su valor total. Si la función exponencial es la siguiente:

$$A = A_0 + be^{-c(t+d)} \quad (22)$$

donde A_0 es la absorbancia en el estado estacionario, b es la variación de absorbancia en un escalón, t es el tiempo en segundos, d es el tiempo inicial en segundos, c es una constante y A es la absorbancia a un tiempo determinado. Según esta expresión, se cumple que para un tiempo inicial ($t=0$) la respuesta es $A=A_0+b$, y cuando llega al estado

estacionario ($t=\infty$), la respuesta es $A=A_0$. Para calcular el tiempo en llegar al 90% de la respuesta en el que $A=A_0+0.1b$, se substituye este valor en la ecuación (22) y se obtiene el

$$\text{tiempo de respuesta en segundos como: } tr_{90\%} = -d - \frac{\ln 0.1}{c} \quad (23)$$

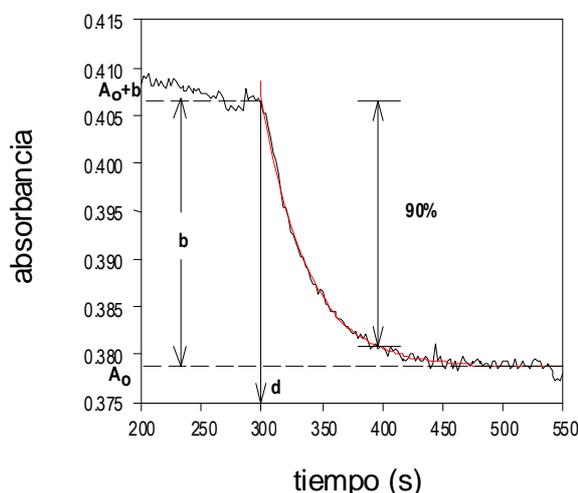


Figura 3.4. Ajuste exponencial y parámetros para calcular el tiempo de respuesta.

3.5. METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA

3.5.1. Caracterización de los cromo(fluro)ionóforos en disolución etanólica

3.5.1.1. Determinación de la longitud de onda de los máximos de excitación y emisión y del rendimiento cuántico de fluorescencia

Para determinar la longitud de onda de emisión de fluorescencia máxima de los cromo(fluro)ionóforos sintetizados en este trabajo en disolución etanólica, se registran los espectros de emisión de disoluciones 10^{-5} M en etanol 96% de los cromo(fluro)ionóforos a las que se ha añadido unas gotas de HCl concentrado o de NaOH concentrado para asegurar la presencia de una sola especie, la ácida o la básica respectivamente. La longitud de onda de excitación utilizada en cada caso es, en primera aproximación, la correspondiente al máximo de absorbancia en disolución, determinado anteriormente. Los espectros de emisión se registraron entre $\lambda_{exc}+5$ nm y 800 nm. Finalmente, mediante la longitud de onda de emisión, se registra el espectro de excitación y se verifica la longitud de onda del máximo.

Se calculan los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_f) de cetocianinas en disolución etanólica respecto a antraceno [10] (*Aldrich*, 99%) en etanol ($\Phi_f=0.27\pm 0.03$, $\lambda_{exc}=365$ nm) empleando el método de las medidas ópticamente diluidas. [11] Éste sigue la ecuación (24): [12]

$$\Phi_f = \Phi_{f,st} (F/F_{st})(A_{st}/A)(E_{st}/E) \quad (24)$$

donde $\Phi_{f,st}$ es el rendimiento cuántico del estándar (antraceno); F, el área integrada del espectro de emisión de fluorescencia, en cuantos; A, la absorbancia representativa de la disolución empleada y E, la intensidad de la radiación de excitación, en cuantos·s⁻¹. El subíndice “st” se refiere al material estándar y donde no se indica subíndice se refiere a la sustancia de rendimiento cuántico desconocido. Las disoluciones empleadas para el cálculo del rendimiento cuántico son desoxigenadas, burbujeando argón durante 10 minutos, como paso previo al registro de los espectros de absorbancia y de fluorescencia. Los máximos de absorbancia de las disoluciones de los cromo(fluro)ionóforos y del antraceno, no deben exceder el valor de 0.05 (disoluciones en etanol 96% entre 5×10^{-7} y 10^{-6} M) para asegurar las premisas de la ecuación (24). Los espectros de emisión de fluorescencia son corregidos multiplicándolos por un factor, obtenido midiendo la potencia de la lámpara de emisión del fluorímetro con un sensor de luz Advantest (Tokio, Japón) conectado a un medidor de potencia óptica Advantest (Tokio, Japón).

3.5.1.2. Estudio del comportamiento ácido-base en etanol

Se sigue el mismo procedimiento descrito en el apartado § 3.4.1.2, pero esta vez realizando espectros de emisión de fluorescencia en un espectrofluorímetro.

3.5.2. Caracterización de los cromo(fluro)ionóforos en membranas de PVC plastificado

3.5.2.1. Protocolo de preparación de membranas

Los cócteles sensores empleados para los estudios de fluorescencia de los cromo(fluro)ionóforos sintetizados en membranas de PVC plastificado se prepararan como se describe en el apartado § 3.4.2.1.

3.5.2.2. Montaje experimental

Para realizar medidas de fluorescencia de los optodos, se depositan unos 2 μ l de cóctel sensor en un portaobjetos de vidrio de dimensiones aproximadas de 1x3 cm y se expanden simulando una técnica serigráfica (*screen-printing*) con la ayuda de otro

portaobjetos. Así se obtienen membranas homogéneas de $1.2 \pm 0.2 \mu\text{m}$ de grosor (medidas por interferometría IR). Se introduce el portaobjetos en una cubeta de cuarzo y se posiciona con la ayuda de un tapón de teflón, especialmente diseñado para sostener la membrana a 45° del detector y la fuente, tal y como se muestra en la Figura 3.5.

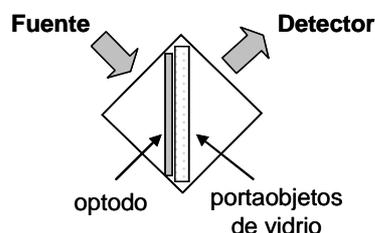


Figura 3.5. Esquema de la disposición de las membranas en las medidas de fluorescencia en la cubeta emplazada en el espectrofluorímetro.

Para evaluar la respuesta de la membrana a pH, se rellena la cubeta con una disolución tampón a un pH determinado. La disolución se va renovando a cada valor de pH y se toma la medida una vez alcanzado el equilibrio (aprox. 2 minutos).

3.5.2.3. Determinación de la longitud de onda del máximo de excitación y emisión de fluorescencia.

Se registran los espectros de emisión de fluorescencia en el montaje experimental descrito en el apartado anterior § 3.5.2.2, tanto de la forma ácida de los cromo(fluro)ionóforos (añadiendo a la cubeta una disolución de tampón combinado ajustado a pH=1.5 en croconinas, pH=3 en cetocianinas y pH=6 en (nor)cianinas-anilinas), como de la forma básica (disolución tampón ajustado a pH=12 en croconinas, pH=8.5 en cetocianinas y pH=13 en (nor)cianinas-anilinas). La longitud de onda de excitación es, en cada caso, la correspondiente a la longitud máxima de absorción del cromo(fluro)ionóforo en membrana.

3.5.2.4. Estudio del comportamiento ácido-base

Se utiliza el montaje experimental descrito en el apartado § 3.5.2.2. Se rellena la cubeta con una disolución tampón a un determinado pH inicial y se toma el espectro a los dos minutos de acondicionar la membrana. Se renueva el contenido de la cubeta con la disolución tampón ajustada a distintos pH mediante adiciones de HCl y NaOH concentrados. El pH de la solución (entre 1.5 y 12 en croconinas; entre 3 y 8.5 en cetocianinas y entre 6 y 13 en (nor)cianinas-anilinas) se determina mediante un electrodo de pH combinado conectado a un pHmetro y se van tomando los distintos espectros de emisión. Los espectros

de emisión de fluorescencia se registraron irradiando a la longitud de onda del máximo de absorbancia de la forma ácida o de la básica. Se representa el valor de intensidad en el máximo de emisión frente al pH para construir la curva de calibración.

3.5.3. Caracterización de membranas selectivas a potasio y plomo (II) en los dispositivos miniaturizados de fluorescencia desarrollados

3.5.3.1. Protocolo de preparación de membranas

El procedimiento que se sigue para la preparación de las membranas selectivas a los iones potasio y plomo (II) es el mismo que el descrito en el apartado § 3.4.2.1, pero incorpora un ionóforo como elemento de selectivización de la respuesta al ión de interés. Se ensayan distintas composiciones de membrana (aditivos, ionóforos y plastificantes) en varias proporciones para optimizar la respuesta a cada aplicación concreta.

3.5.3.2. Estudios preliminares de los optodos en absorbancia

Previamente a la caracterización de la respuesta de los sistemas de fluorescencia desarrollados para la detección de potasio y plomo (II) utilizando optodos, se lleva a cabo la caracterización de las membranas en modo de absorbancia. Para ello se emplea el montaje experimental descrito en el apartado § 3.4.2.2. Para cada composición de membrana se realizan curvas de calibrado, haciendo circular por la celda de flujo disoluciones patrón del analito de interés. Durante el proceso se optimiza la concentración y el pH de tampón para establecer el intervalo de trabajo, y se determinan algunos parámetros de calidad analítica como sensibilidad, límite de detección y tiempo de respuesta. Solo aquellos optodos en los que se observa una respuesta correcta al analito son posteriormente empleados para activar químicamente los sistemas miniaturizados de fluorescencia.

3.5.3.3. Caracterización de las membranas en la plataforma sensora de fluorescencia, mediante la técnica de análisis por inyección en flujo (FIA).

Para la caracterización de los dispositivos selectivos de fluorescencia desarrollados, se utiliza la técnica de análisis por inyección en flujo para aprovechar las características de sencillez, fácil automatización y ahorro de disoluciones cuando se pretende obtener registros con retorno a la línea base. La técnica FIA se basa en la inyección de un volumen conocido de patrón o muestra en el seno de una disolución portadora que circula en dirección al detector. De esta manera, el detector que lee de forma continua, establece una línea base

que se ve alterada por los cambios producidos por el analito presente en el patrón o la muestra. El tipo de señal que se obtiene es un pico y la señal medida, proporcional a la concentración de analito en la disolución, es la altura de pico. La curva de calibración se obtiene de la representación de la altura de pico en función de la concentración de analito.

La plataforma sensora de fluorescencia desarrollada en el presente trabajo (apartado § 3.2) se emplea como sistema de detección miniaturizado en un sistema de flujo bicanal sencillo (la muestra, una vez inyectada en el canal portador, se acondiciona con la solución tampón del canal auxiliar). Sus componentes son una bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3), equipada con tubos de Tygon y tubos de PTFE de 0.8 de diámetro interior y una válvula de inyección (Hamilton, modelo MVP) con un volumen determinado de inyección de muestra o disolución patrón (**Figura 3.6**).

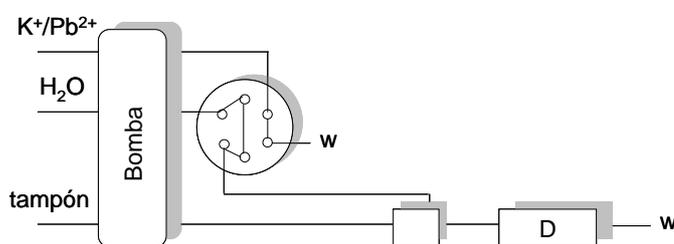


Figura 3.6. Esquema del sistema bicanal de inyección en flujo. **D** es la plataforma sensora de fluorescencia y **w**, desecho.

La muestra o patrón, en su viaje hacia el detector, sufre una cierta dispersión en contacto con las disoluciones portadora y acondicionadora. Esta dispersión se mantiene constante si no se modifican las condiciones experimentales. Los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA como el volumen de inyección y el caudal se deben optimizar en función de las características del problema analítico planteado. No obstante, en primer lugar, se han realizado curvas de calibración en un sistema de flujo continuo monocanal sin inyección, donde la válvula inyectora se ha substituido por una válvula de selección (Hamilton, modelo MVP), para seleccionar el pH del tampón a utilizar como disolución acondicionadora de pH (acetato de magnesio 0.05 M).

1. Optimización de los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA

- Volumen de inyección

A un caudal fijado en $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, se inyectaron distintos volúmenes (500, 1000, 1500, 3000 y 5000 μl) de un patrón de una concentración conocida ($1 \times 10^{-2} \text{ M K}^+$; $5 \times 10^{-3} \text{ M Pb}^{2+}$). Se escogió el volumen de inyección que daba lugar a una señal suficientemente intensa en el menor tiempo de análisis (de retorno a la línea base).

- *Caudal*

Se inyecta el volumen seleccionado como óptimo de un patrón de concentración conocida (1×10^{-2} M K^+ ; 5×10^{-3} M Pb^{2+}) y se varía el caudal total, el de entrada al detector (4, 6, 8 y $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$). De nuevo, se elige aquel caudal que permite obtener la mejor relación intensidad de señal/tiempo de análisis.

2. Parámetros de calidad analítica del dispositivo de fluorescencia desarrollado

- Curvas de calibración

Una vez fijadas las condiciones experimentales para cada aplicación (de potasio y de plomo (II)), se realizaron curvas de calibración utilizando disoluciones patrón del analito. Las concentraciones preparadas para potasio cubren el rango 1×10^{-7} – 5×10^{-2} M y para plomo (II) son 1×10^{-7} – 1×10^{-1} M. La curva se obtiene de la representación de la altura de pico (en mV) frente el logaritmo de la concentración de analito.

- Repetitividad

Empleando un mismo optodo, se inyecta el mismo patrón (5×10^{-4} M de cloruro de potasio; 5×10^{-4} M de nitrato de plomo (II)) 20 veces consecutivas en el canal portador. La repetitividad del resultado se expresa mediante la desviación estándar relativa (RSD) de las medidas realizadas.

- Reproducibilidad

Para estudiar la reproducibilidad se determina la sensibilidad (como pendiente de la zona lineal de la curva de calibración) de una misma membrana durante cinco calibrados. El resultado se expresa mediante la desviación estándar relativa (RSD) de las medidas realizadas.

- Estudio de interferencias

Se evalúa la selectividad del optodo de potasio en el sistema de medida optimizado frente los cationes más comunes encontrados en agua potable de red de distribución (calcio, sodio y amonio) puesto que el sensor va a ser aplicado en ese tipo de muestra. Se sigue el método de las disoluciones mixtas o de interferencia fija (FIM), que consiste en evaluar la respuesta de diversos patrones del analito, preparados en un fondo constante de ión interferente. Las curvas de calibración resultantes muestran dos zonas claramente diferenciadas. Una zona plana en la que el sensor responde a la concentración de interferente y una zona lineal en la que el sensor responde a la concentración de analito.

Se realizan calibrados con disoluciones que contienen una concentración fija de ion interferente variando la concentración de potasio. Se preparan disoluciones 1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 1×10^{-3} , 5×10^{-4} , 1×10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 1×10^{-6} y 1×10^{-7} M K^+ a partir de una disolución madre 5×10^{-2} M de cloruro potásico enrasadas con disoluciones de las correspondientes sales de

nitrate de los posibles iones interferentes (1×10^{-3} M en el caso del ion amonio y 1×10^{-1} M para el resto de iones: Ca^{2+} , Na^+ y Cu^{2+}). Los coeficientes de selectividad se calculan por analogía a los electrodos selectivos de iones, teniendo en cuenta la concentración obtenida al extrapolar las dos zonas de respuesta obtenidas y la concentración del ión interferente. La ecuación utilizada es la siguiente:

$$\log K_{K,J}^{POT} = \log \left(\frac{[\text{K}^+]}{[\text{J}^{z+}]^{1/z}} \right) \quad (25)$$

donde J^{z+} es el ion interferente y z , su carga.

De forma análoga al optodo de potasio, se evalúa la selectividad del optodo de plomo en el sistema de medida optimizado frente a los iones Cd^{2+} , Al^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ , Cu^{2+} y NH_4^+ . Las disoluciones patrón 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M y 1×10^{-2} M de Pb^{2+} son preparadas a partir de una disolución madre 0.1 M de nitrate de plomo (II). Las concentraciones de las disoluciones de interferente son: 1×10^{-4} M de nitrate de cadmio; 1×10^{-3} M de nitrate de aluminio no hidratado; 1×10^{-3} M de nitrate de zinc hexahidratado; 1×10^{-3} M de nitrate de calcio tetra hidratado; 1×10^{-3} M de nitrate de sodio; 1×10^{-3} M de nitrate de cobre (II); 1×10^{-3} M de nitrate de amonio.

- Aplicación al análisis de muestras reales de potasio y plomo (II)

Para demostrar la viabilidad de utilizar el sistema desarrollado para el análisis de potasio en una aplicación real, se prepara una muestra de agua de red de distribución dopada con 10^{-2} M de cloruro potásico. Por dilución de esta disolución con agua de red, se obtienen disoluciones de distinta concentración 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M, 1×10^{-5} M, 2×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 2×10^{-4} M, 1×10^{-4} M, 1×10^{-3} M y 1×10^{-2} M K^+ , las cuales son analizadas aleatoriamente en el sistema FIA desarrollado, tras realizar una curva de calibración con disoluciones patrón de K^+ . Cada muestra es inyectada por triplicado y se limpia el sistema con agua bidestilada durante 5 minutos entre muestras. Se determina la concentración de potasio de las muestras por interpolación del resultado en la recta de calibrado.

Por otro lado, el sistema desarrollado para el análisis de plomo también se aplica a la determinación de éste ion metálico en extractos acéticos de suelos contaminados. Las muestras de suelos son tomadas en los alrededores de una fundición minera en Torreón (Coahuila, México). El procedimiento de muestreo seguido es una adaptación de un estándar de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (*American Society for Testing and Materials*, ASTM). [13] Cada muestra, georeferenciada mediante un GPS (NAV-WGS84 datum), es recogida en un marco de madera de 15×15 cm y luego homogeneizada. Las fracciones representativas se obtienen por el proceso estandarizado de cuarteo (*Coning and Quartering*) de la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (*Environmental Protection Agency*, EPA). [14] Los extractos se preparan mezclando 1 g de muestra de suelo

con 40 ml de ácido acético 0.11M, preparado a partir de ácido acético glacial (Panreac, QP, Barcelona, España), y luego agitando durante 16 horas a 45 rpm en un agitador rotativo (*test tube rotator*, Labinco Laboratory Instruments, Holanda, modelo LD-79). A continuación, la mezcla es centrifugada con una centrífuga (Orto Alresa, modelo Digicen) y filtrada mediante un filtro de 8 μm . El extracto ácido resultante es diluido 1:1 con una disolución tampón 0.05 M de acetato de magnesio a pH=6. Estas muestras se inyectan por triplicado en el sistema FIA tras realizar una curva de calibración utilizando disoluciones patrón. Entre muestras y tras el calibrado, se limpia el sistema con agua bidestilada durante 5 minutos. Las concentraciones de plomo (II) se calculan interpolando la altura de pico en la zona lineal de la curva de calibración.

3.5.3.4. *Evaluación de la respuesta analítica de la membrana selectiva de plomo en la sonda de fluorescencia y su aplicación.*

Se activa la sonda de fluorescencia depositando 5 μl del cóctel optimizado del optodo selectivo a Pb^{2+} en la superficie de la zona sensora simulando una técnica serigráfica y se evalúan los parámetros analíticos de calidad a partir de las curvas de calibración.

- Calibración de la sonda de fluorescencia

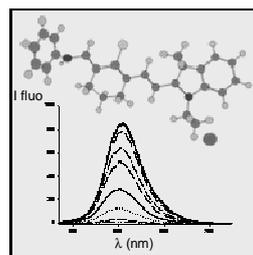
Se sumerge la sonda de fluorescencia en 25 ml de tampón de acetato de magnesio 0.05 M a pH=6.0. Se varía la concentración de plomo en el intervalo 1×10^{-6} - 1×10^{-2} M mediante adiciones de disoluciones patrón 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , 1×10^{-2} y 1×10^{-1} M de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ bajo agitación continua. Se toma la intensidad de fluorescencia (en mV) tras cada adición, esperando aproximadamente unos 2 minutos para asegurar obtener la señal en equilibrio entre la disolución y el optodo. La curva de calibración se obtiene de la representación de la intensidad frente al logaritmo de la concentración de Pb^{2+} .

- Aplicación al análisis de muestras naturales

Se determina el contenido de plomo de extractos acéticos preparados como se describe en el apartado § 3.5.3.3 por el método de la adición estándar. Se sumerge la sonda de fluorescencia en 25 ml de muestra de concentración desconocida y se mide la intensidad de fluorescencia (en V) al realizar adiciones de pequeños volúmenes de una disolución madre 0.1 M de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ preparada en un fondo de disolución tampón 0.05 M de acetato de magnesio a pH=6.0 bajo agitación continua. Las concentraciones de plomo de cada muestra se calculan por extrapolación de la recta de calibrado obtenida a partir de los datos experimentales representando la señal frente al logaritmo de la concentración de plomo añadida.

3.6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Moreau, M. F.; Lapalus, F.; Meyniel, G. "Synthesis of indomonocarbocyanines with selective biliary excretion. Experimental study in animals". *Eur.J.Med.-Chemica Therapeutica*, 1974, 9, 274-280.
- [2] Mujumdar, R. B.; Ernst, L. A.; Mujumdar, S. R.; Waggoner, A. S. "Cyanine dye labelling reagents containing isothiocyanate groups". *Cytometry*, 1989, 10, 11-19.
- [3] Makin, S. M.; Boiko, L. I.; Shavrigina, O. A. "Study of the aminoforylation of unsaturated aldehydes, 2-alkoxy aldehydes, and their alicyclic acetals and ketones". *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1977, 13, 1189-1192.
- [4] Encinas, C.; Otazo, E.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, J. "Croconines: new acidochromic dyes for the near infrared region". *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 8391-8393.
- [5] Rivera, L.; Puyol, M.; Miltsov, S.; Villuendas, F.; Alonso, J. "New ketocyanine-based fluorescent optodes for the development of integrated waveguide sensors". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, 114, 705-712.
- [6] Puyol, M.; Encinas, C.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, J. "Synthesis of new ketocyanine dyes for the development of optical sensors". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, B115, 287-296.
- [7] Strekowski, L.; Lipowska, M.; Patonay, G. "Facile derivatizations of heptamethine cyanine dyes". *Synthetic Communications*, 1992, 22, 2593-2598.
- [8] Rivera, L.; Puyol, M.; Miltsov, S.; Alonso, J. "New hexamethine-hemicyanine dyes for the development of integrated optochemical sensors". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 2111-2119.
- [9] Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. "Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics". *Chemical Reviews*, 1997, 97, 3083-3132.
- [10] Melhuish, W. H. "Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute". *Journal of Physical Chemistry*, 1961, 65, 229-235.
- [11] Demas, J. N.; Crosby, G. A. "The measurement of photoluminescence quantum yields. A review". *Journal of Physical Chemistry*, 1971, 75, 991-1024.
- [12] Drushel, H. V.; Sommers, A. L.; Cox, R. C. "Correction of luminescence spectra and calculation of quantum efficiencies using computer techniques". *Analytical Chemistry*, 1963, 35, 2166-2172.
- [13] ASTM Standard E1727-99, "Standard Practice for Field Collection of Soil Samples for Lead Determination by Atomic Spectrometry Techniques", ATSM International, West Conshohocken, PA,
- [14] EPA, Appendix C.2 "Procedures for laboratory analysis of surface/bulk dust loading samples", 1995.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

En el presente trabajo se propone el uso de sensores ópticos en el campo medioambiental, biomédico o industrial como alternativa o complemento de la instrumentación analítica clásica utilizada, que, a pesar de su fiabilidad, presenta algunos inconvenientes en cuanto a alto coste, mantenimiento, tamaño, elevado consumo de reactivos y la necesidad de personal especializado para su utilización. Asimismo, las técnicas ópticas se han visto beneficiadas, en los últimos años, del gran desarrollo que ha experimentado la industria de las telecomunicaciones, que ha permitido, en el ámbito de la instrumentación óptica, la aparición de dispositivos miniaturizados, como son emisores, detectores o estructuras de confinamiento y guiado de luz. Estos componentes posibilitan la construcción de dispositivos fiables, robustos, de pequeñas dimensiones, de bajo coste y de fácil manipulación y que, además, debido a sus características instrumentales, pueden utilizarse para medidas *in-situ* fuera de los laboratorios analíticos.

Aunque la mayoría de las medidas analíticas realizadas con instrumentación óptica clásica están basadas en absorbancia o transmisión de luz, su aplicación en el campo de los sensores presenta ciertos problemas. Por un lado, la miniaturización de los sensores implica una reducción drástica del camino óptico, lo que intrínsecamente conlleva una reducción de la sensibilidad. Un aumento del grosor de las membranas no solventa este problema, ya que, la cinética de transferencia de masa entre la disolución que contiene el analito y la matriz sensora se ralentiza y los tiempos de respuesta se incrementan. Por otro lado, la radiación que atraviesa la muestra puede sufrir dispersión o absorción inespecífica provocadas por la matriz. No obstante, el grupo de investigación desarrolló una novedosa configuración de sensor que consigue la resolución de los problemas de sensibilidad que presentan los dispositivos miniaturizados basados en medidas de absorbancia. El nuevo concepto de sensor quedó plasmado experimentalmente en una microconfiguración plana

optoelectrónica en la que la transmisión de luz se verifica a través de la membrana, en la dirección transversal a la dirección de difusión de los analitos entre la disolución y la membrana. Dependiendo de la longitud de la zona de guía cortada entre las guías de entrada y salida, queda fijado un camino óptico, que es independiente del grosor de la membrana. Su concreción experimental permitió desarrollar un nuevo tipo de transductor óptico integrado que demostró su idoneidad como plataforma versátil para la obtención de sensores ópticos basados en medidas de absorbancia.

El uso de técnicas basadas en medidas de fluorescencia puede ser también una solución viable para mejorar la sensibilidad de sensores con transducción óptica, debido a la mayor relación señal/ruido y a la posibilidad de evitar interferencias de la matriz al discriminar entre dos longitudes de onda ($\lambda_{\text{excitación}}$ y $\lambda_{\text{emisión}}$). Sin embargo, a menudo, el bajo nivel de señal de fluorescencia generado obliga a utilizar fuentes de radiación de alta intensidad y detectores muy sensibles pero costosos como los fotomultiplicadores.

El presente trabajo tiene como meta desarrollar sensores miniaturizados de fluorescencia sensibles y selectivos a un determinado analito y que operen en la zona del visible lejano y el NIR. Para la consecución de este objetivo se hizo necesario abrir dos líneas de investigación. Una, enfocada al desarrollo de instrumentación óptica miniaturizada y otra, a la obtención de membranas sensibles y selectivas a iones compatible con esa instrumentación. En este último ámbito, y dado que se pretende utilizar fuentes miniaturizadas de bajo coste (láseres de diodo emitiendo en la zona del visible lejano y NIR), y especialmente fotodiodos de limitada sensibilidad, se hace necesario el uso de fluoroionóforos con altos coeficientes de absorción molar y alto rendimiento cuántico. Debido a la escasa disponibilidad comercial de fluoroionóforos que cumplan con las características requeridas para ser aplicados en optodos y sensores miniaturizados, en primer lugar se diseñaron y sintetizaron una serie de indicadores acidocrómicos con absorciones intensas comprendidas en ese intervalo de longitudes de onda. El apartado § 4.1 recoge tanto los factores que se tuvieron en cuenta en el diseño de los compuestos cianina, como los procedimientos sintéticos generales seguidos para su obtención. La descripción detallada de la síntesis de cada cromo(fluoro)ionóforo y de sus respectivos precursores, así como su caracterización orgánica, se detalla en el capítulo 3, apartado § 3.3. Por un lado, y aprovechando la experiencia y los resultados obtenidos anteriormente en el *Grup de Sensors i Biosensors* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, se sintetizaron nuevos cromo(fluoro)ionóforos del tipo norindocrococianina y cetocianina. Estas dos clases de indicadores ya demostraron tener excelentes propiedades ácido-base [1,2] y ser compatibles con instrumentación miniaturizada, [3] pero además, la sencillez del

procedimiento sintético para su preparación y la facilidad de modulación de su longitud de onda de máxima absorción y de su constante de acidez nos condujeron a la síntesis de nuevos cromo(fluro)ionóforos con otras longitudes de onda de máxima absorción mediante cambios estructurales, principalmente en los sustituyentes de los grupos terminales.

Por otro lado, se decidió sintetizar nuevos fluoroionóforos selectivos de protón del tipo hemicianina o cianina-anilina. Éstos son ampliamente empleados en áreas científicas y tecnológicas como colorantes textiles y láser, sensibilizadores fotográficos, celdas fotoelectroquímicas, sondas de fluorescencia en biomembranas e iniciadores de pares iónicos. Además, son también usados como moléculas anfifílicas en estudios de óptica no lineal y en electrónica molecular para el desarrollo de membranas de Langmuir-Blodgett, debido al gran desplazamiento de carga que experimentan cuando son irradiados con luz. [4-8] Sin embargo, hasta el momento, la mayoría de los colorantes hemicianina sintetizados absorben entre 300 y 600 nm, son poco solubles en los plastificantes comúnmente empleados para la preparación de membranas de PVC (ya que fueron sintetizados para ser solubles en agua) [9] y prácticamente no han sido empleados en el desarrollo de sensores ópticos con aplicaciones analíticas. Mediante sencillos métodos sintéticos, se introdujeron nuevos grupos terminales en la estructura básica de estos compuestos con el objetivo de optimizar su aplicación en optodos. Así pues, se modificó la longitud máxima de absorción, su solubilidad en medios orgánicos y las constantes de acidez. En el apartado § 4.2 se presenta su caracterización espectroscópica (espectros de absorción) utilizando instrumentación convencional con la finalidad de poder realizar, posteriormente, medidas basadas en fluorescencia. Primeramente, se caracterizó la respuesta a protón de los cromo(fluro)ionóforos en disolución etanólica y en membranas poliméricas de PVC plastificado. Se optimizó la composición de los optodos, seleccionando el plastificante y aditivo iónico, y optimizando la cantidad y proporción de los componentes con el fin de obtener una respuesta altamente sensible y reversible a protón. A continuación, se emplearon como cromo(fluro)foros aquellas moléculas que presentaron mejores características de respuesta a protón, que exhibían fluorescencia (caracterización presentada más adelante, en el apartado § 4.3) y que su longitud de onda máxima se ajustaba más a la de emisión de los láseres de diodo emitiendo a 650 y 670 nm. Por otro lado, para desarrollar optodos selectivos de iones, se formularon, optimizaron y estudiaron nuevas membranas, que incluían un ionóforo selectivo a un determinado analito, en combinación con las hemicianinas que ofrecían mejores resultados. Primeramente se desarrolló una membrana selectiva a potasio como modelo y, posteriormente, una selectiva a plomo (II), empleando ionóforos comerciales. Se ensayaron distintas aplicaciones y se

demonstró la viabilidad de la utilización de las moléculas sintetizadas como cromo(fluro)ionóforos en membranas selectivas a estos iones.

En el apartado § 4.3, se presentan los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización de la emisión de fluorescencia de algunas de las moléculas sintetizadas, tanto en disolución etanólica, como en optodos de PVC utilizando instrumentación convencional. Con la finalidad de elegir el fluoroionóforo de protón idóneo para el desarrollo de un fluorosensor, se verificaron inicialmente las características fluorescentes de distintos cromo(fluro)ionóforos, tanto sintetizados anteriormente en el grupo de investigación, como los que se presentan en esta memoria.

Finalmente, se desarrollaron dos prototipos de sistemas ópticos miniaturizados para realizar medidas de fluorescencia en colaboración con el Grupo de Física Aplicada de la Universidad de Zaragoza. Su respuesta se validó mediante la utilización de las membranas selectivas de iones, previamente caracterizadas utilizando instrumentación convencional. Los resultados se presentan en el apartado § 4.4. El primer dispositivo construido consiste en una plataforma fluorosensora, que hace uso de fibras ópticas y de componentes ópticos miniaturizados y discretos, diseñada para su utilización en sistemas en flujo. En concreto, se optimizaron las condiciones experimentales de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) y se determinaron algunos parámetros analíticos de calidad como repetitividad, reproducibilidad y posibles interferencias. Como aplicación final se utilizó la plataforma miniaturizada de fluorescencia para la determinación de potasio en muestras dopadas de agua potable de red de distribución. Los resultados obtenidos demostraron la validez y la aplicabilidad, tanto de la instrumentación desarrollada, como de los optodos formulados y cromo(fluro)ionóforos sintetizados en el presente trabajo.

El segundo prototipo de dispositivo de fluorescencia miniaturizado fue desarrollado en colaboración con el Grupo de Tecnologías Fotónicas I3A de la Universidad de Zaragoza. Éste consiste en una sonda fluorosensora para realizar medidas en discontinuo. Básicamente está formada por dos fibras ópticas de polímero (POFs), acopladas a la plataforma fluorosensora anteriormente descrita, donde se encuentra el sistema de detección. La disposición de las fibras de inyección y de recogida de luz fue optimizada mediante un programa de simulación. En este caso, se validó su respuesta depositando en el extremo de la sonda un optodo selectivo a plomo (II) previamente optimizado. Finalmente, se aplicó la sonda fluorosensora en la determinación de plomo (II) en extractos de suelos contaminados, mediante la técnica de adición estándar. Los resultados demostraron que la instrumentación desarrollada es apta para aplicaciones medioambientales, así como la

versatilidad de los cromo(fluoró)foros sintetizados para distintas aplicaciones en función de la formulación del optodo.

4.1. DISEÑO Y SÍNTESIS DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS

4.1.1. Diseño

4.1.1.1. *Norindocrococianinas*

Las norindocrococianinas son un tipo de norcianinas que contienen un grupo crocónico central. Se distinguen de las heptametincianinas, sintetizadas anteriormente en el grupo de investigación, en que no están cuaternizadas en el nitrógeno de los grupos terminales. En el diseño de las heptametincianinas, se consideró, principalmente, la longitud de la cadena polimetínica, ya que es el factor que determina fundamentalmente la longitud de onda de máxima absorción. Cada grupo vinílico adicional representa un desplazamiento batocrómico de 100 nm. Se estimó que una cadena polimetínica formada por siete átomos de carbono permitiría obtener máximos de absorción, en caso de moléculas simétricas, centrados alrededor de los 700 nm. Para conseguir alcanzar longitudes de onda del máximo cercanas a los 780 nm, se incorporaron distintos grupos heterocíclicos terminales. Se escogieron derivados del benzotiazol y de indolenina, para conferir mayor estabilidad a la molécula.

Basándonos en esta experiencia previa, [10] el objetivo fue mejorar la solubilidad, estabilidad y especialmente la basicidad de los colorantes, sin variar esencialmente la longitud de onda del máximo de absorción. Por este motivo, se decidió sintetizar nortricarbocianinas, con la misma estructura, dejando el nitrógeno del heterociclo (la indolenina en este caso) sin cuaternizar e incluyendo tres de los carbonos polimetínicos en un anillo de seis átomos de carbono, encontrándose el hidrógeno central sustituido por un átomo de cloro. El hecho de poseer aminas terciarias en los grupos heterocíclicos, con protones ácidos, hacía pensar en un nuevo equilibrio ácido-base, con una constante de acidez distinta. Los buenos resultados obtenidos [11] llevaron a la síntesis de otros colorantes con nuevos grupos centrales, como el derivado del ácido crocónico. [1] Éste está formado por dos grupos carbonilos (electroaceptores) y un grupo óxido (electrodonador), [12] los cuales producen un gran desplazamiento batocrómico de la longitud de onda del máximo de absorción. Por esta razón, se redujo la longitud de la cadena polimetínica a únicamente cinco grupos vinílicos.

En la presente tesis se obtuvieron nuevos compuestos pertenecientes a este tipo de cianinas, las norindocrococianinas. Se introdujeron seis grupos heterocíclicos basados en indoleninas con diferente sustitución para obtener colorantes simétricos y asimétricos. De

esta forma, se puede estudiar el efecto que los sustituyentes tienen en las propiedades ácido-base, en la solubilidad, la absorción reradiación y la emisión de fluorescencia. La estructura química general de los colorantes norindocrococianina sintetizados puede verse en la **Figura 4.1**.

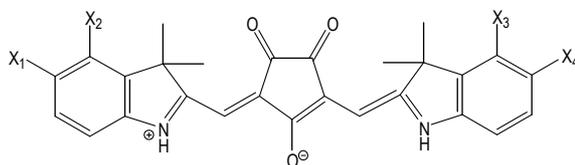


Figura 4.1. Estructura general de las norindocrococianinas sintetizadas.

4.1.1.2. Cetocianinas

Las cetocianinas son colorantes polimetínicos, en los que los tres átomos de carbono centrales de la cadena heptametínica (de nuevo se esperaban longitudes de onda máximas alrededor de los 700 nm) forman parte de un anillo de ciclopentanona central. Las cetocianinas no poseen carga, por lo que se las puede considerar un tipo de merocianinas. La presencia del grupo ceto-enólico y la ausencia de hidrógenos ácidos (nitrógenos heterocíclicos cuaternizados) indican un equilibrio ácido-base distinto al de las norindocrococianinas. Este hecho, unido al conocimiento de las excelentes propiedades de las cetocianinas como colorantes (altos coeficientes de absorción molar, emisión de fluorescencia), impulsó la síntesis y estudio de colorantes de esta familia. La protonación y desprotonación en el oxígeno del sistema aminodienónico se preveía a pH ácidos y, consiguientemente, se esperaba obtener una serie de colorantes con valores de pK_a ácidos. Se sintetizaron cetocianinas simétricas y asimétricas, [13] y con este fin, se escogieron derivados de benzotiazol y de indolenina sustituidos por distintos grupos funcionales como grupos heterocíclicos terminales. Su estructura general se indica en la **Figura 4.2**.

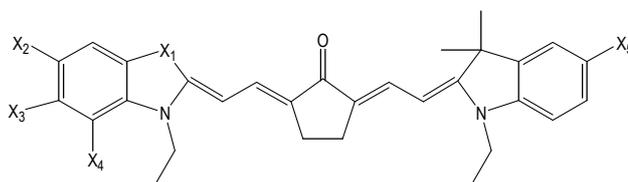


Figura 4.2. Estructura general de las cetocianinas sintetizadas.

4.1.1.3. (Nor)cianinas-anilinas

Las (nor)cianinas-anilinas son un tipo de hexametín-hemicianinas, de estructura similar a otros colorantes previamente descritos en la literatura, [14,15] pero en los que, de igual

modo que las heptametincianinas, tres de los átomos de carbono de la cadena polimetínica están incluidos en un anillo ciclohexánico (o ciclopentánico), el hidrógeno central del cual está sustituido por un átomo de cloro. Aunque para su síntesis nos basamos en la experiencia obtenida en las heptametincianinas, las (nor)cianinas-anilinas, presentan importantes diferencias estructurales. La cadena polimetínica es de seis átomos de carbono, en vez de siete, ya que se buscaban colorantes con absorciones máximas cercanas a los 650 nm o a los 670 nm. Además, son cianinas asimétricas: un extremo de la cadena polimetínica está sustituida por un heterociclo, y el otro por un grupo anilina. Se sintetizaron dos tipos de hexametín-hemicianinas con distinta sustitución en el nitrógeno heterocíclico: los colorantes cianinas-anilinas, con un nitrógeno heterocíclico cuaternizado, y los colorantes norcianinas-anilinas, con un hidrógeno en esa posición. Se esperaba así obtener compuestos con distinta basicidad. En el caso de las cianinas-anilinas cuaternizadas, el hidrógeno más ácido es el enlazado al nitrógeno anilínico, mientras que en las norcianinas-anilinas, éste es el enlazado al nitrógeno del heterociclo. La cuaternización se llevó a cabo con cadenas de distinta longitud y funcionalidad, para evitar de este modo la exudación y estabilizar el colorante en membranas poliméricas plastificadas. Con el objetivo de evaluar el efecto del tamaño del anillo central en la fotoestabilidad de los colorantes, se sintetizaron, a su vez, dos tipos de cianinas-anilinas: unas incluían un clorociclopentano en la posición central, y las otras, un clorociclohexano. En cuanto a los grupos terminales, en la obtención de las (nor)cianinas-anilinas se emplearon derivados de la anilina (con distinta sustitución) y derivados de benzotiazol y de indolenina como heterociclos, para modular las longitudes de onda de absorción, la solubilidad en medio orgánico y la basicidad (valores de pK_a cercanos a la neutralidad), así como para conseguir moléculas fluorescentes, aunque el rendimiento cuántico de fluorescencia es un parámetro poco predecible para la mayoría de las moléculas orgánicas.

La estructura de los colorantes (nor)cianinas-anilinas sintetizados se indica en la **Figura 4.3**.

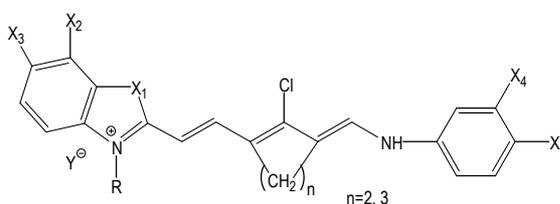


Figura 4.3. Estructura de las hexametín-hemicianinas sintetizadas. R=alquilo para las cianinas-anilinas y R=H para las norcianinas-anilinas.

4.1.2. Síntesis

4.1.2.1. Norindocrococianinas

Considerando la experiencia adquirida en nuestro grupo de investigación en relación a la síntesis de compuestos que solo difieren de las norindocrococianinas en el grupo central, se decidió aplicar el mismo procedimiento sintético que se siguió en la obtención de las escuarinas (grupo central derivado del ácido escuárico). [16] Las síntesis descritas consistían en reacciones de condensación entre el ácido crocónico y diferentes grupos terminales cuaternizados (**Figura 4.4**). [17] La reacción se llevó a cabo en una mezcla (1:1) benceno:butanol, en la que el rendimiento fue máximo. Como catalizador y para activar el grupo metilo de la indolenina, se empleó ácido p-toluensulfónico. El agua producida en la reacción se eliminó mediante una trampa Dean-Stark. Las estructuras de las norindocrococianinas sintetizadas se muestran en la **Tabla 4.1**.

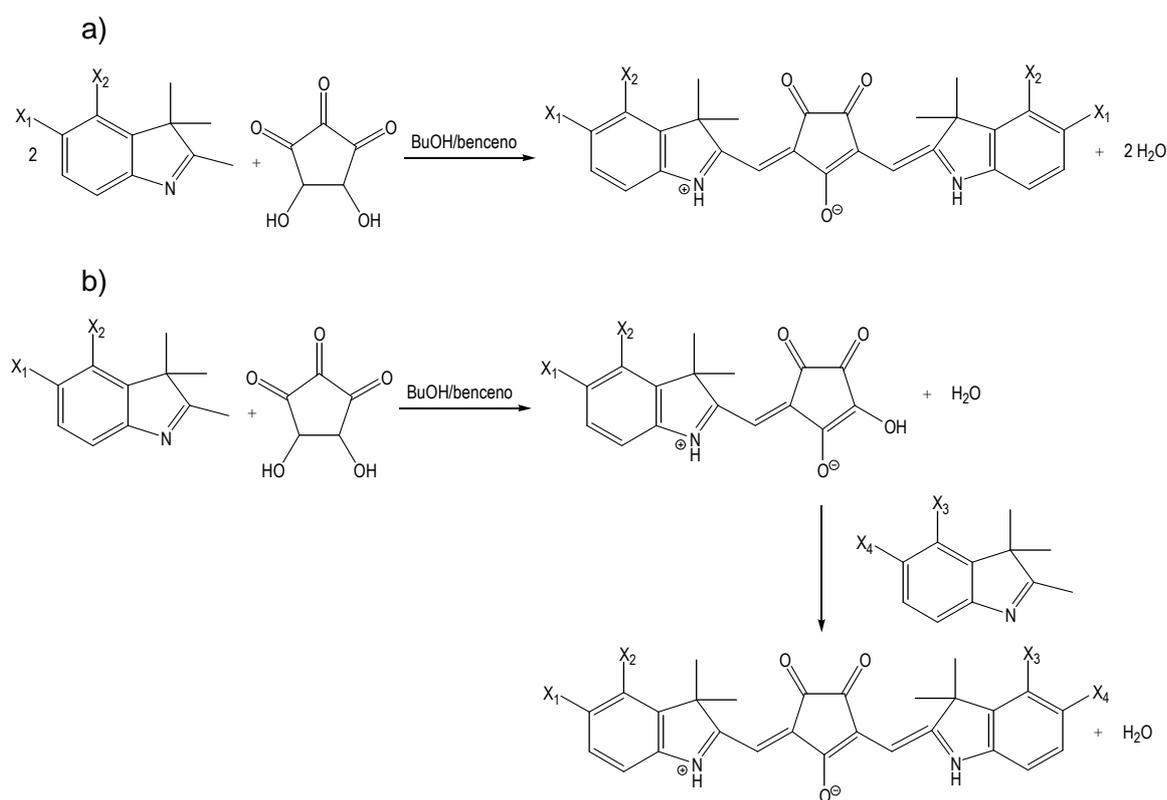


Figura 4.4. Síntesis general de las norindocrococianinas **a)** simétricas y **b)** asimétricas.

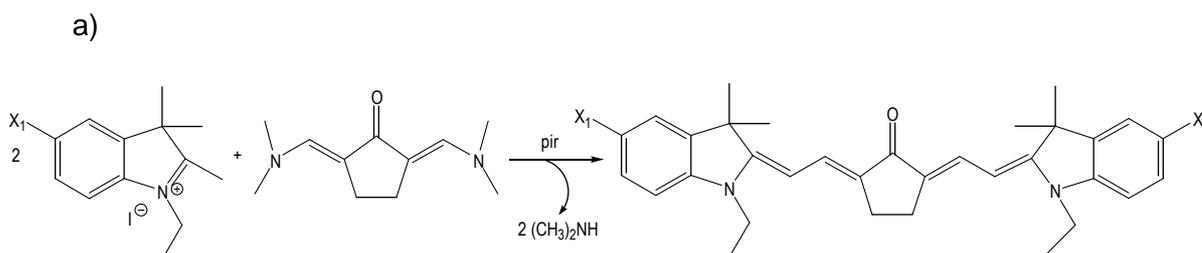
Tabla 4.1. Nombre identificativo, estructura química y rendimientos de reacción obtenidos de las norindrocrocianinas sintetizadas.

Colorante	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Rendimiento (%)
c1	OCH ₃	H	H	OCH ₃	36
c2	NO ₂	H	H	NO ₂	70
c3	NCHOCH ₃	H	H	NCHOCH ₃	35
c4	NCHOCH ₃	H	H	OCH ₃	35
c5	C ₄ H ₉	H	H	C ₄ H ₉	63
c6	H	H	H	H	75
c7	-(CH) ₄ -		-(CH) ₄ -		65

4.1.2.2. Cetocianinas

En la literatura se encuentran pocos ejemplos de síntesis de cetoheptametincianinas. Se describe la obtención de cetocianinas con grupos terminales acíclicos o heterocíclicos sin sustituyentes mediante la condensación de cetonas cíclicas y aldehídos heterocíclicos o acíclicos. [18-20] Los aldehídos heterocíclicos son preparados por formilación de Vilsmeier-Haak de las sales cuaternarias de los correspondientes heterociclos. Llevar a cabo este procedimiento a partir de heterociclos sustituidos, lo cual es interesante para la obtención de colorantes que puedan ser unidos covalentemente en matrices poliméricas, no es simple. Por este motivo, en nuestro grupo de investigación se propuso la síntesis directa de cetocianinas mediante la condensación entre dos equivalentes de benzotiazol o indolenina sustituidos y el grupo central 2,5-bis(dimetilaminometileno)ciclopentanona en piridina, para la obtención de cetocianinas simétricas (**Figura 4.5a**). La síntesis del derivado de ciclopentanona es sencilla y fue publicada anteriormente por Slominskii *et al.* [22] Análogamente, para la síntesis de cetocianinas asimétricas se procedió a la adición consecutiva de los distintos heterociclos terminales, sin necesidad de aislar el producto intermedio de monoaddición (**Figura 4.5b**). [2]

Las cetocianinas sintetizadas se muestran en la **Tabla 4.2**.



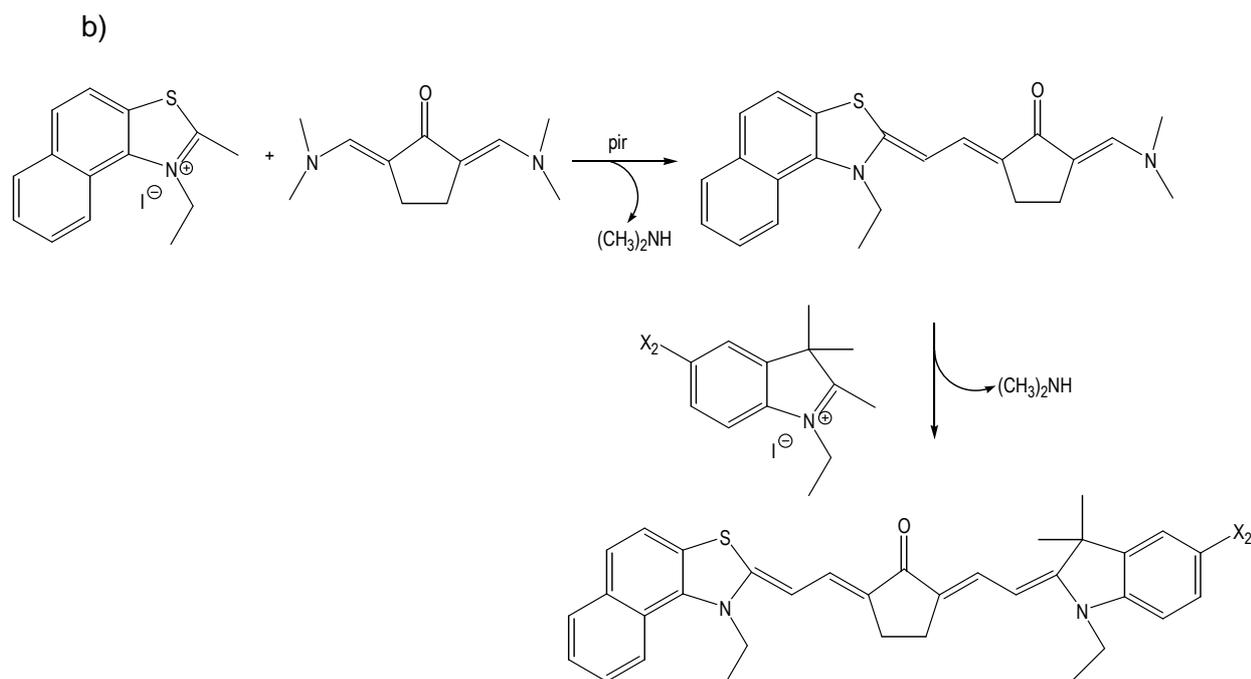


Figura 4.5. Síntesis general de las cetocianinas **a)** simétricas y **b)** asimétricas, en piridina (pir).

Tabla 4.2. Nombre identificativo, estructura química y rendimientos obtenidos de las cetocianinas sintetizadas, simétricas y asimétricas.

Colorante	X ₁	X ₂	Rendimiento (%)
k1	H	NHCOCH ₃	24
k2	H	H	22
k3	H	OH	36
k4	H	H	73
k5	NHCOCH ₃	H	75

4.1.2.3. (Nor)cianinas-anilinas

Las cianinas-anilinas se sintetizaron refluendo una disolución equimolar de la correspondiente sal cuaternaria de la base heterocíclica, que contiene un grupo metilo activado, con una sal pentametéfrica en etanol absoluto como solvente y en presencia de acetato sódico anhidro, mediante el procedimiento de Makin *et al.* (**Figura 4.6**). [21]

Las síntesis de los precursores, tanto de los heterociclos cuaternizados como de las distintas sales pentametéfricas están descritas en el apartado § 3.3.1.

Debido a que los colorantes podrían contener como impureza la molécula simétrica, el producto de la reacción se cambió a su forma neutra añadiendo trietilamina, se filtró, y se convirtió de nuevo a la sal cuaternaria añadiendo un ácido fuerte.

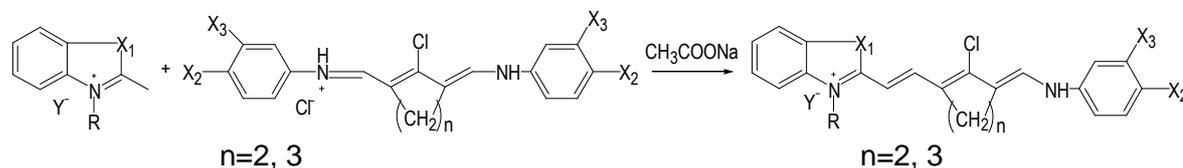


Figura 4.6. Síntesis general de las cianinas-anilinas.

La norcianina-anilina se sintetizó, siguiendo el mismo método, refluendo una disolución equimolar de benzoindolenina con la sal pentamética cloruro de N-[5-anilino-3-cloro-2,4-(pentadien-1-iliden)anilinio en metanol (**Figura 4.7**). En este caso, la purificación se llevó a cabo mediante una recrystalización en metanol, con un rendimiento global del 49%.

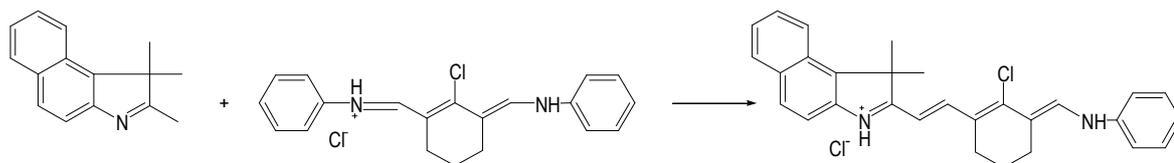


Figura 4.7. Síntesis de la norcianina-anilina.

Tabla 4.3. Nombre identificativo, estructura química y rendimientos de las cianinas-anilinas sintetizadas.

Colorante	X ₁	X ₂	X ₃	Y ⁻	R	Rendimiento (%)
n=3						
ca1	S	H	H	*	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	61
ca2	S	H	H	I	CH ₂ CH ₃	52
ca3	C(CH ₃) ₂	H	H	Br	CH ₂ CH ₃	32
n=2						
ca4	S	H	Cl	Br	CH ₂ CH ₃	31
ca5	C(CH ₃) ₂	H	H	ClO ₄	CH ₂ CH ₃	60
ca6	S	H	H	Br	CH ₂ CH ₃	43
ca7	S	H	CF ₃	Br	CH ₂ CH ₃	46
ca8	S	Cl	H	Br	CH ₂ CH ₃	45

*sin contraión

4.2. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS EN ABSORBANCIA

Los tres tipos de colorantes (norindocrococianinas, cetocianinas y cianinas-anilinas) sintetizados en el presente trabajo se caracterizaron espectroscópicamente considerando su futura aplicación como cromo(fluoro)ionóforos en membranas ópticas selectivas a iones. Como se ha comentado en la introducción, las características que un cromo(fluoro)ionóforo ha de cumplir para ser considerado un buen indicador ácido-base son: que las formas ácida y básica presenten espectros de absorción diferentes con longitudes de onda de los máximos lo más separados posible; las longitudes de onda de los máximos estén lo más separados posible y, por último, que sean reversibles.

Para su estudio, previamente a la caracterización en fluorescencia, se realizaron medidas en absorbancia de los colorantes en disolución y en membranas de PVC plastificado. Debido a la baja solubilidad de las cianinas en agua, su caracterización en disolución se realizó en un medio alcohólico. Se registraron los espectros UV-vis de los colorantes, tanto en su forma ácida, como en la básica, determinándose las longitudes de onda del máximo de absorción, así como los coeficientes de absortividad molar en disolución. Realizando calibrados sucesivos variando el pH se pudo estudiar el comportamiento ácido-base, la reversibilidad y determinar el pK_a . La reversibilidad fue evaluada comparando los valores de absorción obtenidos al mismo pH a la longitud de onda del máximo de absorción después de repetidos ciclos de acidificación/gasificación de los colorantes.

4.2.1. Estudios del comportamiento ácido-base en disolución etanólica

Los estudios dirigidos a determinar la longitud de onda del máximo de absorción de los colorantes y su coeficiente de absortividad molar se realizaron en soluciones etanólicas de concentraciones muy bajas, $10^{-5}M$, del colorante. En estas condiciones, ideales para un adecuado cumplimiento de ley de Lambert-Beer, se asegura además que en disolución solo exista el colorante en su forma monomérica. A altas concentraciones, se observan desviaciones de la ley de Lambert-Beer y alteraciones en los espectros de absorción, atribuidas a la formación de agregados de moléculas de colorante para formar dímeros o polímeros.

El cálculo de pK_a en etanol sirve para identificar el equilibrio ácido-base de los colorantes y obtener una aproximación razonable de los valores esperables en las membranas de PVC plastificado. Su determinación se realizó a partir del registro de la

absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción en función del pH. El valor de la constante de acidez corresponde al valor del pH en el punto de inflexión de la curva sigmoïdal obtenida. Aunque habitualmente las medidas de pH se realizan en medios acuosos, los valores de pK_a obtenidos en este trabajo son útiles a efectos comparativos y siempre referidos a disoluciones etanólicas.

4.2.1.1. Norindocrococianinas

A partir de los espectros de absorbancia de las norindocrococianinas, en medio ácido y básico (**Figura 4.8**), se obtuvieron los valores de la longitud de onda del máximo de absorción de la forma ácida y la básica y sus coeficientes de absorptividad molar, reflejados en la **Tabla 4.4**.

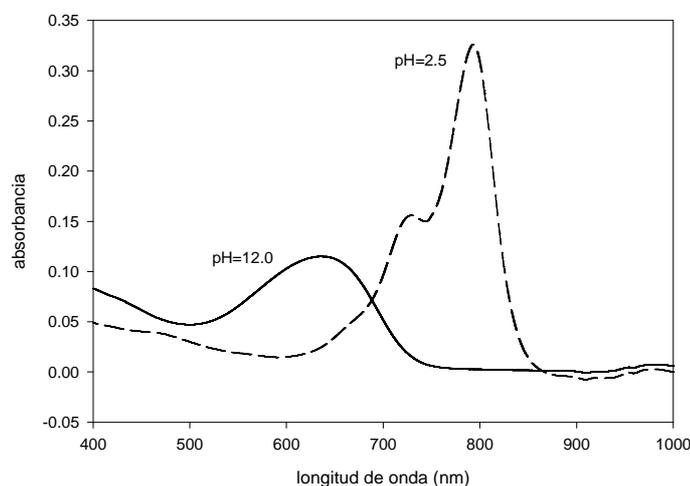


Figura 4.8. Espectros de absorbancia típicos de las norindocrococianinas en disolución etanólica. En línea discontinua, la banda correspondiente a la forma ácida y en continua, la forma básica, de **c4**.

La forma de los espectros de las norindocrococianinas es típica de los colorantes polimetínicos; la banda a longitudes de onda superiores es la más intensa, representando, presumiblemente, la transición $0 \leftarrow 0$ en un proceso de vibración. La banda de absorción de la forma básica, a longitudes de onda más cortas, es más ancha y poco definida.

Tal y como se pretendía, las bandas de absorción en medio etanólico de la forma ácida de los colorantes sintetizados se encuentran muy cercanas a los 780 nm, entre 750 y 800 nm. Comparando las longitudes de onda máximas de las norindocrococianinas sintetizadas con sustituyentes en los grupos heterociclos terminales, respecto a la norindocrococianina **c6** (sin sustituyentes en esas posiciones) se puede observar que cualquier sustitución en los grupos terminales provoca un desplazamiento batocrómico de la longitud de onda, tanto en

medio ácido como en básico. Según la literatura, [23] se esperan desplazamientos más batocrómicos para los sustituyentes electroatrayentes y conjugados, lo cual se corrobora comparando la longitud de onda de **c7** (con un anillo conjugado en la indolenina) respecto a **c6** (no sustituida): el desplazamiento batocrómico es el mayor de la serie, de 43 nm. El grupo electroatrayente nitro (presente en **c2**) provoca también un desplazamiento a longitudes de onda más largas, de 34 nm. No obstante, también se observan cambios de esta magnitud en los grupos electrodonadores, como es el caso del grupo metoxi (**c1** y **c4**) o amido (**c3** y **c4**). Por otro lado, el grupo alquilo (**c5**) es el que provoca cambios menores, desplazando también el máximo de absorbancia hacia longitudes de onda mayores.

Tabla 4.4. Longitudes de onda de los máximos de absorción (λ) en disolución etanólica, en medio ácido y en medio básico, coeficientes de absorptividad molar (ϵ) y pK_a de las norindocrococianinas sintetizadas.

Colorante	Forma ácida		Forma básica		pK_a
	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	
c1	793.5	5.84×10^4	638.5	1.79×10^4	6.5 ± 0.1
c2	783.0	1.49×10^5	630.0	3.32×10^4	9.6 ± 0.2
c3	798.5	4.43×10^4	639.5	1.44×10^4	9.4 ± 0.2
c4	792.2	3.25×10^4	634.1	1.10×10^4	8.9 ± 0.3
c5	775.0	1.71×10^5	642.5	4.86×10^4	9.1 ± 0.1
c6	759.0	1.51×10^5	626.0	3.85×10^4	9.7 ± 0.1
c7	802.0	9.70×10^4	653.5	2.04×10^4	8.6 ± 0.2

La longitud de onda máxima para la forma básica de las norindocrococianinas se encuentra entre 630 y 650 nm, en la región del visible lejano del espectro electromagnético. Los coeficientes de absorptividad molar de las bandas de absorción en ambos medios oscilan entre 3.3×10^4 y $1.7 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$. Los procesos de absorción que presentan estos valores de coeficientes de absorptividad molar son considerados de alta intensidad y son debidos a transiciones electrónicas de probabilidad elevada. Este hecho es relevante a la hora de integrar los cromo(fluro)ionóforos en dispositivos miniaturizados, donde se pretende que la superficie sensora sea cada vez más reducida. Debido a que las cantidades de colorante han de verse también reducidas, es la alta absorptividad molar la que asegura una señal generada en niveles de intensidad adecuados.

Las norindrocrocianinas sintetizadas muestran valores de pK_a entre neutros y ligeramente básicos, entre 6.5 y 9.7. A lo largo de un calibrado (**Figura 4.9a**), a medida que el pH de la disolución aumenta, el pico localizado alrededor de los 780 nm correspondiente a la forma ácida va disminuyendo de intensidad. Simultáneamente, aparece otro pico alrededor de 630-650 nm. Por otro lado, independientemente del pH de la disolución, todos los espectros realizados presentan un único punto en común (punto isobéptico), lo que es indicativo de un solo equilibrio entre dos especies. [24] Como se puede observar en la **Figura 4.9b**, la curva de calibrado obtenida representando la absorbancia de la longitud de onda del máximo respecto al pH es sigmoïdal y la reversibilidad, tras realizar un ciclo de pH, es del 95-98%, dependiendo del colorante. La variación del espectro en función del pH en etanol de todas las norindrocrocianinas estudiadas sigue el mismo modelo que en el caso del colorante **c2**. Estos resultados concuerdan con el equilibrio ácido-base propuesto (**Figura 4.10**), donde en medio básico el protón indólico se pierde para dar la forma básica del colorante; esta forma presenta menos deslocalización electrónica que la forma ácida, apareciendo por lo tanto su banda de absorción a longitudes de onda más cortas.

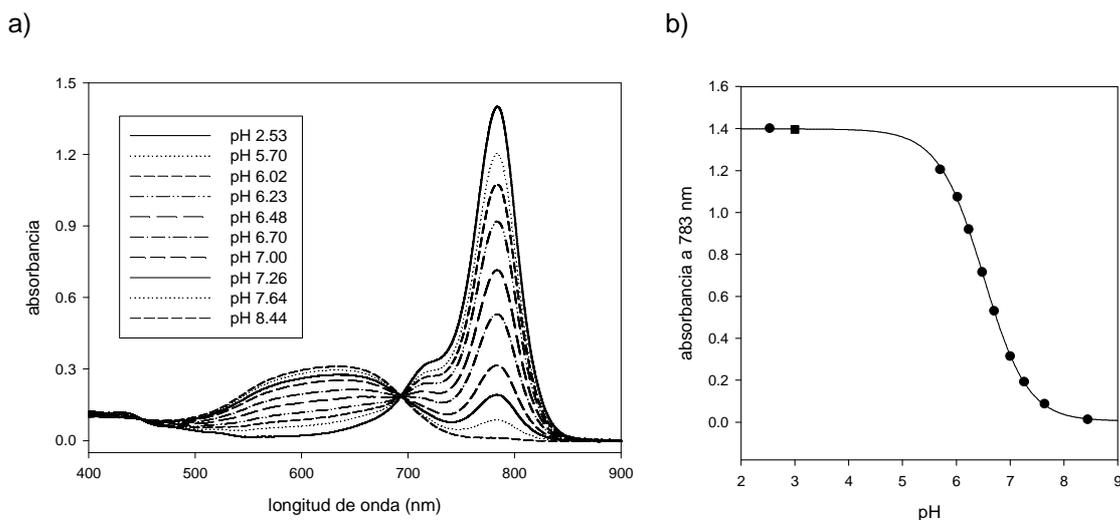


Figura 4.9. a) Espectros de absorción de la norindrocrocianina **c2** en función del pH en disolución etanólica 1.1×10^{-5} M. b) Curva de calibrado de pH correspondiente y reversibilidad (■).

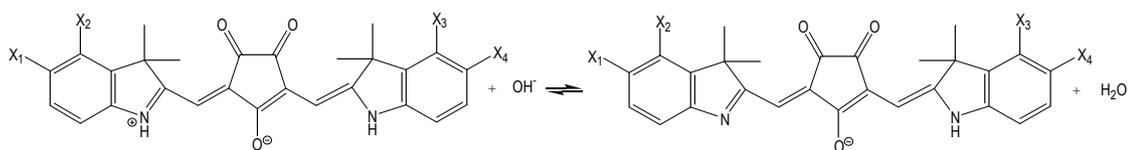


Figura 4.10. Equilibrio ácido-base propuesto para las norindrocrocianinas.

Considerando los resultados de la caracterización en disolución etanólica de las norindrocrocianinas sintetizadas en el presente trabajo como cromo(fluro)ionóforos de protón, se puede generalizar que éstas, en su forma ácida, exhiben máximos de absorbancia alrededor de los 780 nm, ofrecen un buen comportamiento ácido-base, buena reversibilidad en el proceso, altos coeficientes de absortividad molar y curvas de calibrado sigmoidales, que se ajustan al comportamiento teórico esperado.

Desde el punto de vista de la detección analítica basada en medidas de absorbancia, la región donde aparecen los picos de la forma básica es menos interesante que la zona NIR, puesto que muchas otras especies absorben en esa zona del visible pudiendo dar más interferencias. Por otro lado, el coeficiente de absortividad molar de la forma básica es inferior al de la ácida, por lo que utilizar esa longitud de onda de trabajo daría lugar a sensores menos sensibles.

4.2.1.2. Cetocianinas

A partir de los espectros de absorción de las cetocianinas, en medio ácido y básico (**Figura 4.11**), se determinaron los valores de las longitudes de onda de los máximos de absorción en cada medio y sus coeficientes de absortividad molar, reflejados en la **Tabla 4.5**.

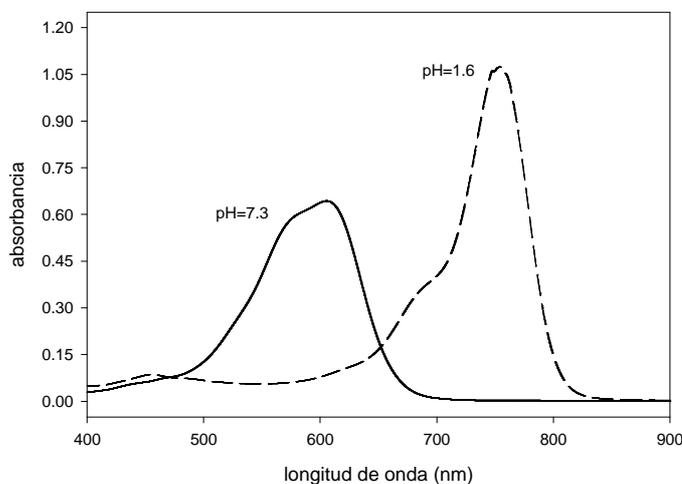


Figura 4.11. Espectros de absorción típicos de una cetocianina en disolución etanólica. En línea discontinua, la banda correspondiente a la especie ácida y en continua, a la básica, de la cetocianina **k1**.

Como en el caso de las norindrocrocianinas, la forma de los espectros de las cetocianinas es típica de los colorantes polimetínicos. La banda a longitudes de onda más largas, en el infrarrojo cercano, es la más intensa. La banda correspondiente a la forma básica, a longitudes de onda más cortas, en la zona del visible, es más ancha y presenta

una espalda vibracional, presumiblemente, debida a procesos de agregación del colorante en su forma básica. La agregación de este tipo de compuestos fue estudiada con anterioridad en el grupo de investigación. [2]

La banda de absorción de la forma ácida en medio etanólico de las cetocianinas sintetizadas se encuentra localizada entre 717 y 763 nm, lo que las hace aptas para su futura aplicación en sensores utilizando como fuente de radiación un láser a 780 nm.

Los coeficientes de absorción molar de ambas formas son altos (más que en el caso de las norindocrococianinas) y oscilan entre 9.0×10^4 y $2.8 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$. La banda de absorción correspondiente a la forma básica se encuentra localizada a longitudes de onda inferiores que en el caso de las norindocrococianinas, entre 566 y 611 nm, lo cual se explica por el acortamiento más drástico de la cadena electrónica conjugada de las cetocianinas en su forma básica.

Tabla 4.5. Longitudes de onda de los máximos de absorción (λ), en medio ácido y en medio básico, coeficientes de absorción molar (ϵ) y pK_a de las cetocianinas sintetizadas en disolución etanólica.

Colorante	Forma ácida		Forma básica		pK_a
	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$)	
k1	754.0	8.98×10^4	598.1	4.10×10^4	3.6 ± 0.2
k2	743.0	1.37×10^5	600.4	7.68×10^4	3.8 ± 0.2
k3	763.0	1.76×10^5	610.7	6.83×10^4	4.2 ± 0.1
k4	717.0	2.52×10^5	566.0	8.07×10^4	3.0 ± 0.3
k5	742.0	2.79×10^5	583.0	6.96×10^4	3.6 ± 0.1

La relación entre la estructura de las cetocianinas y sus propiedades ópticas también fue evaluada. Con este objetivo, se sintetizaron colorantes con dos tipos de heterociclos cuaternizados: benzotiazol e indolenina con distintos grupos sustituyentes. Tanto la sustitución en el heterociclo terminal (**k5**), como el uso de benzotiazol (**k1**, **k2** y **k3**) conllevaron un desplazamiento batocrómico de la longitud de onda del máximo de absorción respecto al uso de indolenina no sustituida (**k4**). [26-28] Estos núcleos heterocíclicos se combinaron para obtener cetocianinas asimétricas (**k1**, **k2** y **k3**) y simétricas (**k4** y **k5**).

Las cetocianinas son ácidos ligeramente fuertes en disolución etanólica, con valores de pK_a entre 3.5 y 4.2. Así, a valores de pH ácidos, alrededor de 2, solo existe una única banda entre 400 y 1000 nm, próxima a 750 nm. A medida que el pH de la disolución

aumenta, se observa la disminución de esta banda, al mismo tiempo que aparece un pico alrededor de 600 nm. Su punto isobéptico es único y claro (**Figura 4.12a**). A valores de pH inferiores a 2 no se observa ningún cambio en la intensidad de la banda ácida, y a valores superiores a 6 tampoco cambia la intensidad de la banda básica. Debido a este hecho y su tendencia a descomponer a pH extremos (o a agregar pH básicos), la mayoría de los estudios se realizaron entre pH=3 y pH=8.5. [28]

Los resultados concuerdan con el equilibrio ácido-base propuesto (**Figura 4.13**), en el que el protón del grupo enol (presente en la forma ácida del colorante) se pierde en medio básico, formándose el grupo cetónico y acortándose así la longitud de la cadena de dobles enlaces conjugados. La deslocalización baja el nivel energético del orbital π^* y le confiere un carácter menos antienlazante. Al disminuir la diferencia energética entre los dos niveles, la longitud de onda de la transición aumenta [29] por este motivo la banda de la forma ácida aparece a longitudes de onda mayores.

Se observó que la funcionalización de los heterociclos terminales no afecta al esquema propuesto para el equilibrio ácido-base, no obteniéndose grandes variaciones en el pK_a de los colorantes sustituidos. En el caso de la cetocianina **k3**, pese a los cambios electrónicos que el grupo hidroxilo del heterociclo experimenta al variar el pH, el espectro no se ve afectado con la aparición de nuevas bandas, por lo tanto, su comportamiento ácido-base es idéntico a las otras cetocianinas.

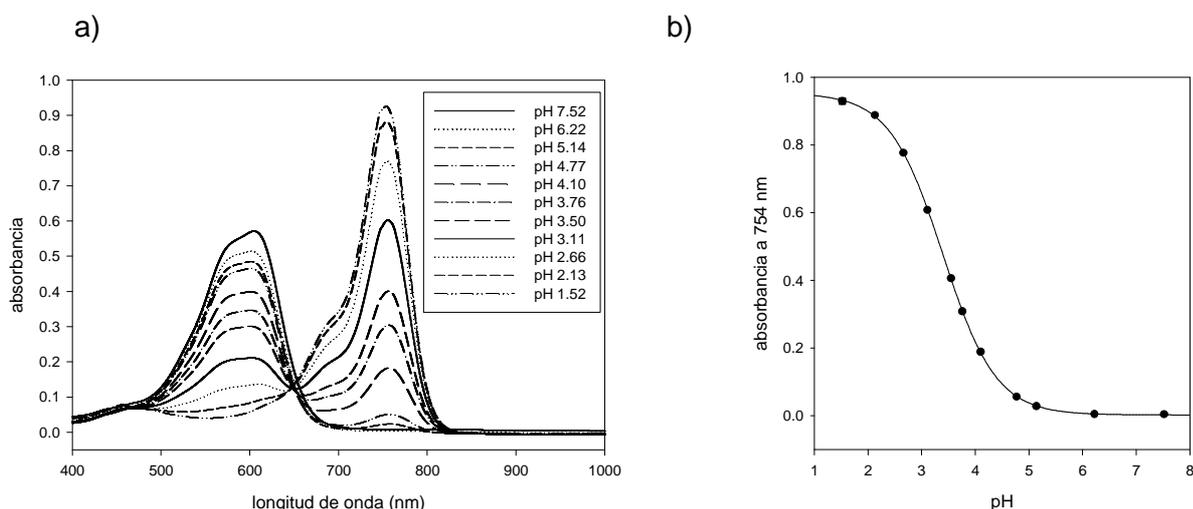


Figura 4.12. a) Espectros de absorbancia de la cetocianina **k1** en función del pH en disolución etanólica $1.0 \times 10^{-5} M$. **b)** Curva de calibrado de pH correspondiente y reversibilidad (■).

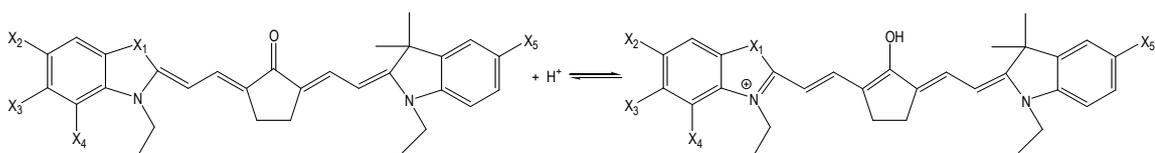


Figura 4.13. Equilibrio ácido-base propuesto para las cetocianinas.

Como se puede observar en la **Figura 4.12b**, la curva de calibrado obtenida representando la absorbancia de la longitud de onda del máximo de absorción respecto a la variación del pH es sigmoideal. La reversibilidad después de un ciclo de pH es del 99%. Sin embargo, cuando los colorantes son expuestos a disoluciones de pH extremos (tanto ácidos como básicos), se observa una disminución en la intensidad de la banda NIR, mientras aparece una nueva banda en la región UV-vis, seguramente debida a procesos de agregación. La variación del espectro en función del pH en etanol de todas las cetocianinas estudiadas sigue el mismo modelo que en el caso del colorante **k1**.

Las cetocianinas sintetizadas, en su forma ácida, exhiben máximos de absorción alrededor de los 750 nm en disolución etanólica; siguen un buen comportamiento ácido-base, reversible y reproducible; presentan coeficientes de absortividad molar altos y curvas de calibrado sigmoideales, que se ajustan al comportamiento teórico esperado. Por lo tanto, son buenas candidatas a ser posteriormente empleadas como cromo(fluro)ionóforos en optodos.

4.2.1.3. (Nor)cianinas-anilinas

A partir de los espectros de absorción de las (nor)cianinas-anilinas en disolución etanólica, en medio ácido y básico (**Figura 4.14**), se determinaron los valores de longitud de onda del máximo de absorción y sus coeficientes de absortividad molar, resumidos en la **Tabla 4.6**. En todos los casos se observó la aparición de una banda en la región del visible lejano del espectro electromagnético cerca de 650 y 670 nm, la cual fue atribuida a la forma ácida del colorante y que presenta altos coeficientes de absortividad molar, entre 3.5×10^4 y $9.3 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$. En comparación con las norindocrococianinas y las cetocianinas, las bandas son menos intensas y están desplazadas hipsocrómicamente aproximadamente unos 100 nm. La banda correspondiente a la forma básica aparece, en todos los casos, a longitudes de onda más cortas, alrededor de los 500 nm y es menos intensa, con coeficientes de absortividad molar entre 1.9×10^4 y $6.7 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{l}$.

Si se comparan las posiciones de las bandas de la forma ácida de las cianinas-anilinas con su estructura, se puede observar que el anillo central de cinco átomos de carbono provoca un desplazamiento batocrómico de unos 25 nm aproximadamente respecto a los colorantes de idéntica estructura, pero con un anillo de seis átomos de carbono en la misma posición (comparando el colorante **ca2** con **ca6**, y **ca3** con **ca5**). Por otro lado, la sustitución en la anilina con átomos electroatrayentes causa un pequeño desplazamiento hipsocrómico (**ca4**, **ca7** y **ca8**) respecto al valor base del colorante **ca6** (sin sustitución en la anilina).

Los dos tipos de colorantes hemicianina sintetizados (cianinas-anilinas y norcianinas-anilina) siguen distintos equilibrios ácido-base (**Figura 4.15** y **Figura 4.16**, respectivamente). En el caso de la norcianina-anilina, **nca1**, el hidrógeno más ácido es el enlazado al nitrógeno indólico, mientras que en las cianinas-anilinas, éste es el enlazado al nitrógeno anilínico. Los equilibrios ácido-base propuestos son consistentes con los valores de pK_a obtenidos (**Tabla 4.6**). Los colorantes cianina-anilina pierden el protón enlazado al nitrógeno de la anilina a valores de pH cercanos a la neutralidad, dando valores de pK_a entre 5.4 y 8.2. En cambio, el colorante norcianina-anilina, **nca1**, se desprotona por el hidrógeno más ácido de la indolenina, a valores de pH inferiores, dando un pK_a de 4.4. En ambas situaciones, la deslocalización de la carga positiva se pierde, resultando en un desplazamiento de la banda a longitudes de onda inferiores.

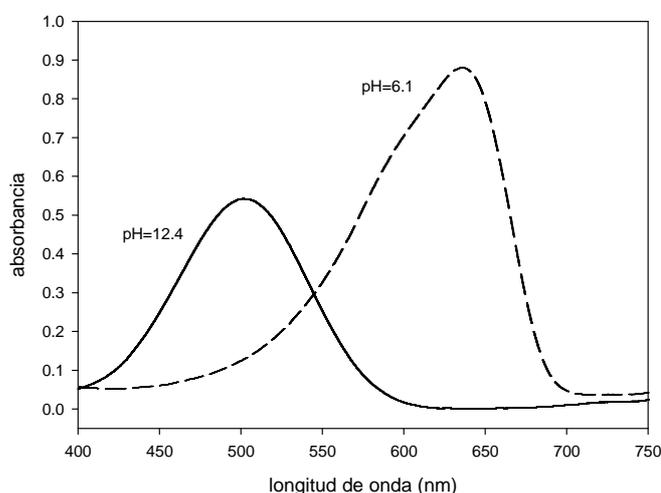


Figura 4.14. Espectros de absorción típicos de las (nor)cianinas-anilinas en disolución etanólica. En línea discontinua, la banda correspondiente a la especie ácida y en continua, a la básica, de la cianina-anilina **ca2**.

Tabla 4.6. Longitudes de onda de los máximos de absorción (λ) en medio ácido y en medio básico, coeficientes de absorptividad molar (ϵ) y pK_a de las (nor)cianinas-anilinas sintetizadas en disolución etanólica.

Colorante	Forma ácida		Forma básica		pK_a
	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	λ (nm)	ϵ ($\text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{l}$)	
ca1	636.0	8.50×10^4	501.0	5.40×10^4	8.2 ± 0.1
ca2	635.0	9.30×10^4	501.0	5.50×10^4	6.5 ± 0.2
ca3	650.0	3.50×10^4	487.0	6.70×10^4	6.1 ± 0.1
ca4	639.0	7.80×10^4	526.0	5.70×10^4	6.6 ± 0.1
ca5	673.0	3.90×10^4	494.0	1.90×10^4	5.4 ± 0.3
ca6	662.0	7.10×10^4	516.0	4.20×10^4	7.2 ± 0.2
ca7	626.0	5.70×10^4	528.0	4.50×10^4	6.1 ± 0.4
ca8	653.0	8.50×10^4	524.0	5.40×10^4	6.7 ± 0.4
nca1	662.0	5.80×10^4	474.0	3.50×10^4	4.3 ± 0.1

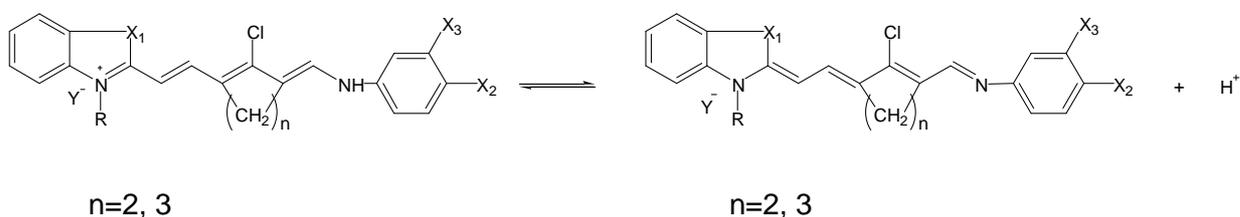


Figura 4.15. Equilibrio ácido-base propuesto para las cianinas-anilinas.

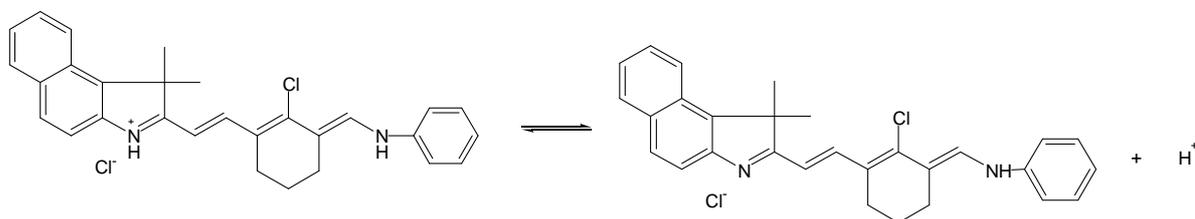


Figura 4.16. Equilibrio ácido-base propuesto para la norcianina-anilina **nca1**.

Los colorantes (nor)cianina-anilina sintetizados fueron sometidos a calibrados de pH. Como ejemplo representativo, en la **Figura 4.17** se muestran los espectros de absorción

a distintos valores de pH de la disolución etanólica y la correspondiente curva de calibrado obtenida del colorante **ca8**. Como era de esperar, ésta se ajusta a una curva sigmoïdal, como corresponde a un indicador clásico de pH. La reversibilidad del equilibrio ácido-base fue también evaluada. La absorbancia de todos los colorantes (nor)cianina-anilina volvió al 80-87% del valor inicial tras llevar a cabo un ciclo de pH.

Las (nor)cianina-anilinas sintetizadas presentan en su forma ácida máximos de absorción alrededor de los 650-670 nm en disolución etanólica; siguen un buen comportamiento ácido-base, reversible y reproducible; presentan coeficientes de absorptividad molar altos y curvas de calibrado sigmoïdales, que se ajustan al comportamiento teórico esperado. Por lo tanto, también fueron buenas candidatas a ser posteriormente empleadas como cromo(fluro)ionóforos en optodos.

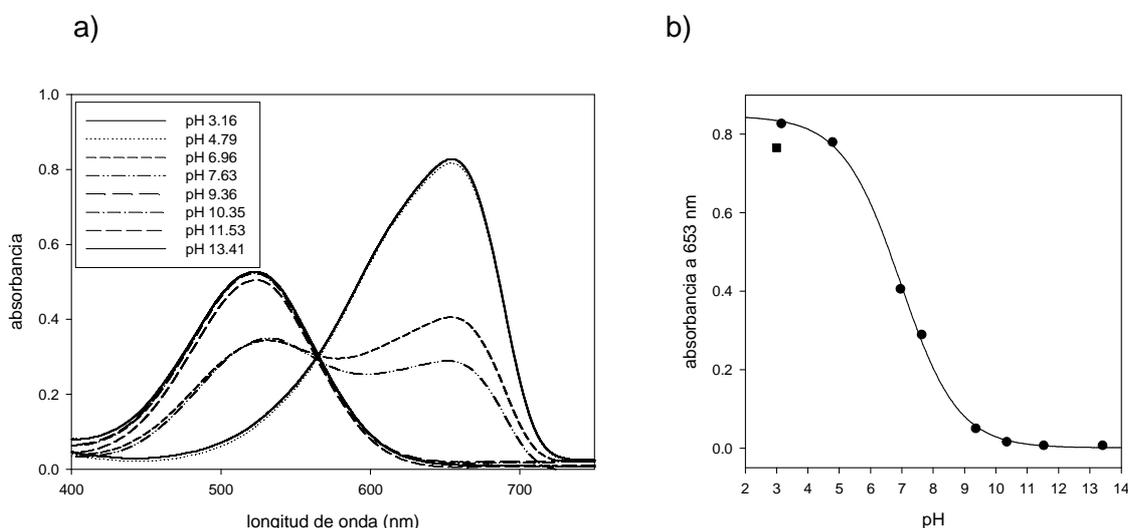


Figura 4.17. a) Espectros de absorbancia de la cianina-anilina **ca8** en función del pH en disolución etanólica $9.8 \times 10^{-6} \text{M}$. b) Curva de calibrado de pH correspondiente y reversibilidad (■).

4.2.2. Estudios en membrana

4.2.2.1. Estudios ácido-base de los cromo(fluro)ionóforos

Los prometedores resultados obtenidos en disolución etanólica con los colorantes sintetizados en términos de altos coeficientes de absorptividad molar, reversibilidad, equilibrios ácido-base entre solo dos especies (puntos isobécticos bien definidos) así como en la posición de sus máximos de absorbancia, llevaron a abordar su caracterización como cromo(fluro)ionóforos en optodos de PVC plastificado para su aplicación en sensores

ópticos. Los estudios realizados estaban dirigidos a la determinación en la fase membrana de la longitud de onda de máxima absorción; el comportamiento ácido-base realizando calibrados de pH y el cálculo del pK_a (pK_{aMEM}); la evaluación de la fotoestabilidad y la exudación de los componentes de la membrana y la determinación del tiempo de respuesta de los optodos. En primera aproximación, los coeficientes de absortividad molar se consideran invariables respecto a los valores obtenidos en disolución. Sin embargo, se espera un cambio en la posición de las longitudes de onda de los máximos de absorción debido a la distinta polaridad del nuevo medio, básicamente dependiente del disolvente mediador o plastificante utilizado para la formulación de la membrana. De igual forma, se esperan alteraciones en la basicidad de los colorantes en membrana. Se calcula un pK_a aparente (pK_{aMEM}), que depende intensamente de la composición de la membrana y de su mecanismo de respuesta. Este parámetro es relevante ya que es el que definirá en última instancia el intervalo operacional del optodo, tanto para el de pH, como para las membranas selectivas a iones.

Para las cetocianinas y de las (nor)cianinas-anilinas, que dieron resultados más prometedores en cuanto a su comportamiento ácido-base, se determinan otros parámetros como el tiempo de respuesta, la fotodescomposición y la exudación del cromo(fluro)ionóforo (directamente relacionada con su lipofilidad). Estos dos últimos factores son importantes ya que limitan el tiempo de vida de la membrana. Los resultados obtenidos permitirán establecer las condiciones de trabajo óptimas de futuros sensores a desarrollar.

Se escogieron los porcentajes en peso de cada componente en la membrana partiendo de la base que las señales deben ser suficientemente altas (valores de absorbancia entorno a 0.2 unidades de absorbancia) y siguiendo los estudios previos realizados en el grupo de investigación con otros tipos de colorantes en membranas de PVC plastificado. [30,31] El aditivo se eligió con el fin de favorecer la estabilidad de los componentes en la membrana y asegurar el mecanismo de intercambio iónico entre ésta y la disolución, es decir según la carga del cromo(fluro)ionóforo en la membrana y el analito a estudiar. Por lo tanto, se utilizó un aditivo catiónico para las membranas que incorporan norindrocrocianinas (moléculas cargadas negativamente en su forma básica) y un aditivo aniónico para las membranas de pH que incorporan cetocianinas (moléculas cargadas positivamente en su forma ácida) y (nor)cianinas-anilinas (moléculas cargadas positivamente en su forma ácida).

Norindocrococianinas

Las membranas se prepararon utilizando como disolvente mediador el sebacato de bis(2-etilhexilo) (DOS) y un exceso del 10% en peso de aditivo catiónico (bromuro de tetraoctilamonio) respecto al cromo(fluoro)ionóforo. Aparentemente, los cócteles obtenidos no mostraban precipitación del colorante, por lo que se depositaron sobre portaobjetos de vidrio membranas perfectamente homogéneas.

Se registraron los espectros de absorción de las membranas entre 400 y 900 nm. Las membranas acabadas de depositar mostraron bandas de absorción en la zona del infrarrojo cercano, lo cual indica que los colorantes se encontraban en su forma ácida.

Las longitudes de onda del máximo de absorción correspondientes a las formas ácidas de las norindocrococianinas se desplazaron batocrómicamente unos 20 nm respecto a etanol y se localizaron entre 779 y 830 nm. Así pues, estas membranas podían ser utilizadas en el desarrollo de sensores miniaturizados utilizando un láser de diodo emitiendo a 780 nm. Del mismo modo, los picos correspondientes a la forma básica se han desplazado batocrómicamente unos 26 nm, localizándose así entre 654 y 683 nm. Sin embargo, se mantuvo la relación entre la sustitución y la posición de las bandas (apartado § 4.2.1): el colorante sin funcionalización en el heterociclo (**c6**) es el que presentaba una longitud de onda más corta respecto al resto de colorantes sustituidos.

Los espectros de absorbancia revelaron, no obstante, la formación de agregados con bandas de absorción poco intensas localizadas alrededor de los 425 nm. En los espectros realizados con todas las membranas a lo largo de un ciclo de pH, se aprecian dos puntos isosbéticos claros (**Figura 4.18**), lo que indica la existencia de dos equilibrios. Así mismo, las curvas de calibración obtenidas representando la intensidad del máximo de absorción respecto al aumento de pH mostraron dos puntos de inflexión indicativos de dos posibles pK_a . Sin embargo, éstos no se manifestaron en el sentido inverso de cambio de pH, mostrando un único punto de inflexión correspondiente al valor esperado de pK_{aMEM} para estos cromo(fluoro)ionóforos. La formación de agregados es máxima a valores de pH ácidos (primer pK_a obtenido), cuando el colorante en su forma ácida y con carga neta cero establece un equilibrio de agregación entre la forma monomérica y la agregada. Tras realizar varios ciclos de pH, se obtiene una curva con un solo punto de inflexión en ambos sentidos. Podemos atribuir este cambio, a una estabilización tardía de una cierta cantidad de agregado, dejando de depender del pH. Se estableció un mínimo de tres ciclos de pH para la obtención del comportamiento ácido-base esperado, con un solo punto de inflexión. [32]

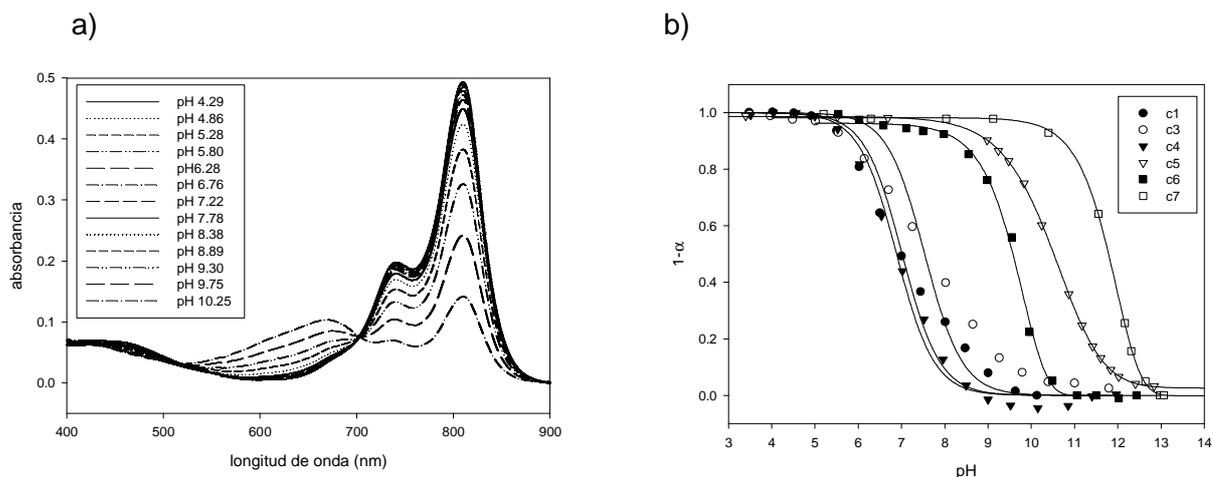


Figura 4.18. a) Espectros de absorbancia a lo largo de un ciclo de pH de la especie ácida del colorante **c1** en membrana de PVC plastificado. **b)** Curvas de calibrado normalizadas de las norindrocrocianinas evaluadas en membrana. Se representa el grado de desprotonación del cromo(fluro)ionóforo respecto al pH de la disolución tampón. Las líneas corresponden al ajuste teórico de los valores experimentales.

Los ciclos completos de pH demostraron la completa reversibilidad del equilibrio ácido-base de las norindrocrocianinas, pero se observó la existencia de histéresis propia de equilibrios entre dos fases, lo que implica la obtención de diferentes valores de pK_{aMEM} en función del sentido de variación del pH.

Los valores de pK_{aMEM} de las norindrocrocianinas en membranas de PVC plastificado (obtenidos después de tres ciclos de pH) son entre neutros y básicos, entre 6.9 y 12.1, pero no todos siguen la misma tendencia respecto a los valores en etanol. Mientras que los colorantes **c1**, **c5** y **c6** son ligeramente más básicos en este medio, **c3** y **c4** son más ácidos y, en el caso de **c7**, su pK_a aumenta hasta en 3.5 unidades de pH. Hay que tener en cuenta la dependencia de esta constante de acidez aparente de la composición de la membrana y de los equilibrios entre fases que tienen lugar. Se observó que el colorante **c2** no es estable en el medio membrana. Así, mientras en disolución etanólica se observaba un espectro vis-UV con bandas intensas, la membrana de PVC plastificado que contenía el colorante **c2** se volvía grisácea y su espectro no mostraba ninguna banda significativa. Este hecho muy probablemente se debe a la presencia de grupos nitro en los heterociclos, los cuales confieren inestabilidad al colorante debido a su naturaleza.

En la **Tabla 4.7** se muestran los valores de las longitudes de onda de los máximos de absorción de la forma ácida y básica en membrana, así como la caracterización de la respuesta analítica de los optodos en cuanto a sensibilidad (pendiente de la zona lineal de la

curva de calibrado y variación total de absorbancia) y a tiempo de respuesta al 95% de la señal.

Tabla 4.7. Longitudes de onda de los máximos de absorción de las formas ácida ($\lambda_{\text{ácida}}$) y básica ($\lambda_{\text{básica}}$) en membrana de las norindrocrocianinas y caracterización de la respuesta analítica de las membranas formuladas.

Colorante	$\lambda_{\text{ácida}}$ (nm)	$\lambda_{\text{básica}}$ (nm)	pK_{aMEM}	Pendiente ($\Delta\text{Abs}\cdot\text{pHdec}^{-1}$)	Variación máxima de absorbancia	$t_{\text{r95\%}}$ (min)
c1	810.0	667.0	7.0 ± 0.1	-0.114	0.474	2.80
c2	*	*	*	*	*	*
c3	830.0	668.0	7.7 ± 0.1	-0.012	0.051	3.10
c4	813.0	663.0	6.9 ± 0.2	-0.061	0.214	2.50
c5	792.0	654.0	10.4 ± 0.2	-0.043	0.100	-
c6	779.0	657.0	9.8 ± 0.1	-0.074	0.232	6.70
c7	817.0	683.0	12.1 ± 0.1	-0.050	0.121	1.30

*inestable en membrana

Los valores obtenidos en cuanto a pendiente de la recta de calibrado, variación total de la señal y tiempo de respuesta (del orden de pocos minutos) (**Tabla 4.7**) demuestran que los optodos basados en norindrocrocianinas son altamente sensibles y de respuesta rápida.

Cetocianinas

Se prepararon membranas incorporando las cetocianinas estudiadas previamente en solución etanólica utilizando como disolvente mediador el Tris(2-etilhexil)fosfato (TOPH). En su composición se mantuvo una relación equimolar entre colorante y aditivo lipofílico aniónico. Primeramente, se realizó la evaluación de los colorantes **k4** y **k5**. [28] Los cócteles obtenidos con ellos no mostraban precipitación ni agregación, por lo que las membranas depositadas sobre portaobjetos de vidrio fueron perfectamente homogéneas. Se registraron los espectros de absorción entre 400 y 850 nm. Las membranas acabadas de depositar mostraban una banda en la zona del visible, lo cual indica que los colorantes se encuentran en su forma básica.

Las longitudes de onda de la especie ácida se encuentran localizadas entre 735 y 777 nm, cercanas a los 750 y 780 nm, lo que significa un desplazamiento batocrómico de entre 10-24 nm respecto en etanol. Las longitudes de onda de la especie básica se localizan entre

519 y 567 nm, lo que representa un desplazamiento hipsocrómico de entre 26-47 nm respecto en etanol (**Tabla 4.8**). Este desplazamiento es muy superior al que sufren las norindrocrocianinas y las cianinas-anilinas al ser disueltas en membranas de PVC plastificado, ya que las cetocianinas, como se explica en el apartado § 1.4.2.4, son más sensibles al disolvente.

Los espectros de absorbancia realizados en función del pH para **k3**, **k4** y **k5** muestran la presencia de un único punto isobéptico, característico del equilibrio ácido-base entre las especies ceto y enol de las cetocianinas. Sin embargo, a valores de pH elevados ($\text{pH} > 8.5$) se observa un desplazamiento del mismo, que puede atribuirse a la descomposición química de los colorantes en medio básico. Por esta razón, deben mantenerse las membranas en una disolución tampón a pH ácido hasta su utilización. En el caso de **k2**, durante los primeros ciclos de pH no se observó un solo punto isobéptico. Del mismo modo que las norindrocrocianinas, se verificó la formación de una banda de agregación creciente con el aumento del pH alrededor de los 450 nm, que desaparecía tras tres ciclos de pH, por lo que se tomó como valor de pK_{aMEM} definitivo el obtenido a partir del cuarto calibrado.

Mientras que los valores de pK_{a} de las cetocianinas en etanol eran ácidos, el valor de su pK_{a} en membranas de PVC plastificado experimentó un aumento. Su pK_{aMEM} se aproxima así a la neutralidad, entre 6.4 y 7.8, lo que las hace apropiadas para su uso en medios menos extremos. El gran incremento de pK_{a} que se observa en las cetocianinas en membrana podría explicarse por el hecho de que el cromo(fluro)ionóforo en su forma protonada y cargado positivamente, está menos estabilizado en una fase orgánica; así, es necesario un pH más alto para que el colorante se desprotone.

Finalmente, se evaluaron algunos parámetros de calidad analítica como la sensibilidad y el tiempo de respuesta. Los valores obtenidos (**Tabla 4.8**) demuestran la idoneidad de los optodos formulados para su utilización en el desarrollo de sensores.

La exudación de los optodos basados en cetocianinas se evaluó tanto en medio ácido ($\text{pH}=3$) como en medio básico ($\text{pH}=8$), realizando espectros de absorbancia a determinados intervalos de tiempo, mientras las membranas estaban en continuo contacto con una disolución tampón. Los resultados obtenidos muestran la ausencia de exudación del colorante en su forma ácida. En cambio, se observó una ligera disminución del pico correspondiente a la forma básica (de hasta un 3% durante las primeras dos horas del estudio). Esta atenuación no es atribuida a la exudación, ya que los espectros de la disolución tampón no mostraron los picos característicos de los colorantes. Se asume una descomposición química debida al pH básico.

Tabla 4.8. Longitudes de onda de los máximos de absorción de las formas ácida ($\lambda_{\text{ácida}}$) y básica ($\lambda_{\text{básica}}$) de las cetocianinas en membrana y caracterización de la respuesta analítica.

Colorante	$\lambda_{\text{ácida}}$ (nm)	$\lambda_{\text{básica}}$ (nm)	pK_{aMEM}	Pendiente ($\Delta\text{Abs}\cdot\text{pHdec}^{-1}$)	Variación máxima de absorbancia	$t_{\text{r95\%}}$ (min)
k2	753.0	555.0	6.4 ± 0.1	-0.054	0.095	3.20*
k3	777.0	567.0	6.6 ± 0.1	-0.066	0.169	1.80
k4	735.0	519.0	7.3 ± 0.1	-0.090	0.014	3.60
k5	766.0	557.0	7.8 ± 0.1	-0.060	0.228	2.90

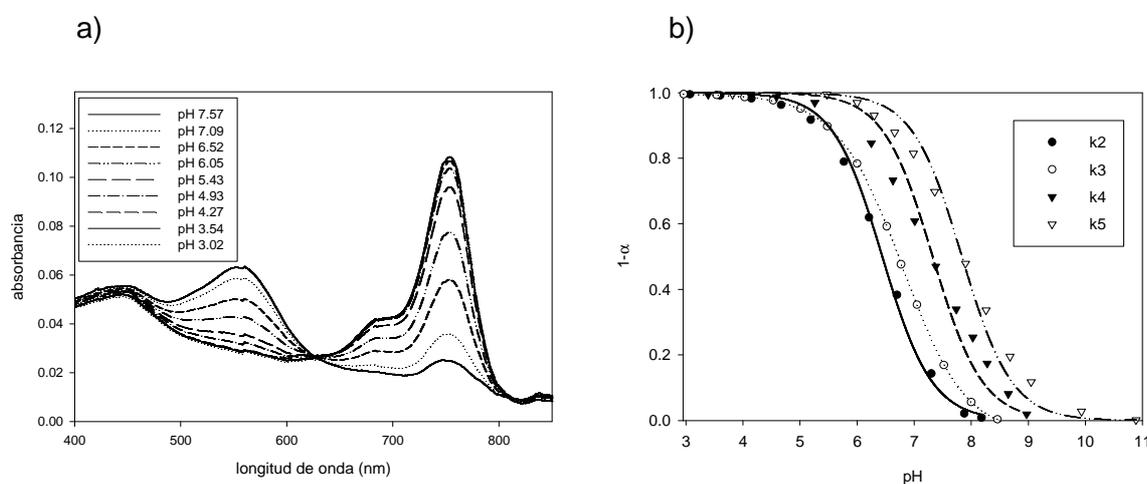


Figura 4.19. a) Espectros de absorción a lo largo de un ciclo de pH del colorante **k2** en membrana de PVC plastificado. b) Curvas de calibrado normalizadas de las cetocianinas evaluadas en membrana. Se representa el grado de desprotonación frente al pH de la disolución tampón. Las líneas corresponden a las curvas teóricas ajustadas a los valores experimentales.

Los estudios de fotodescomposición de los colorantes en fase membrana se realizaron en condiciones tanto secas (se evalúa el efecto de la luz combinado con el del oxígeno), como en húmedas, (se irradian las membranas en contacto con una disolución con luz monocromática correspondiente a la longitud de onda del máximo de absorción de cada colorante). En condiciones húmedas, se evaluó tanto la fotoestabilidad de la forma ácida de los colorantes, como de su forma básica. Estos estudios revelaron la susceptibilidad de las cetocianinas a la fotodescomposición cuando son iluminadas por fuentes de luz de alta intensidad en ambas formas, con excepción de la cetocianina **k3**, cuya forma básica es estable a lo largo del estudio, y de **k4** y **k5**, cuyas formas ácidas resultaron estables después

de 2 horas de exposición a la fuente de luz. Los tiempos de vida medios ($t_{1/2}$) que fueron calculados cuando los colorantes fueron sometidos a las distintas condiciones experimentales se muestran en la **Tabla 4.9**.

Tabla 4.9. Tiempos de vida medios ($t_{1/2}$) de las cetocianinas evaluadas en membranas de PVC plastificado en condiciones secas y húmedas.

Colorante	Condiciones secas ^a , $t_{1/2}$ (min)	Condiciones húmedas ^b	
		Forma ácida, $t_{1/2}$ (min)	Forma básica, pérdida de absorbancia (%)
k2	15.0	112.0	98.0
k3	14.0	401.0	estable
k4	6.9	estable	0.1
k5	15.4	estable	0.7

^a con una lámpara halógena (500 W) a 150 cm de distancia durante 2h.

^b con luz monocromática a la longitud de onda del máximo de absorción.

Los reducidos tiempos de vida medios calculados (máximo 15 minutos) de las cetocianinas en condiciones secas reflejan, como era de esperar, la intensa fotooxidación que sufren. En cambio, al realizar los experimentos en condiciones húmedas y con luz monocromática, sin el efecto del oxígeno (a pesar del oxígeno disuelto), los colorantes evaluados son prácticamente estables. En realidad, estas condiciones se asemejarán a las de una futura aplicación, por lo que su utilización es viable.

En el caso de las cetocianinas **k2**, **k3**, **k4** y **k5** es difícil establecer una relación estructura-estabilidad, ya que las diferencias en los tiempos de vida medios no son muy significativas, exceptuando el colorante **k2**, que es claramente más inestable que el resto. Como hipótesis, se podría pensar que el heterociclo común a **k2** y **k3** (benzotiazol, con un anillo aromático más que la indolenina) es más susceptible a la fotodegradación respecto al de **k4** y **k5** (indolenina), y que en el caso de **k3**, su fotoestabilidad se ve incrementada por la presencia del grupo hidroxilo que estabiliza la molécula en condiciones húmedas.

Según estos resultados, y para asegurar la máxima estabilidad de los optodos durante su utilización, se decidió almacenar siempre las membranas en una disolución tampón ácida y resguardadas de la luz.

(Nor)cianinas-anilinas

Las membranas se prepararon utilizando como disolvente mediador el sebacato de bis(2-etilhexilo) (DOS) y como aditivo aniónico el tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio, en

proporción equimolar con el cromo(fluro)ionóforo. Los cócteles obtenidos no mostraban precipitación ni agregación del colorante, exceptuando la cianina-anilina **ca1**, por lo que se depositaron membranas perfectamente homogéneas del resto de colorantes sobre portaobjetos de vidrio.

Se registraron los espectros de absorción de las membranas entre 400 y 800 nm (**Figura 4.20a**). Las membranas acabadas de depositar mostraron una banda en la zona del infrarrojo cercano, lo cual indica que los colorantes se encuentran en su forma ácida. Las longitudes de onda ácidas se encuentran localizadas entre 644 y 681 nm, cercanas a los 650 nm, por lo que son idóneas para su futura utilización en el desarrollo de sensores miniaturizados utilizando un láser de diodo emitiendo a 650 ó 670 nm. Estos valores representan un desplazamiento batocrómico de entre 8-18 nm respecto en etanol. Las longitudes de onda básicas se encuentran entre 460 y 523 nm, lo que significa un ligero desplazamiento hipsocrómico de entre 4 y 14 nm respecto en etanol, excepto en el caso del colorante **ca6**, que sufre un desplazamiento batocrómico de 7 nm. Como era de esperar, debido al solvatocromismo (apartado § 1.4.2.4), las longitudes de onda del máximo de absorción de los colorantes se ven desplazadas respecto a los valores en disolución, debido a que el solvente mediador de la membrana es menos polar que el etanol. En el caso de la forma ácida (cargada) en etanol, el estado fundamental está más estabilizado que el estado excitado, que es menos polar. Por el contrario, para la forma básica (neutra) en etanol, el estado fundamental es menos polar que el excitado y el disolvente polar, el etanol, estabiliza más el estado excitado.

Se realizó el estudio del comportamiento ácido-base en el medio membrana efectuando calibrados de pH siguiendo la intensidad del máximo de absorción de la banda correspondiente a la forma ácida de los cromo(fluro)onóforos. Se observó un único punto isobéptico bien definido en todos los casos, lo cual indica un solo equilibrio entre dos especies. Así mismo, las curvas de calibración obtenidas (**Figura 4.20b**) son de forma sigmoideal, indicando un comportamiento ácido-base correcto que involucra a dos especies. Aunque los colorantes sintetizados tienen estructuras distintas, lo cual afecta a la posición de las bandas, la mayoría originan curvas de calibrado y valores de pK_{aMEM} parecidos, exceptuando el colorante **nca1**, la única norcianina-anilina sintetizada en el presente trabajo y que sigue un equilibrio ácido base distinto. Mientras los valores de pK_a de las (nor)cianinas-anilinas eran cercanos a la neutralidad en etanol, al ser disueltas en membranas de PVC plastificado, el valor de su pK_a experimenta un gran aumento, hacia valores muy básicos, entre 9.5 y 11.3 (**Tabla 4.10**). Los datos experimentales obtenidos para los calibrados de las cianinas-anilinas correlacionan bien con las curvas teóricas, excepto

para el caso de la norcianina-anilina, **nca1**, donde se observan ligeras diferencias. Este hecho podría atribuirse al incumplimiento de alguna de las premisas generales que la ecuación de respuesta de membrana de un optodo asume (apartado § 1.3.2). En todos los casos, el intervalo lineal cubre dos unidades de pH. Además, al realizar ciclos de pH en ambos sentidos, no se observó histéresis.

Finalmente se evaluaron parámetros de calidad como sensibilidad y tiempo de respuesta. Los valores calculados para el tiempo de respuesta al 95% de la señal son del orden de los dos minutos.

Tabla 4.10. Longitudes de onda de los máximos de absorción de las formas ácida ($\lambda_{\text{ácida}}$) y básica ($\lambda_{\text{básica}}$) de las (nor)cianinas-anilinas en membrana y caracterización de la respuesta analítica.

Colorante	$\lambda_{\text{ácida}}$ (nm)	$\lambda_{\text{básica}}$ (nm)	pK_{aMEM}	Pendiente ($\Delta\text{Abs}\cdot\text{pHdec}^{-1}$)	Variación máxima de absorbancia	$t_{95\%}$ (min)
ca1	*	*	*	*	*	*
ca2	645.0	497.0	10.5±0.1	-0.225	0.530	2.28
ca3	659.0	476.0	10.2±0.2	-0.130	0.440	1.19
ca4	652.0	521.0	11.0±0.4	-0.085	0.240	0.94
ca5	681.0	487.0	10.7±0.3	-0.178	0.470	1.41
ca6	670.0	523.0	11.3±0.4	-0.096	0.220	1.69
ca7	644.0	517.0	10.9±0.4	-0.064	0.190	1.43
ca8	667.0	518.0	10.6±0.2	-0.141	0.360	1.47
nca1	680.0	460.0	9.5±0.1	-0.067	0.190	1.06

*pico no observable

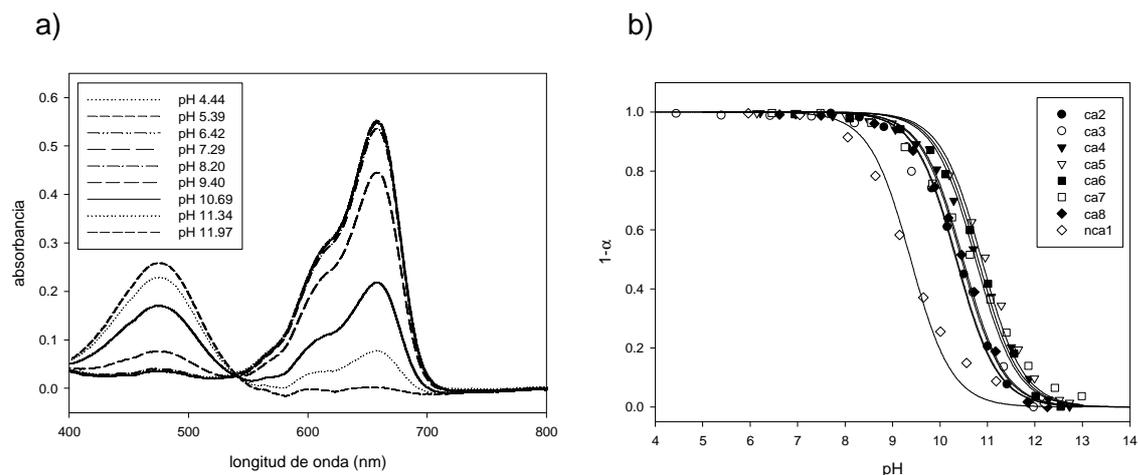


Figura 4.20. a) Espectros de absorbancia a lo largo de un ciclo de pH del colorante **ca3** en membrana de PVC plastificado. b) Curvas de calibrado normalizadas de las (nor)cianinas-anilinas evaluadas en membrana. Se representa el grado de desprotonación en función del pH de la disolución tampón. Las líneas corresponden a las curvas teóricas ajustadas a los valores experimentales.

La reversibilidad se estudió en un sistema en flujo continuo, sometiendo a los colorantes disueltos en la fase membrana a ciclos de pH entre los dos valores de pH extremos. La absorbancia fue registrada continuamente a la longitud de onda del máximo de absorción de las especies ácidas de los colorantes (**Figura 4.21**). Aunque se observa una pequeña deriva positiva de la señal cuando el medio es básico, el valor de absorbancia a pH ácido de todos los colorantes estudiados quedó inalterado tras cinco ciclos de pH consecutivos.

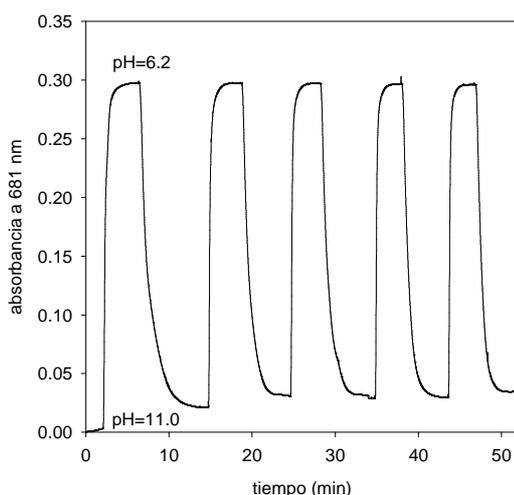


Figura 4.21. Evaluación experimental representativa de la reversibilidad de los colorantes nor(cianina)anilinas sintetizados (**ca5**) en membranas de PVC plastificado en contacto con una disolución de tampón combinado, realizada en un sistema de flujo continuo.

La fotoestabilidad de los colorantes (nor)cianina-anilina no se vio comprometida cuando éstos fueron expuestos a la longitud de onda del máximo de absorción ni en su forma ácida (pH=3) ni en la básica (pH=8) utilizando un espectrofotómetro. Sin embargo, cuando las membranas secas fueron expuestas a una fuente de luz más intensa, como una lámpara halógena de 500 W, se observó una relativamente rápida descomposición en todos los casos. Además, exceptuando las cianinas **ca2**, **ca3** y **nca1**, los colorantes presentaron fotoagregación (agregación provocada por la exposición a una fuente de luz), lo cual se evidenció con la aparición de una banda ancha adicional a longitudes de onda alrededor de los 400 nm (**Figura 4.22**). Con el objetivo de comparar la fotoestabilidad de los colorantes y además poderla correlacionar con su estructura se calcularon los tiempos de vida medios. En la **Tabla 4.11** puede verse como los colorantes que no fotoagregaron (**ca2**, **ca3** y **nca1**) exhiben tiempos de vida superiores que el resto. Por otro lado, la cianina **ca5**, con un tiempo de vida relativamente largo, formó un agregado después de la primera hora del experimento. En este sentido, si se compara el colorante **ca2** con **ca6** y **ca3** con **ca5**, puede concluirse que un anillo central de seis átomos de carbono confiere más fotoestabilidad que un anillo de cinco átomos de carbono en la misma posición. Por lo que a los heterociclos terminales se refiere, puede afirmarse que los colorantes derivados de la indolenina son más estables que los derivados del benzotiazol. Las curvas de fotodescomposición de los colorantes cuando fueron expuestos a un láser que emite a 650 nm no siempre se ajustaron a una exponencial. Con el objetivo de poder comparar los diferentes colorantes, y considerando su futura aplicación, se calcularon los porcentajes de fotodescomposición después de dos horas de exposición a la luz. Los comportamientos de fotodegradación de los colorantes al ser expuestos a luz halógena y luz láser respectivamente fueron muy diferentes, seguramente debido a las distintas condiciones de ambos experimentos y a la longitud de onda de irradiación. Como era de esperar, la fotodegradación fue más acusada cuando se empleó luz UV que cuando se usaron láseres de diodo para irradiar los optodos. De hecho, cuando los optodos fueron irradiados utilizando un láser de diodo, ninguno de ellos descompuso totalmente. En algún caso, este hecho era debido probablemente a la gran diferencia existente entre la longitud de onda del máximo de absorción del colorante y la longitud de onda de emisión del diodo láser (650 nm). Además, cabe remarcar que en los experimentos bajo la luz halógena, realizados en condiciones secas, los optodos estaban expuestos al aire, el cual acelera los procesos de descomposición de los colorantes por la acción del oxígeno singlete. Sin embargo, considerando que el colorante **ca3** absorbe a una longitud de onda muy cercana a la longitud de onda de emisión del láser y que su fotoestabilidad es superior que el resto (solo descompone un 25% después de dos horas de

experimento), se ratifica que un anillo de seis miembros es más estable que uno de cinco, y que los colorantes basados en un heterociclo de indolenina son más estables que los colorantes basados en benzoindolenina y benzotiazol.

Tabla 4.11. Tiempos de vida medios calculados ($t_{1/2}$) de la forma ácida de los colorantes (nor)cianina-anilina en membrana, cuando fueron irradiados con una lámpara halógena (500 W, a 150 cm durante 2h, en condiciones secas) y porcentaje de descomposición al ser irradiadas en condiciones húmedas con un diodo láser que emite a 650 nm (pH=3).

Colorante	$t_{1/2}$ (min)	Porcentaje de descomposición (%)
ca2	38.8	46
ca3	247.0	25
ca4	18.9	44
ca5	37.2	60
ca6	10.0	57
ca7	8.9	43
ca8	8.0	49
nca1	218.0	57

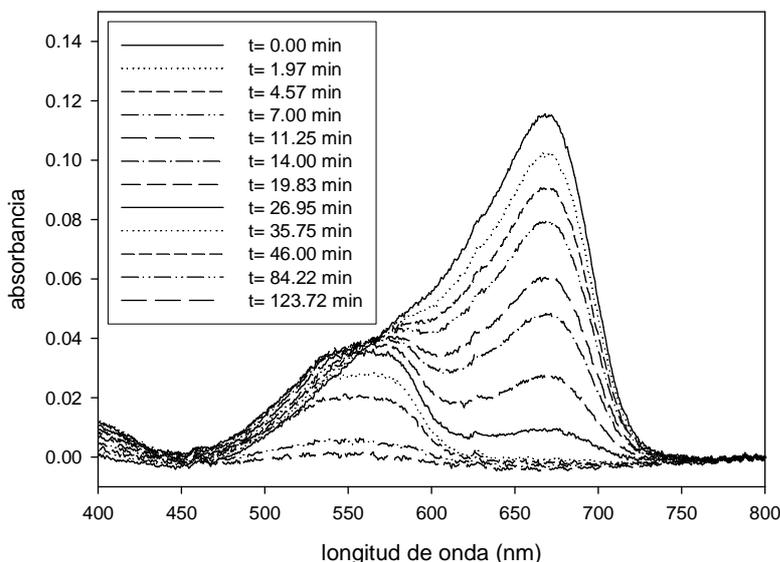


Figura 4.22. Espectros de absorbancia del colorante **ca6** en membrana de PVC plastificado bajo irradiación de una lámpara halógena en el que se muestra la fotoagregación.

En general, las membranas formuladas y caracterizadas con (nor)cianinas-anilinas exhibieron un comportamiento analítico adecuado para la determinación de pH, lo cual demuestra su viabilidad como cromo(fluro)ionóforos en el desarrollo de optodos selectivos a iones para futuras aplicaciones analíticas. Se obtuvieron optodos rápidos, reversibles y sensibles, aunque la baja estabilidad de algunos de los colorantes es todavía un inconveniente por resolver. Sin embargo, de entre los diversos tipos de colorantes cianina evaluados, la mayoría de las (nor)cianinas-anilinas sintetizadas presentan una relativamente alta fotoestabilidad en membrana.

De los estudios realizados con los tres tipos de cianinas en membranas de PVC plastificado (norindocroconinas, cetocianinas y (nor)cianinas-anilinas) se concluye que, en general, son aptas para su aplicación como cromoionóforos en optodos selectivos a iones. Para futuros ensayos, solo descartaríamos la norindocrococianina **c2** y la cetocianina **k2**, por ser inestables en membrana y la (nor)cianina-anilina **ca1** por no observarse ninguna banda en su espectro UV-vis. El resto de colorantes evaluados son candidatos al estudio de su emisión de fluorescencia para el desarrollo de fluorosensores.

Las norindocrococianinas, aunque en principio presenten dos puntos isobésticos e histéresis derivados de la formación de agregados, al cabo de tres calibrados presentan un adecuado comportamiento ácido-base. Además, son completamente reversibles; sus formas ácidas presentan bandas intensas cerca de los 780 nm; sus valores de pK_{aMEM} son entre neutros y básicos; su tiempo de respuesta es del orden de pocos minutos y su sensibilidad es adecuada.

En segundo lugar, las cetocianinas, con un solvatocromismo pronunciado, exhiben bandas intensas correspondientes a su forma ácida cerca de los 750 y 780 nm; presentan un punto isobéstico bien definido; son reversibles; sus valores de pK_{aMEM} están cerca de la neutralidad; no exudan; son estables en soluciones ácidas; su tiempo de respuesta es del orden de pocos minutos y son suficientemente sensibles.

Por último, las (nor)cianinas-anilinas presentan un comportamiento ácido-base adecuado, con un único punto isobéstico bien definido; sus formas ácidas presentan bandas intensas cercanas a los 650 nm; sus valores de pK_{aMEM} son básicos; son reversibles y fotoestables; presentan una adecuada sensibilidad y su respuesta es rápida (del orden de minutos).

4.2.2.2. Evaluación del comportamiento de los cromo(fluoro)ionóforos en combinación con un ionóforo: optodos selectivos a ion potasio y a ion plomo (II)

Como compuesto demostrador de la aplicabilidad de los cromo(fluoro)ionóforos de pH sintetizados en la preparación de membranas selectivas de iones, se escogió la cianina-anilina **ca3**. Este colorante presentaba óptimas características en cuanto a comportamiento ácido-base, pK_{aMEM} , posición de la longitud de onda de absorción máxima (lo más cercana a la emisión de uno de los láseres de diodo emitiendo a 650, 670 o 780 nm), alta sensibilidad, reversibilidad y fotoestabilidad, para formular membranas selectivas a iones en combinación con un ionóforo.

En primer lugar, se formularon membranas selectivas de ion potasio utilizando valinomicina como ionóforo selectivo. Este antibiótico ha sido ampliamente estudiado en sistemas potenciométricos para la determinación de potasio. La membrana así formulada se caracterizó en absorbancia y más adelante en fluorescencia.

Posteriormente, utilizando el mismo cromo(fluoro)ionóforo y cambiando el ionoforo, se formuló una membrana selectiva a plomo que fue caracterizada también como optodo de absorbancia y de fluorescencia.

*Formulación y caracterización en absorbancia de un optodo selectivo a potasio que incorpora la cianina-anilina **ca3***

Para el desarrollo del optodo selectivo a ion potasio se utilizó el ionóforo valinomicina y como cromoionóforo, la cianina-anilina **ca3**. Se formularon diversas membranas con distintas proporciones de colorante (**ca3**)/aditivo aniónico (tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio)/ionóforo (valinomicina) y empleando dos tipos de plastificantes, DOS y TOPH. Las composiciones de las membranas que se ensayaron están resumidas en la **Tabla 4.12**.

Se empleó un sistema de flujo continuo para caracterizar en un espectrofotómetro las membranas de forma rápida y reproducible. Como se ha mencionado en la introducción, las membranas selectivas a iones u optodos responden al analito y al pH del medio, pues están constituidas por dos ionóforos, el selectivo al analito y el cromo(fluoro)ionóforo indicador de pH. Por lo tanto, es necesario mantener constante uno de los dos parámetros, en este caso el pH. Como paso inicial, se evaluó la influencia del pH y la composición de la disolución tampón sobre la respuesta del optodo al analito. El procedimiento experimental consiste en realizar calibrados sucesivos de la membrana, siguiendo la respuesta con patrones de KCl a

distintas concentraciones (1×10^{-6} - 1×10^{-3} M KCl), los cuales están preparados en una disolución de tampón ajustado a distintos valores de pH.

Se registraron los espectros de absorbancia de 400 a 800 nm dejando circular por el sistema de flujo cada patrón durante 4 min, hasta llegar a la señal en el estado estacionario.

Tabla 4.12. Composición de los optodos selectivos a ion potasio ensayados en absorbancia.

Membrana	Plastificante	Relación molar Aditivo aniónico/ ca3 /ionóforo
M1	TOPH	1:1:1
M2	DOS	1:1:1
M3	DOS	1.5:1:1
M4	DOS	1.5:1:2

Primeramente, se evaluó la respuesta de la membrana preparada en TOPH, M1, con patrones de KCl en tampón TRIS 0.05 M a pH=8.0 y posteriormente en acetato de magnesio (II) 0.05 M a pH=5.4. En ambos casos se observó muy poca variación de absorbancia entre los patrones extremos ($\Delta Abs=0.07$ y $\Delta Abs=0.06$, respectivamente), por lo que se descartó utilizar este plastificante. Al registrar el espectro de absorbancia de una membrana M2 en condiciones secas, se observó que el colorante no estaba en su forma ácida totalmente, sino en equilibrio con la forma básica. Al poner la membrana en contacto con una solución ácida, no se conseguía que el colorante pasara completamente a su forma ácida, por lo que se decidió aumentar la proporción de aditivo aniónico a 1.5 (M3). Se evaluó la respuesta a potasio de M3 empleando patrones de KCl preparados en tampón 0.05 M de TRIS a pH= 6.0, 7.0, 8.0 y 9.0; y en acetato de magnesio (II), a pH= 3.0, 4.0 y 5.4 (**Figura 4.23**). Usando TRIS como tampón a pH 6.0 y 7.0, las variaciones de absorbancia fueron muy pequeñas ($\Delta Abs=0.08$ y $\Delta Abs=0.06$ respectivamente) y a pH 8.0 y 9.0 no se observó ningún cambio de absorbancia a lo largo del calibrado. Este hecho es debido a que, a estos valores de pH el colorante se encuentra mayoritariamente en su forma básica y no hay protones disponibles para el intercambio catiónico con el ion potasio del medio. El empleo de acetato de magnesio (II) a pH más bajos (inferiores a pH=6.0) permitió que el colorante estuviera inicialmente en su forma ácida, partiendo de una mayor señal y posibilitando el intercambio catiónico necesario para la respuesta del optodo. A un menor valor de pH del tampón, se obtiene una mayor variación de señal entre patrones de ion potasio extremos y también una mejor sensibilidad, hasta un límite en el que si la concentración de H^+ fuera muy elevada, el ionóforo no tendría suficiente capacidad para extraer el analito del medio y desprotonar el colorante. Para la membrana M4, se utilizó una relación ionóforo:colorante de 2:1 con el fin

de mejorar la sensibilidad. A partir de los experimentos previos, en el calibrado de esta membrana se empleó un tampón de acetato de magnesio (II) a pH=3.0. De esta forma, se obtuvo una variación total de absorbancia de 0.31 entre los patrones extremos (**Figura 4.23**), una sensibilidad de -0.14/dec $[K^+]$ y un límite de detección de $6.1 \times 10^{-4} M$. En la **Figura 4.23** se observa también la reversibilidad de la respuesta de la membrana.

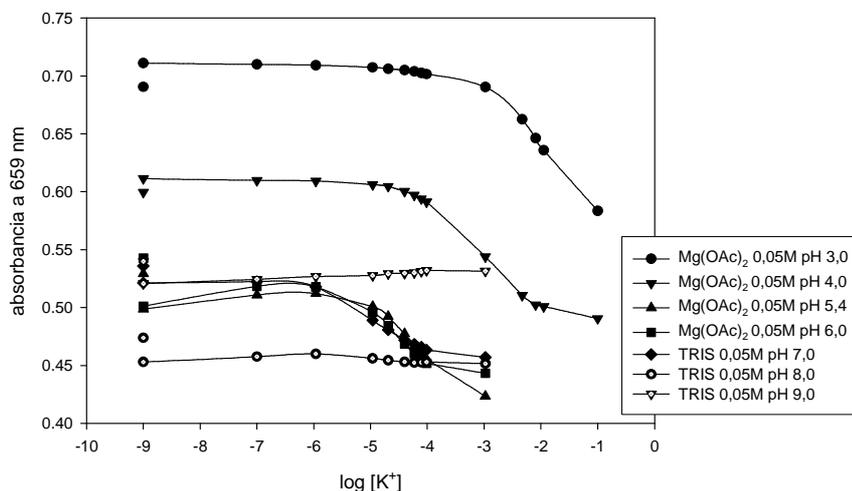
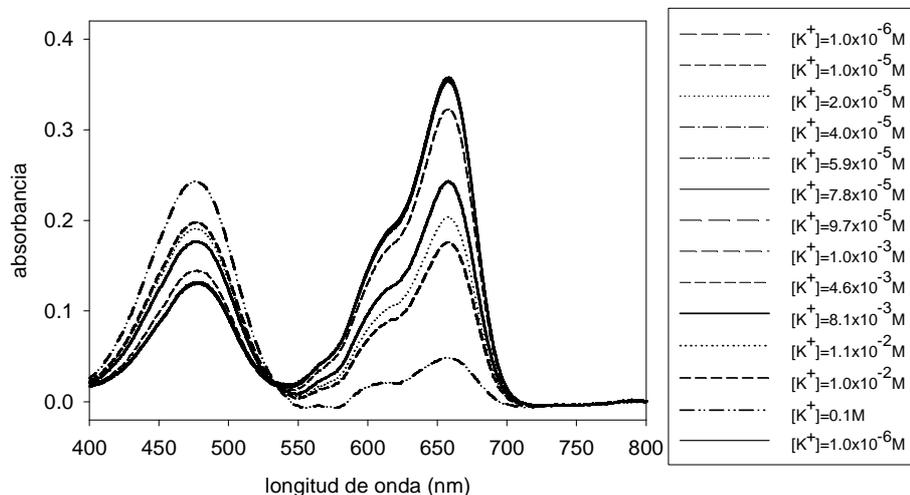


Figura 4.23. Calibrados de M3 a ion potasio empleando acetato de magnesio (II) ($Mg(OAc)_2$) y TRIS como tampones, ajustados a diferentes valores de pH.

a)



b)

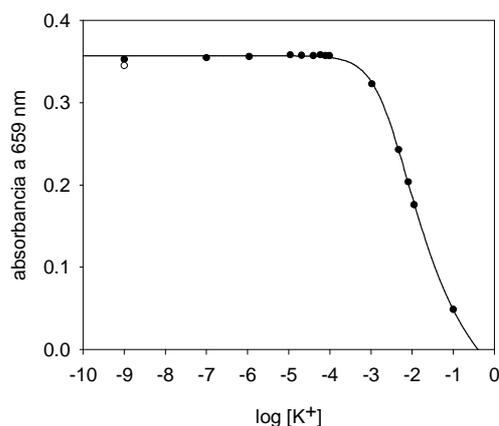


Figura 4.24. a) Calibrado de ion potasio obtenido en un sistema de flujo continuo mediante disoluciones patrón de K^+ en acetato de magnesio (II) 0.05 M a $pH=3.0$, empleando el optodo M4 y su reversibilidad. **b)** Curva de calibración correspondiente.

Considerando los resultados obtenidos, de entre las composiciones estudiadas, el optodo M4 es el que presenta unas características de funcionamiento óptimas.

Formulación y caracterización en absorbancia de un optodo selectivo a plomo que incorpora la cianina-anilina (ca3)

Una vez verificada la validez del colorante escogido **ca3** como cromo(fluro)ionóforo en un optodo selectivo a ion potasio, y para demostrar la posibilidad de generalizar el procedimiento simplemente cambiando el ionóforo integrado en la membrana, se decidió formular un optodo selectivo a ion plomo (II) utilizando el ionóforo (ETH5435, Fluka). La determinación de este parámetro tiene un enorme interés medioambiental debido a su toxicidad. Para promover los equilibrios de intercambio catiónico que deberían darse entre el optodo y la disolución para el reconocimiento del ion plomo (II) y mantener la electroneutralidad en el seno de la membrana, se preparó una membrana cuya composición establece una proporción equimolar entre cromo(fluro)ionóforo y aditivo catiónico; y para conseguir una alta sensibilidad, se triplicó la cantidad de ionóforo (**ca3**/tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio)/ETH5435 de 1:1:3). Se seleccionó el DOS como solvente mediador o plastificante, ya que en los estudios anteriores con la cianina-anilina **ca3**, éste fue el que dio mejores características de respuesta. De nuevo, se empleó un sistema de flujo continuo para caracterizar espectrofotométricamente de forma rápida y reproducible las membranas. Se realizaron calibrados utilizando disoluciones patrón de $Pb(NO_3)_2$ de distintas concentraciones (1×10^{-7} - 1×10^{-1} M $Pb(NO_3)_2$) preparados, esta vez, en una disolución de tampón de acetato de magnesio (II) 0.05 M a $pH=5.0$ y 6.0 .

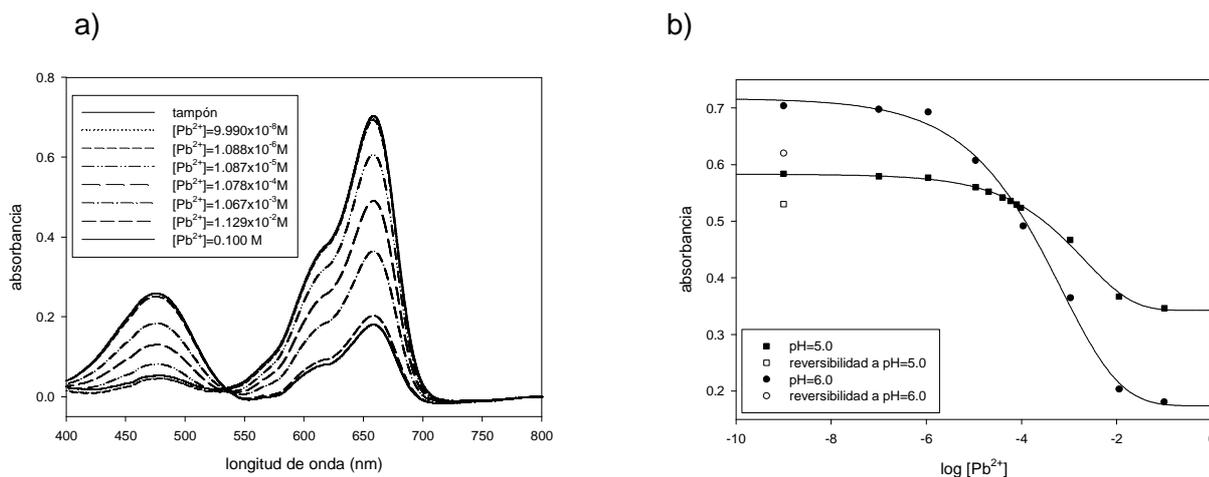


Figura 4.25. a) Calibrado de ion plomo (II) con el optodo Mpb1, obtenido en un sistema de flujo continuo utilizando disoluciones patrón preparadas en tampón de acetato de magnesio (II) 0.05 M a pH=6.0. **b)** Curva de calibración correspondiente (pH=6.0), reversibilidad y curva de calibración obtenida con patrones preparados con el mismo tampón a pH 5.0.

Tal y como se aprecia en la **Figura 4.25a**, la respuesta del optodo Mpb1 al ion Pb^{2+} es la esperada, con un único punto isobéptico bien definido y con una banda de absorción más intensa situada a 650 nm, correspondiente a la forma ácida. Ésta va disminuyendo a medida que aumenta la concentración de ion plomo, ya que esto provoca la desprotonación del colorante. En la **Figura 4.25b**, las curvas de calibrado sigmoidales ajustadas al modelo teórico confirman el equilibrio de intercambio iónico esperado del optodo y muestran la influencia del pH del medio tampón en la variación total de señal y en la sensibilidad (máxima pendiente de la zona de respuesta lineal). La variación de absorbancia observada entre el patrón de plomo más concentrado y el más diluido es adecuada en ambos casos (0.24 a pH=5.0 y 0.52 a pH=6.0), siendo mayor y con mayor pendiente a valores de pH=6.0. Por otro lado, la reversibilidad también es mejor. Se recupera un 84% de la señal, mientras que a pH=5.0 se recupera un 77%.

Así pues, los resultados obtenidos con Mpb1 demuestran su buen comportamiento como optodo selectivo a ion plomo.

4.3. CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LOS CROMO(FLUORO)IONÓFOROS EN FLUORESCENCIA

Como paso previo a estudiar la posibilidad de utilizar los cromo(fluoro)ionóforos sintetizados en el diseño de sensores ópticos selectivos de iones basados en medidas de fluorescencia, fue necesario determinar sus propiedades fluorescentes. Se realizaron estudios análogos a los efectuados en el caso de la absorbancia. En primer lugar y empleando instrumentación convencional (apartado § 4.2), se estudiaron las propiedades fluorescentes de estos compuestos tanto en disolución etanólica 1×10^{-5} M como en las membranas de PVC plastificado ya formuladas para absorbancia.

En primera instancia, se constató que ninguna de las norindocrococianinas sintetizadas, ni en su forma ácida ni en su forma básica, mostraron emisión de fluorescencia en disolución etanólica. Tampoco se observó emisión de radiación cuando los colorantes se inmovilizaron en las membranas de PVC plastificadas y se irradiaron a las longitudes de onda de máxima absorción correspondientes. Esto hizo que no prosiguiera su evaluación, centrándose los estudios en las otras familias de colorantes que sí mostraban emisión fluorescente.

4.3.1. Estudios de cianinas-anilinas en fluorescencia

Se realizaron los mismos estudios de fluorescencia con aquellas cianinas-anilinas (**ca3**, **ca5** y **ca8**) que dieron mejores características de respuesta en membrana evaluadas en modo absorbancia. Todas ellas presentaron emisión de fluorescencia en disolución etanólica tanto en su forma ácida como en la básica (**Tabla 4.13**). La composición de las membranas ensayadas fue idéntica a la de las membranas utilizadas en la caracterización de las propiedades espectroscópicas de absorción. En fase membrana solo se evaluó la fluorescencia de la forma ácida, ya que ésta presenta picos más intensos que la forma básica en la región del infrarrojo cercano o del visible lejano. En estas zonas se pueden encontrar componentes ópticos miniaturizados de bajo coste. Además de presentar máximos de emisión de fluorescencia más intensos y estrechos, los desplazamientos de Stokes de las formas ácidas fueron de entre 23-47 nm en disolución etanólica y de 20-27 nm en los optodos formulados. Estos valores indican que las bandas de emisión están, en todos los casos, suficientemente separadas de la longitud de onda de excitación si utilizan fuentes de excitación de poca anchura de banda como los láseres de diodo. Teniendo en cuenta la posterior utilización de las membranas en instrumentación miniaturizada, éstas fueron irradiadas con láseres de diodo de 650 y 670 nm, ya que éstos son los más cercanos a los

máximos de absorbancia de los colorantes. Además, se realizaron calibrados variando el pH y midiendo la intensidad de fluorescencia emitida. En todos los casos se obtuvieron curvas sigmoidales muy parecidas a las obtenidas en absorbancia (**Figura 4.26b**), que podían ser ajustadas a los modelos de respuesta teóricos. En consecuencia, las cianinas-anilinas **ca3**, **ca4** y **ca5** estudiadas fueron consideradas fluoroionóforos adecuados para su posible aplicación en optodos selectivos de iones.

Tabla 4.13. Longitudes de onda de excitación (λ_{exc}) y de emisión de fluorescencia (λ_{emi}) y desplazamiento de Stokes (Δv_{ST}) en disolución etanólica y en membranas de PVC plastificado de las cianinas-anilinas ca3, ca5 y ca8. Entre paréntesis se indica la longitud de onda del máximo de absorbancia.

Colorante	Disolución etanólica $1 \times 10^{-5} M$						Membrana de PVC plastificado		
	Forma ácida			Forma básica			Forma ácida		
	λ_{exc} (nm)	λ_{emi} (nm)	Δv_{ST} (cm^{-1})	λ_{exc} (nm)	λ_{emi} (nm)	Δv_{ST} (cm^{-1})	λ_{exc} (nm)	λ_{emi} (nm)	Δv_{ST} (cm^{-1})
ca3	650	680	679	487	558	2613	650 (659)	677	614
ca5	673	696	491	494	593	3380	670 (681)	697	578
ca8	653	700	1028	524	*	*	670 (667)	690	433

*emisión de fluorescencia no observable

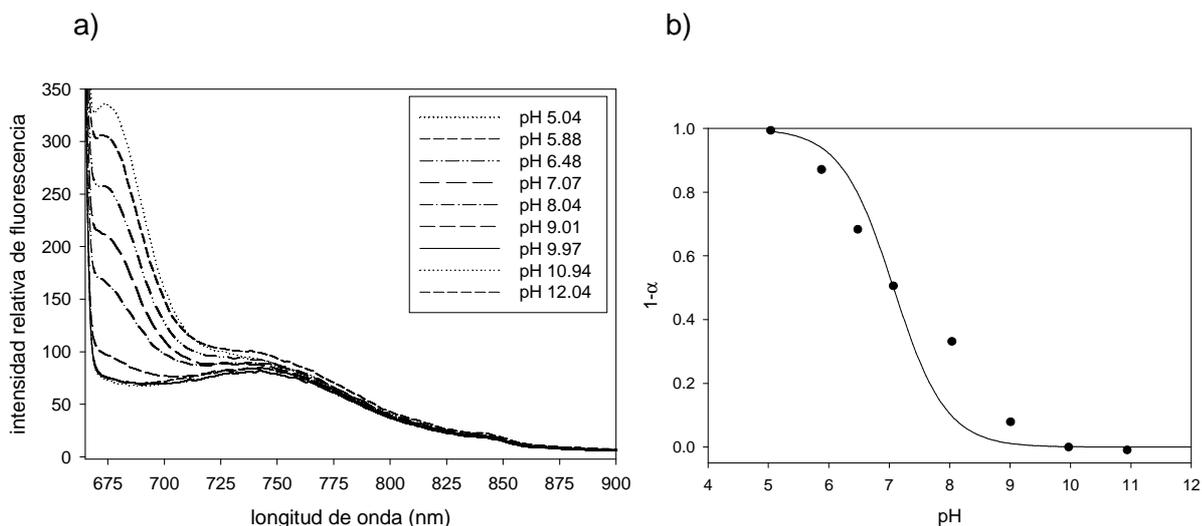


Figura 4.26. a) Emisión fluorescente en función del pH de **ca3** en una membrana de PVC plastificado. b) Correspondiente curva de calibrado de pH normalizada en función del grado de desprotonación ($1-\alpha$).

4.3.2. Estudio de las propiedades de fluorescencia de las cetocianinas

En el caso de las cetocianinas, se evaluaron los colorantes sintetizados en el presente trabajo y quince colorantes más de la misma familia (**k6-k21**), que fueron sintetizados previamente [2, 28, 34] en el *Grup de Sensors i Biosensors* (GSB) (**Figura 4.27, Tabla 4.14**)

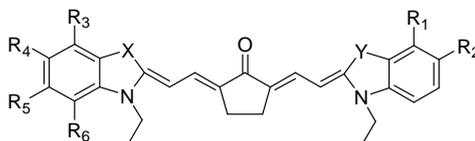


Figura 4.27. Estructura general de los colorantes cetocianina previamente sintetizados y caracterizados en absorbancia en el GSB.

Tabla 4.14. Estructura química y nombre identificativos de los colorantes cetocianina previamente sintetizados en el GSB.

Colorante	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
k6	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-OH	-H	-OH	-H	-H
k7	S	S	-H	-H	-H	-H	-H	-H
k8	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-(CH=CH) ₂ ⁻		-(CH=CH) ₂ ⁻		-H	-H
k9	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-OH	-COOEt	-OH	-COOEt	-H	-H
k10	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-OH	-(CH=CH) ₂ ⁻		-H	-H
k11	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-NHCOCH ₃	-(CH=CH) ₂ ⁻		-H	-H
k12	C(CH ₃) ₂	S	-H	-H	-H	-H	-H	-H
k13	C(CH ₃) ₂	S	-H	-H	-(CH=CH) ₂ ⁻		-H	-H
k14	C(CH ₃) ₂	S	-H	-NHCOCH ₃	-H	-H	-H	-H
k15	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-NHCOCH ₃	-H	-H	-H	-H
k16	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-H	-(CH=CH) ₂ ⁻		-H	-H
k17	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-OH	-H	-H	-H	-H
k18	C(CH ₃) ₂	S	-H	-H	-H	-OH	-H	-H
k19	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-OH	-H	-NH ₂	-H	-H
k20	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-OH	-H	-NHCOCH ₃	-H	-H
k21	C(CH ₃) ₂	C(CH ₃) ₂	-H	-H	-H	-H	-H	-H

La caracterización previa de las cetocianinas **k6-k21** [3,28] permitió observar que presentaban altos coeficientes de absorptividad molar en su forma ácida y básica, no agregaban en membrana, eran completamente reversibles después de ciclos de pH entre 3 y 8.5, no exudaban, mostraban buena fotoestabilidad y su pK_a estaba cercano a la neutralidad. Como consecuencia de estos prometedores resultados también se estudiaron sus propiedades fluorescentes. De todas ellas se determinaron los espectros de excitación y

de emisión fluorescente y sus propiedades fotofísicas, y la influencia del pH sobre el espectro de emisión tanto en disolución etanólica 10^{-5} M como en membranas de PVC plastificado. Finalmente se evaluaron también los procesos de fotodescomposición y exudación de las membranas preparadas.

4.3.2.1. Características de emisión de fluorescencia y propiedades fotofísicas

La emisión de fluorescencia de los colorantes cetocianina fue evaluada en disoluciones etanólicas 1×10^{-5} M, tanto en su forma ácida (pH=2) como en la básica (pH=7.5). Cuando las disoluciones de los colorantes a pH=2 fueron irradiadas a la longitud de onda correspondiente al máximo de absorción, no se observó, en ningún caso, emisión de fluorescencia, exceptuando el colorante **k21**, como previamente había sido descrito en la literatura. [35] Se realizaron los mismos experimentos en membranas de PVC plastificado, en contacto con una disolución tampón a pH=2, y se observaron los mismos resultados, por lo que se concluyó que la forma ácida de los colorantes no era fluorescente. Sin embargo, al llevar a cabo los mismos experimentos a un pH superior (pH=7.5), se observó emisión de fluorescencia tanto en etanol como en membrana. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4.15** y en la **Figura 4.28** se muestran espectros representativos de absorbancia y de emisión de fluorescencia en ambos medios. Como se ha comentado con anterioridad, es conocido que los colorantes cetocianina son extremadamente sensibles a la polaridad del disolvente en el que se encuentran, presentando un solvato(fluoro)cromismo positivo. [36,37] Así, como era de esperar, los máximos de fluorescencia de los colorantes en membrana están desplazados hacia el rojo respecto los obtenidos en etanol, que es un medio más polar. También es sabido que los desplazamientos de Stokes son menores en medios menos polares y cuando los colorantes se encuentran sobre soportes más rígidos (en este caso, las membranas de PVC plastificadas). [38] Esto ocurre para la mayoría de los colorantes estudiados, exceptuando **k4**, **k8**, **k14**, **k15**, **k16** y **k20**, los cuales presentan un desplazamiento de Stokes mayor en membrana que en etanol. Además de la polaridad del medio, la magnitud del desplazamiento de Stokes depende de más factores, como son la viscosidad y la polarizabilidad. Es por lo tanto difícil establecer una tendencia entre los colorantes estudiados.

Aunque las intensidades relativas de fluorescencia son generalmente mayores en etanol que en membrana, los colorantes disueltos en este último medio exhiben picos de fluorescencia con suficiente relación señal/ruido, a excepción de los colorantes **k3**, **k6**, **k9**,

k11 y **k19**. La alta concentración de colorante en las membranas (aproximadamente de $1 \times 10^{-3} \text{M}$) podría provocar un efecto de filtro interno o de auto-absorción de luz por parte del colorante, lo cual explicaría los valores de intensidad de fluorescencia menores observados en este medio. Además, el etanol, un solvente donador de protones, favorece más la emisión de fluorescencia que solventes no polares, ya que los enlaces tipo puente de hidrógeno aumentan la energía de los estados $n\pi^*$. A menudo este hecho se traduce también en un aumento del rendimiento cuántico, aunque en ocasiones tiene lugar el efecto contrario. [39]

Tabla 4.15. Longitudes de onda de excitación y de emisión, desplazamientos de Stokes y rendimientos cuánticos de las cetocianinas estudiadas en disolución etanólica $1 \times 10^{-5} \text{M}$ y en membranas de PVC plastificado (excepto para el cálculo de los rendimientos cuánticos).

Colorante	$\lambda_{\text{excitación, básica}} (\text{nm})$		$\lambda_{\text{emisión}} (\text{nm})$		Desplazamiento de Stokes ($\Delta\nu_{\text{ST}}$) (cm^{-1})		Rendimiento cuántico (Φ_{fluo})
	etanol	membrana	etanol	membrana	etanol	membrana	etanol
k2	600	555	660	604	1515	1462	0.18
k3	611	567	667	602	1374	1025	0.05
k4	566	519	632	589	1845	2290	0.26
k5	583	557	651	587	1792	918	0.20
k6	597	600	653	615	1436	407	0.06
k7	601	564	659	594	1464	895	0.19
k8	593	548	654	602	1573	1637	0.21
k9	540	518	622	580	2441	2064	0.26
k10	595	565	655	595	1540	892	0.08
k11	588	600	654	615	1716	407	0.20
k12	585	542	647	591	1638	1530	0.26
k13	594	554	657	605	1614	1522	0.21
k14	592	542	653	609	1578	2030	0.17
k15	574	530	644	592	1894	1976	0.17
k16	579	542	643	604	1719	1894	0.15
k17	579	544	650	602	1887	1771	0.09
k18	594	547	663	602	1752	1670	0.08
k19	587	559	no pico	no pico	-	-	-
k20	587	540	652	595	1698	1712	0.05
k21	526	496	604	530	2455	1293	0.16

Por lo que a las medidas de rendimiento cuántico se refiere, aunque la estructura del antraceno es muy distinta a la de las cetocianinas, éste fue escogido como estándar para el cálculo del rendimiento cuántico por su solubilidad en etanol (el mismo disolvente que los colorantes) y especialmente, porque su rendimiento cuántico se conoce con precisión. Como

puede observarse en la **Tabla 4.15**, los valores calculados de rendimiento cuántico de las cetocianinas en etanol no son altos. En general, las cetocianinas no son moléculas fluorescentes muy eficientes (normalmente sus rendimientos cuánticos no son superiores a 0.5), [40,41] pero la mayoría de los colorantes estudiados en el presente trabajo tienen rendimientos cuánticos adecuados, con valores incluso comparables a los de algunas sustancias empleadas como estándares. [42,43] Además, hay que tener en cuenta que los rendimientos cuánticos calculados pueden estar por debajo de su valor real debido a que los espectros de fluorescencia se ven truncados a causa de la drástica caída cerca de los 700 nm de la sensibilidad del detector utilizado para su evaluación.

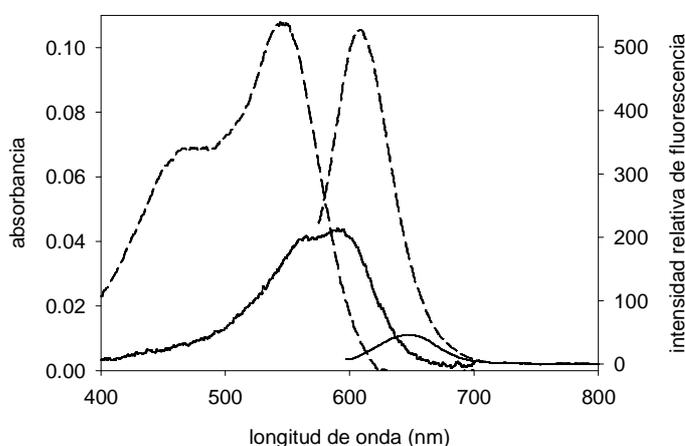


Figura 4.28. Espectros de absorbancia (izquierda) y de fluorescencia (derecha) del colorante k14. En líneas discontinuas, fluoroionóforo en membrana de PVC plastificado (de $1.24 \pm 0.19 \mu\text{m}$ de grosor), a una concentración aproximada $1 \times 10^{-3} \text{M}$, en contacto con una disolución tampón a $\text{pH}=7.9$. En líneas continuas, fluoroionóforo en una disolución etanólica $5.03 \times 10^{-7} \text{M}$ a $\text{pH}=7.0$.

4.3.2.2. Comportamiento ácido-base en etanol y en membranas de PVC plastificado

Los colorantes cetocianina **k2-k21** fueron evaluados como indicadores fluorescentes de pH en disolución etanólica ($1 \times 10^{-5} \text{M}$) y en membranas de PVC plastificado. Los datos experimentales de las curvas de calibrado se obtuvieron irradiando a la longitud de onda del máximo de absorción correspondiente a cada colorante y una vez alcanzado el equilibrio. La representación de la intensidad de fluorescencia frente a pH concuerda con los resultados obtenidos en medidas de absorbancia, mostrando en ambos casos respuestas ajustables a los modelos teóricos de respuesta sigmoideal. En la **Figura 4.29** se muestra un ejemplo de calibrado de pH de una cetocianina en disolución etanólica y la correspondiente curva de

calibrado. En la **Figura 4.30a** puede verse un ejemplo de los espectros a lo largo de un calibrado de pH en membrana; no puede observarse toda la banda de emisión fluorescente debido a su proximidad a la banda de excitación. Los puntos experimentales se ajustan a las curvas sigmoidales teóricas excepto en los colorantes con valores de pK_a muy básicos, donde tuvo lugar descomposición química. Los valores de pK_a en etanol y en membrana (**Tabla 4.16**) fueron calculados análogamente a los estudios en absorbancia e igualmente a lo que sucedía en estos estudios, los valores de pK_{aMEM} son significativamente superiores, al menos en tres unidades de pH, a los obtenidos en etanol. Esto posibilita futuras aplicaciones que impliquen la determinación de muestras con pHs cercanos de la neutralidad. Las curvas teóricas y los puntos experimentales en membrana se muestran en la **Figura 4.30b**. Los estudios se llevaron a cabo partiendo de un pH inicial básico, lo que implica una intensidad de fluorescencia de emisión máxima, hacia un pH más ácido. Mientras en disolución etanólica todos los colorantes cetocianina mostraron ciclos de pH completamente reversibles, en membrana la mayoría presentaron una escasa reversibilidad, de alrededor del 25%, con la excepción de **k15**, **k16**, **k17**, **k18** y **k20**, los cuales volvieron por completo al valor de intensidad de fluorescencia inicial. Esta baja reversibilidad puede ser atribuida a la fotodescomposición de los colorantes o a su exudación hacia la disolución tampón.

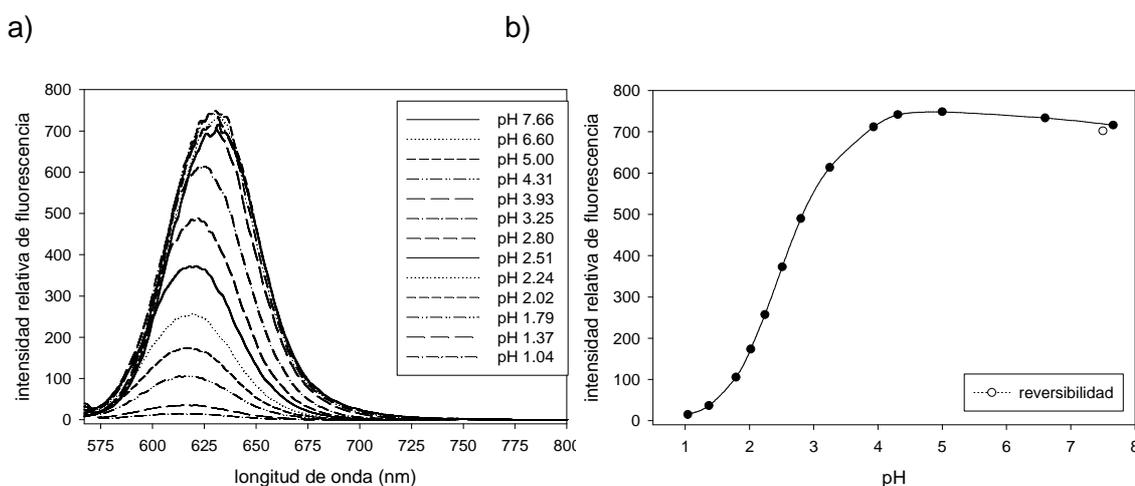


Figura 4.29. a) Espectros de emisión de fluorescencia del colorante **k4** en solución etanólica $1 \times 10^{-5} M$ a lo largo de un calibrado de pH, $\lambda_{exc}=566$ nm. **b)** Correspondiente curva de calibrado de pH. Se indica la reversibilidad después del ciclo de pH.

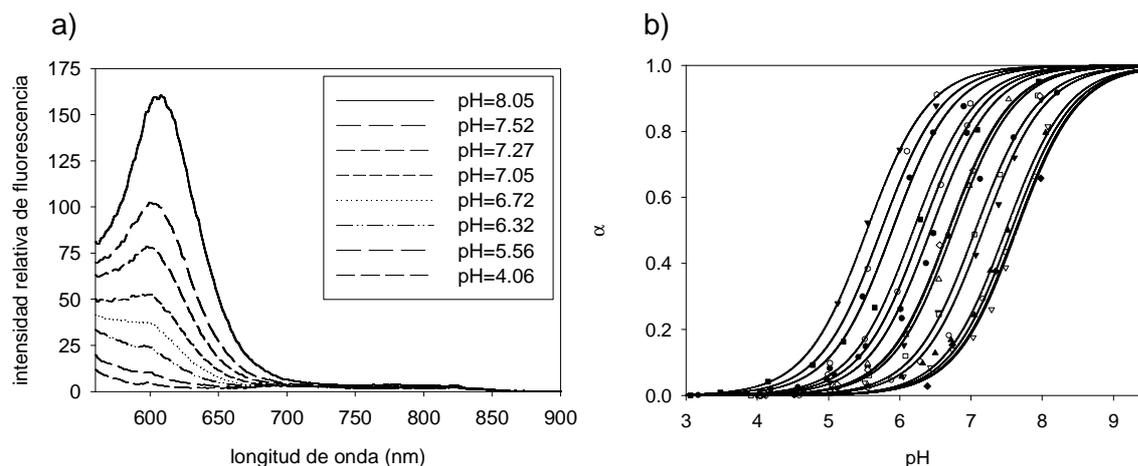


Figura 4.30. a) Espectros de emisión de fluorescencia del colorante k18 en membrana de PVC plastificado en un calibrado de pH, $\lambda_{exc}=547$ nm b) Curvas de pH normalizadas, en términos de grado de desprotonación frente pH de la disolución tampón. Las líneas continuas son las curvas teóricas ajustadas a los puntos experimentales. De izquierda a derecha, **k15, k13, k5, k4, k7, k2, k21, k17, k20, k14, k10, k18, k8, k12 y k16.**

Tabla 4.16. Valores de pK_a de las cetocianinas fluorescentes evaluadas en disolución etanólica $1 \times 10^{-5} M$ (EtOH) y en membrana de PVC plastificado (MEM).

Colorante	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9	k10	k11
pK_{aEtOH}	3.8	4.0	2.4	2.5	3.5	3.5	2.1	1.5	3.5	2.8
pK_{aMEM}	6.4	**	6.2	5.9	**	6.3	7.6	**	7.2	**
Colorante	k12	k13	k14	k15	k16	k17	k18	k19	k20	k21
pK_{aEtOH}	3.1	3.2	3.8	2.6	3.0	2.8	3.6	*	3.1	2.8
pK_{aMEM}	7.6	5.7	7.1	5.5	7.6	6.7	7.5	*	6.8	6.7

*no emisión de fluorescencia

**baja intensidad de fluorescencia

4.3.2.3. Fotodescomposición y exudación

Como ya se ha señalado con anterioridad en esta memoria, la estabilidad de los componentes de la membrana es esencial. El factor clave que limita la estabilidad de las membranas es el proceso de fotodescomposición de los colorantes bajo exposición continua de luz. Así, éstos pueden descomponer siguiendo procesos fotoquímicos, pero también pueden sufrir degradación provocada por procesos químicos. En otros casos, el origen de la pérdida de señal puede ser debida a la exudación del colorante a la disolución. Este proceso es debido a una limitada lipofilicidad del colorante que provoca una baja solubilidad en el medio membrana. Todos estos fenómenos se evidencian con una pérdida de intensidad de

fluorescencia y baja reversibilidad. Por lo tanto, fue necesario el diseño de experimentos que fueran capaces de discernir entre estos tipos de descomposición. Por una parte, se examinó el efecto de irradiar la forma básica de los colorantes a la longitud de onda del máximo de absorbancia durante dos horas, tanto en disolución etanólica como en membranas de PVC plastificado en contacto con una disolución tampón a pH=7.5. Durante la exposición de las membranas a la radiación, se midió, cada segundo, la intensidad de emisión de fluorescencia a la longitud de onda del máximo de emisión mediante un espectrofluorímetro. Los experimentos se llevaron a cabo sin desoxigenar la disolución previamente. En etanol, no se observó disminución de intensidad de fluorescencia en ningún caso. Por el contrario, los estudios en membrana revelaron pérdidas en la intensidad de fluorescencia de todas las cetocianinas evaluadas (**Figura 4.31**). No obstante, solo para algunos colorantes se detectó exudación en los espectros de la disolución tampón en contacto con las membranas. Si consideramos una posible aplicación final de los optodos en sistemas microfluídicos, lo cual implica un modo de trabajo en flujo continuo, es interesante evaluar ambos efectos conjuntamente. Como parámetro de medida de ambos efectos combinados, se calcularon los tiempos de vida medios de cada colorante ($t_{1/2}$) en condiciones de flujo continuo. Estos datos se extrajeron de las curvas de fotodescomposición obtenidas al irradiar las membranas utilizando la fuente del espectrofluorímetro mientras se mantenían en contacto continuo con la disolución (**Tabla 4.17**). Se observó, además, que la exudación dependía del grosor de las membranas, teniendo lugar menos exudación en membranas más delgadas.

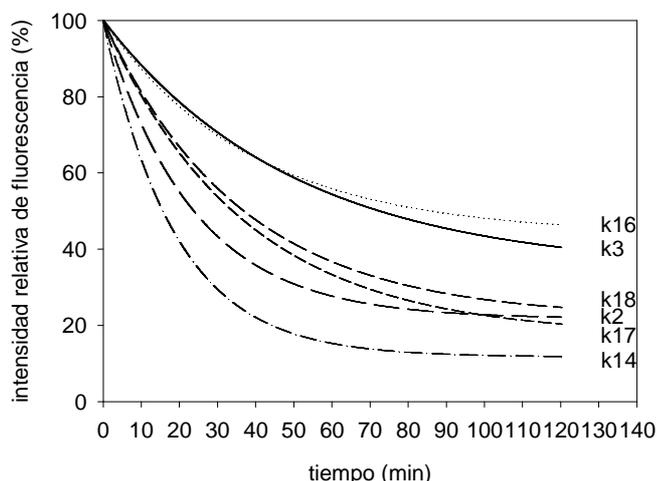


Figura 4.31. Curvas de fotodescomposición representativas de algunos de los colorantes cetocianina desprotonados en membranas de PVC plastificado, bajo exposición de luz correspondiente a su longitud de onda de excitación.

Los tiempos de vida medios calculados permitieron constatar que las cetocianinas son candidatas adecuadas para el desarrollo de sensores en sistemas de flujo continuo, incluso con $t_{1/2}$ del orden de fluoroionóforos comerciales. [44]

Tabla 4.17. Tiempos de vida medios ($t_{1/2}$) de las cetocianinas en membrana, en medio básico.

Colorante	k2	k3	k4	k5	k6	k7	k8	k9	k10	k11
$t_{1/2}$ (min)	31.38	53.94	*	57.04	129.28	66.16	37.88	31.78	61.04	67.24
Colorante	k12	k13	k14	k15	k16	k17	k18	k19	k20	k21
$t_{1/2}$ (min)	21.18	36.39	27.13	27.33	43.47	41.40	40.82	-	52.67	38.18

* $t_{1/2}$ no calculable. Su porcentaje de descomposición a las 2h de exposición de luz fue de 68%

Teniendo en cuenta los resultados de los estudios realizados, se puede concluir que las cetocianinas sintetizadas, con distintas basicidades, son adecuados fluoroionóforos de pH en etanol y que, a la vez, pueden operar como fluoroionóforos selectivos a protón en membranas de PVC plastificadas con TOPH. Considerando los rendimientos cuánticos calculados, en general, las cetocianinas presentan emisiones de fluorescencia suficientemente intensas. Además, exhiben una excelente respuesta a pH y tiempos de vida medios adecuados para aplicaciones que conlleven exposiciones de luz cortas. Sin embargo, solo la forma básica de las cetocianinas presenta emisión de fluorescencia (excepto en el caso de **k21**, que también lo hace su forma ácida). Esto implica que la fuente de excitación debe emitir a las longitudes de onda de absorción máxima de la forma básica de las cetocianinas que en membrana se encuentra entre 530 y 615 nm. Estos valores son demasiado bajos para permitir el uso de los láseres de diodo centrados en 650, 750 o 780 nm, como sería deseable para su aplicación en sistemas miniaturizados. Sin embargo, se podrían utilizar LEDs.

4.4. DESARROLLO DE SISTEMAS MINIATURIZADOS DE FLUORESCENCIA

Una vez sintetizados los colorantes crococianina, cetocianina y (nor)cianina-anilina, y tras su caracterización como indicadores acidocrómicos en absorbancia y en fluorescencia, tanto en solución como en membranas de PVC plastificado, se seleccionó la cianina-anilina **ca3** para la formulación de optodos selectivos a iones basados en medidas de fluorescencia incorporando un ionoforo selectivo.

Los estudios de fluorescencia en membrana de los colorantes sintetizados habían revelado que las crococianinas no eran fluorescentes y que las cetocianinas lo eran solo en

su forma básica, no siendo adecuada la longitud de onda de excitación con las fuentes de luz miniaturizadas disponibles en el laboratorio. En cambio, las cianinas-anilinas **ca3**, **ca4** y **ca8** habían mostrado un adecuado comportamiento en medidas de fluorescencia. De entre éstas, se eligió la cianina-anilina **ca3** por su comportamiento ácido-base, su pK_{aMEM} , la posición de su máximo de absorción (cerca de 650 nm) y su amplio desplazamiento de Stokes. Así pues, se procedió al estudio, caracterización y aplicación de la cianina-anilina **ca3** como fluoroionóforo combinado con un ionóforo de reconocimiento selectivo para la formulación de optodos selectivos a iones. Este colorante ya había sido utilizado previamente en la formulación de optodos basados en medidas de absorción presentando muy buenos resultados (apartado § 4.2.2.2).

El objetivo último era desarrollar un fluorosensor óptico miniaturizado que incorporase, como parte químicamente activa, un optodo fluorescente. Con este fin y como se describe en el apartado § 3.2, se construyó una plataforma sensora formada por componentes ópticos discretos miniaturizados que fuese compatible con los optodos diseñados.

Inicialmente, y para comprobar la validez de la plataforma fluorosensora, se aplicó la instrumentación portátil desarrollada al análisis de ion potasio en muestras de agua dopadas incorporando la membrana M4. El sensor se caracterizó empleando un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) simple y se determinaron algunos parámetros analíticos de calidad como sensibilidad, límite de detección, repetitividad, reproducibilidad, tiempo de vida e interferencias iónicas.

Los buenos resultados obtenidos permitieron plantear la posibilidad de generalizar la aplicación de la plataforma fluorosensora para realizar medidas de diferentes iones de especial relevancia medioambiental. Así, se procedió a activar también la plataforma con optodos selectivos de ion plomo (membrana Mpb1). Tras la evaluación de su respuesta integrada en un sistema de flujo continuo (FIA), se aplicó a la determinación de ion plomo en extractos de suelos contaminados.

Asimismo, se desarrolló una plataforma de fluorescencia tipo sonda (como se describe en el apartado § 3.2) que incrementa su portabilidad, simplifica el intercambio de la membrana selectiva y facilita su utilización en medidas discretas in situ. La sonda construida se activó químicamente con la membrana Mpb1 y se aplicó a la determinación de ion plomo (II) en extractos de suelos contaminados. Los resultados obtenidos se compararon con aquellos obtenidos por un método de referencia.

4.4.1. Desarrollo de una plataforma sensora de fluorescencia para realizar determinaciones en condiciones de flujo continuo

Debido a la necesidad de posibilitar una alta frecuencia de muestreo en análisis rutinarios para determinadas aplicaciones medioambientales, se diseñó y construyó una plataforma de fluorescencia (**Figura 4.32a**) basada en componentes ópticos miniaturizados que pudiera acoplarse como detector en un sistema FIA automatizable. Para ello, se emplea una celda de flujo especialmente diseñada (apartado § 3.2) (**Figura 4.32b**), donde se integra la membrana selectiva. El dispositivo experimental es análogo al utilizado para las medidas de absorbancia de los optodos. Éste consta de un sistema FIA bacanal. El canal portador, donde se inyecta la muestra, se mezcla con un canal auxiliar (acondicionador), que permite tamponar el pH de la muestra antes de que ésta llegue al detector. La banda de emisión fluorescente del colorante cianina-anilina empleado como fluoroionóforo en los dos optodos previamente optimizados para realizar medidas de absorbancia (Mk4 y Mpb1) corresponde a su forma ácida. En ausencia de analito, el fluoróforo está completamente protonado y la señal de fluorescencia será máxima. La disolución portadora, tamponada tras mezclarse con la disolución acondicionadora, generará en ausencia de analito un máximo de señal que permitirá definir la línea de base. Cuando se inyecten las disoluciones de analito y éstas entren en contacto con la membrana ubicada en el detector, el ionóforo interactuará con el analito y el fluoroionóforo se desprotonará, siguiendo un mecanismo de intercambio catiónico. En ese momento, se registrará una disminución de la señal emitida, generándose una señal transitoria.

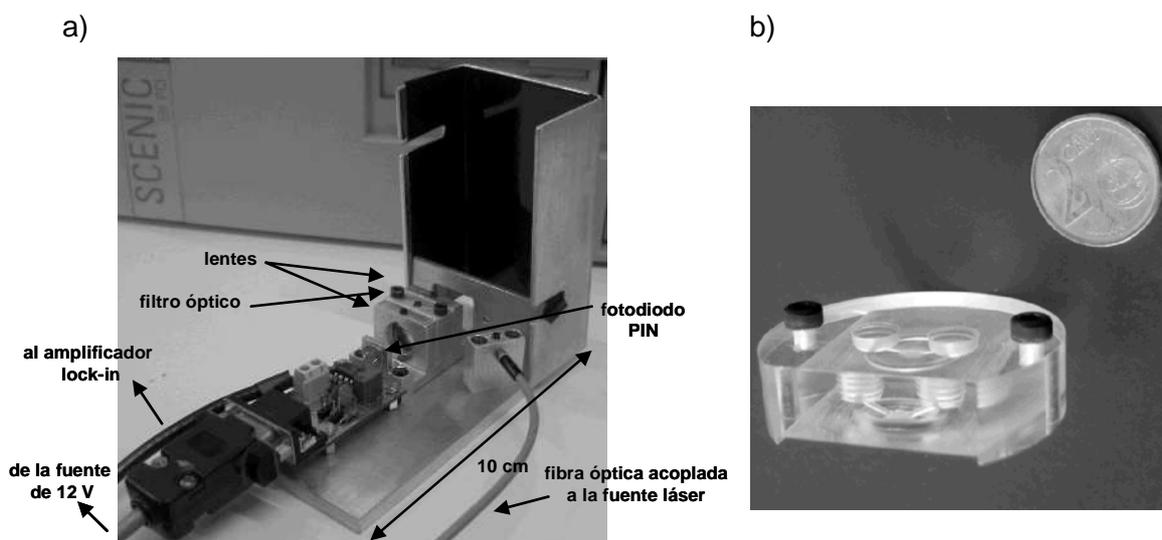


Figura 4.32. Plataforma fluorosensora miniaturizada, donde se indican sus componentes principales y b) celda de flujo para realizar los análisis en flujo.

En este apartado, se presenta la caracterización de la respuesta analítica de la plataforma fluorosensora aplicada, por una parte, a la determinación de ion potasio, y por otra, a la determinación de ion plomo (II). Por último, se muestran los resultados obtenidos en sistemas FIA optimizados para la determinación de ion potasio de muestras de agua de red dopadas y para la determinación de ion plomo (II) de extractos de suelos contaminados.

4.4.1.1. Caracterización de la plataforma sensora en la determinación de ion potasio utilizando el optodo M4

Optimización del sistema FIA

Se tuvieron en cuenta dos procesos que afectan a la señal analítica. Por una parte, la dispersión de la muestra en la disolución portadora camino del detector y, por otra parte, la difusión del analito a través de la interfase membrana/disolución, proceso que incrementa el tiempo de respuesta del detector. Ambos procesos pueden ser modulados por los parámetros hidrodinámicos del sistema de flujo, y deben ser cuidadosamente ajustados y optimizados. Su selección está regida por un compromiso entre el tiempo de análisis (frecuencia de muestreo) y la sensibilidad. Para evaluar el efecto de los parámetros hidrodinámicos se inyectó por triplicado en el sistema de flujo un patrón 10^{-2} M KCl, empleando una disolución de acetato de magnesio 0.05 M (tamponada a pH=5.0) como disolución acondicionadora. Se evaluó la influencia del caudal y el volumen de inyección en la respuesta del sistema de detección. Para ello se ensayaron distintos caudales (4, 6, 8 y $10 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$) y diferentes volúmenes de inyección (100, 500, 1000, 1500 y $3000 \mu\text{l}$) (**Figura 4.33**). En la **Figura 4.33b** se muestran los resultados obtenidos variando el volumen de inyección y manteniendo un caudal fijo de $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se puede observar que aumentando el volumen de inyección, aumenta la altura de pico. No obstante, volúmenes de muestra superiores a $3000 \mu\text{l}$ originan ya valores de señal constantes, lo que implica que se ha alcanzado el estado estacionario. Aunque volúmenes de muestra pequeños originan señales menos intensas, permiten una mayor frecuencia de muestreo. En consecuencia, se escogió un volumen intermedio de $1500 \mu\text{l}$, que da un 95% de la señal máxima y una frecuencia de muestreo razonable (de aproximadamente 1 muestra/min).

Por otra parte, en la **Figura 4.33a** puede verse que fijando un volumen de inyección de $1500 \mu\text{l}$, valores de caudal elevados implican menores tiempos de contacto del analito con la membrana. Esta reducción del tiempo de contacto repercute en una menor difusión hacia el interior de la membrana y, por lo tanto, se obtienen señales menos intensas. Esto demuestra que la etapa limitante es el proceso de difusión del analito hacia el interior de la membrana.

Teóricamente, a altos caudales se reduce el grosor de la capa de difusión adyacente a la membrana, minimizando así el tiempo de difusión del analito a través de ella. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que la reducción del tiempo de contacto entre la membrana y el bolo de muestra a altos caudales contrarresta este efecto. El analito encuentra menos impedimentos para aproximarse a la membrana, pero tiene menos tiempo para difundir hacia ésta. De nuevo se escogió un caudal de $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, como compromiso entre la frecuencia de muestreo, la sensibilidad y el consumo de reactivos.

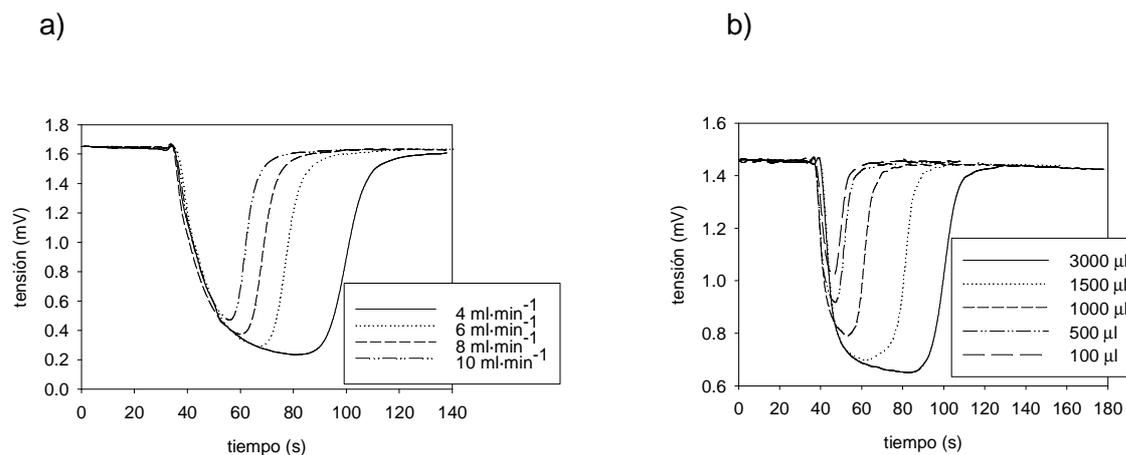


Figura 4.33. Optimización de los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA inyectando una disolución patrón 10^{-2} M KCl en un tampón acético/acetato 0.05 M a pH 5.0. **a)** Variación del volumen de inyección a un caudal de $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y **b)** variación del caudal, empleando un volumen de inyección de $1500 \mu\text{l}$.

Sensibilidad y límite de detección

La concentración y el pH de la disolución acondicionadora influyen en algunos parámetros analíticos de los optodos como el límite de detección (L.D.), la sensibilidad y el intervalo lineal de trabajo. Para un optodo (par ionóforo/fluoroionóforo) concreto cuya composición ya viene prefijada, la modificación del pH de la disolución tampón puede emplearse para modular la capacidad de extracción del analito por el ionóforo y así poder modular algunos parámetros analíticos como el intervalo de trabajo. De este modo se puede adecuar la respuesta del optodo a las características de las muestras analizadas.

Asimismo, el pH de trabajo tiene que escogerse teniendo en cuenta el pK_{aMEM} del fluoroionóforo, ya que cuando la membrana intercambia protón por analito, es deseable que el fluoroionóforo esté totalmente protonado para mejorar la sensibilidad al aprovechar al máximo la capacidad de intercambio. Por este motivo, inicialmente se eligió una disolución acondicionadora de acético/acetato de magnesio que suministra una adecuada capacidad

tampón entre pH=3 y 6. Para optimizar el pH final de dicha disolución, se evaluó la respuesta del optodo en un sistema de flujo continuo a tres pH diferentes (pH=3.0, 4.0 y 5.0). En estas condiciones ácidas, el fluoroionóforo está completamente protonado y se obtiene la máxima emisión de fluorescencia. En los tres casos, la señal de línea base es idéntica. De este modo, es posible trabajar con el rango máximo de variación de señal. La concentración del tampón se fijó en 0.05 M, ya que es la concentración más pequeña que asegura el ajuste del pH de la muestra antes de la detección. Como se observa en la **Figura 4.34**, cuando el pH del medio aumenta, aproximándose al pK_{aMEM} del fluoroionóforo ($pK_{aMEM}=10.3$), se alcanza un L.D. inferior. Esto es debido a que los protones son liberados con mayor facilidad, lo cual permite detectar concentraciones de potasio inferiores. Cabe remarcar que el intervalo de trabajo, que abarca dos décadas de concentración a los valores de pH evaluados, se desplaza a concentraciones de potasio inferiores cuando el pH aumenta, mientras que la sensibilidad, determinada como la pendiente de la curva de calibración, apenas se ve afectada ($-0.66 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$). El pH de trabajo se fijó finalmente en 5.0 porque a este pH es posible alcanzar el límite de detección más bajo (pH=3, L.D.= 1.3×10^{-2} M; pH=4, L.D.= 2.4×10^{-4} M y pH=5, L.D.= 1.6×10^{-5} M). El límite de detección se determinó gráficamente a partir de la intersección del segmento extrapolado de la zona de respuesta lineal de la curva de calibrado con el segmento extrapolado de la señal sin analito (señal de línea base) (**Figura 4.35b**).

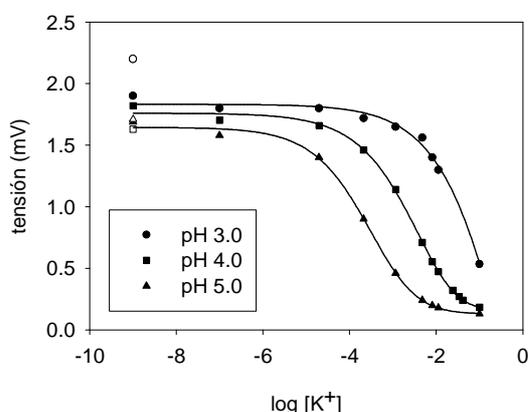


Figura 4.34. Curvas de calibrado de ion potasio a distintos valores de pH de la disolución tampón realizados con el fluorosensor miniaturizado integrado en un sistema de flujo continuo. Las muestras fueron preparadas en un tampón de acetato de magnesio 0.05 M ajustado al pH seleccionado.

A continuación, se realizaron calibrados de ion potasio en el sistema FIA optimizado. En las **Figura 4.35a y b**, se muestra, a título de ejemplo, el registro de las señales obtenidas al inyectar patrones de diferente concentración de ion potasio, así como la correspondiente

curva de calibrado. La forma de esta curva de calibrado está invertida respecto a las mostradas anteriormente, ya que en este caso, se representa la altura del pico FIA frente al logaritmo de la concentración. El sistema FIA optimizado suministra una sensibilidad de $0.71 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ y un L.D. de $2.2 \times 10^{-5} \text{ M}$.

b)

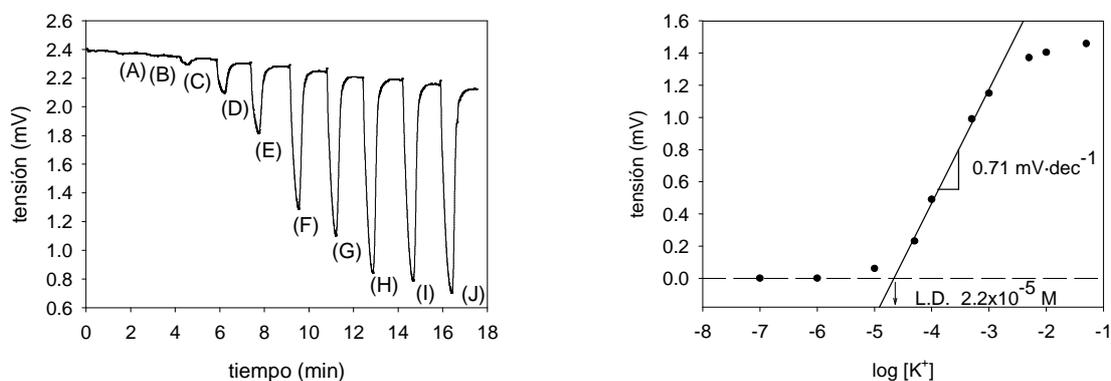


Figura 4.35. a) Diagrama de la inyección de disoluciones patrón de KCl realizados en el sistema FIA optimizado. Concentraciones (M) (A) 1×10^{-7} , (B) 1×10^{-6} , (C) 1×10^{-5} , (D) 5×10^{-5} , (E) 1×10^{-4} , (F) 5×10^{-4} , (G) 1×10^{-3} , (H) 5×10^{-3} , (I) 1×10^{-2} y (J) 5×10^{-2} . **b)** Curva de calibración de potasio correspondiente; se representan las alturas de pico y se muestran el límite de detección (L.D.) y la pendiente del intervalo lineal.

Repetitividad, reproducibilidad y tiempo de vida

La repetitividad de las medidas se evaluó inyectando sucesivamente en el sistema de flujo una disolución patrón de potasio $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ (**Figura 4.36**). Se calculó la desviación estándar relativa a partir de las alturas de pico registradas, obteniéndose una RSD ($n=16$) de 4.2%. En periodos cortos de tiempo la señal es perfectamente reversible. Para el estudio de la reproducibilidad, se siguió la evolución de la sensibilidad a lo largo de calibrados secuenciales empleando la misma membrana, y se observó que ésta disminuía con cada calibrado. Este hecho es consecuencia de una pequeña pero continua deriva de la línea base en la dirección de disminuir el valor absoluto de la señal. Cabe recordar que la señal de línea base corresponde al máximo de emisión posible cuando el optodo está completamente protonado. Probablemente este hecho es debido a la fotodescomposición del fluoroionóforo bajo una continua exposición a la intensa radiación del láser. Como medida del tiempo de vida, se calculó un 55% de descomposición del colorante tras 5 calibrados sucesivos.

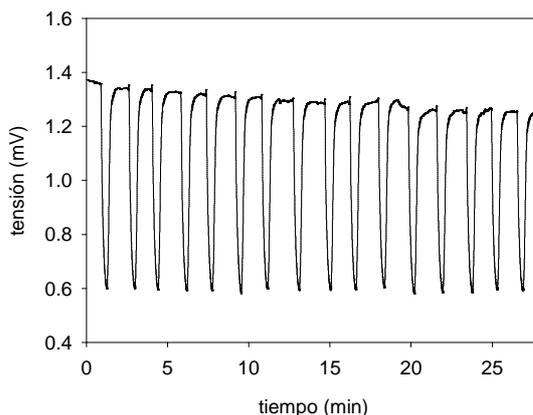


Figura 4.36. Registro de inyecciones sucesivas de 1500 µl de una disolución patrón $5 \times 10^{-4} \text{M}$ KCl en el sistema FIA optimizado para evaluar la repetitividad.

Interferencias iónicas

Para validar el empleo de la plataforma sensora miniaturizada en muestras naturales, se evaluó la selectividad del optodo a potasio frente a los cationes más habituales en agua potable de red (calcio, sodio y amonio) mediante el método de las interferencias fijas (FIM, Fixed Interference Method). Aunque este método se emplea habitualmente para evaluar las interferencias cuando la carga de los iones y la estequiometría de los complejos es la misma, [45] se aplicó en el presente trabajo con el objetivo de obtener coeficientes de selectividad orientativos y comparables entre ellos. El efecto del ion cobre (II) también fue evaluado, ya que en trabajos previos [3] se observó que este ion podía reaccionar con algunos tipos de colorantes cianina, envenenando irreversiblemente la membrana. Sin embargo, este efecto no fue observado con la cianina-anilina empleada. El cobre no interfirió en la respuesta a potasio del sensor a concentraciones de este ion inferiores a 10^{-2}M .

Cada calibrado se llevó a cabo analizando disoluciones a una concentración constante del posible ion interferente y variando la concentración de potasio. Las concentraciones de ion calcio y sodio seleccionadas fueron de 10^{-1}M mientras que la de ion amonio fue de 10^{-3}M debido a que se esperaba que interfiriera más que los otros iones. [46] Los coeficientes de selectividad se determinaron obteniendo gráficamente la concentración de potasio en la intersección de los dos segmentos lineales extrapolados de la curva de calibrado, y considerando la concentración del ion interferente de fondo, en analogía con los electrodos selectivos a iones, empleando la ecuación (25) del capítulo 3.

Los coeficientes de selectividad obtenidos ($\log K = -2.88; -3.70; -2.06; -3.06$ para $\text{Ca}^{2+}; \text{Na}^+; \text{NH}_4^+$ y Cu^{2+} , respectivamente) prueban la idoneidad del optodo formulado para el

análisis de ion potasio en agua de red, considerando las concentraciones usuales de estos iones potencialmente interferentes en este tipo de muestras.

Aplicación de la plataforma de fluorescencia en la determinación de ion potasio en muestras de agua potable de red de distribución

El sensor se aplicó al análisis del contenido de ion potasio en muestras de agua potable. Con el objetivo de validar su funcionamiento, los resultados suministrados por el sensor se compararon con los obtenidos por espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy*). Las muestras analizadas consisten en agua de red de distribución del área de Barcelona. Algunas de las muestras fueron dopadas con ion potasio para incrementar el intervalo de concentración medible, y analizadas aleatoriamente. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4.18**. Los intervalos de confianza de las medidas efectuadas se calcularon a partir del error de interpolación en la zona lineal de la curva de calibrado, mientras que los intervalos de confianza de las medidas con ICP-OES se obtuvieron de las medidas de tres replicados. No se encontraron diferencias significativas ($|t_{\text{tab}}|=2.36 > |t_{\text{exp}}|=-0.97$) entre los resultados obtenidos por ambos métodos al aplicar la prueba t para medias de dos muestras emparejadas, con un 95% de confianza.

Tabla 4.18. Contenido de ion potasio en agua de red y en agua de red dopada con KCl analizado con el fluorosensor miniaturizado en el sistema FIA optimizado y por el método de referencia (ICP-OES).

Muestra	Concentración de K ⁺ (x 10 ⁻⁵ M)	
	optodo	ICP-OES
1	8.0 ± 0.1	10.8 ± 0.2
2	8.4 ± 0.2	11.0 ± 0.4
3	8.1 ± 0.1	11.5 ± 0.5
4	13.9 ± 0.3	12.3 ± 0.7
5	16.6 ± 0.3	15.1 ± 0.1
6	25.6 ± 0.7	30.2 ± 0.4
7	28.2 ± 0.8	30.2 ± 0.3
8	114 ± 3	110 ± 7

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el sistema de medida desarrollado puede considerarse como una plataforma simple y de uso general para la determinación de iones mediante medidas de fluorescencia. Así, otros analitos podrían ser determinados solo cambiando el ionóforo en la membrana sensora. Consecuentemente, el fluorosensor desarrollado podría constituir una alternativa a la instrumentación convencional para aplicaciones medioambientales en campo.

4.4.1.2. Caracterización de la respuesta de la plataforma sensora en la determinación de ion plomo (II) utilizando el optodo Mpb1

Optimización del sistema FIA

Para demostrar la versatilidad de la plataforma sensora, se activó con un optodo selectivo de ion plomo (II). Se empleó la misma plataforma de fluorescencia utilizada para realizar las medidas de ion potasio (apartado § 4.4.1.1, **Figura 4.32**) pero se modificaron algunos parámetros del sistema FIA y se utilizó la membrana Mpb1 selectiva a plomo. Ésta incluye la cianina-anilina sintetizada **ca3** como fluoroionóforo y el ionóforo comercial de plomo (II) ETH5435 (*Fluka*).

Análogamente a lo realizado con las medidas de potasio, se optimizaron los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA para obtener una buena sensibilidad en el menor tiempo de análisis posible. Así, se inyectó por triplicado en el sistema una disolución patrón 5×10^{-3} M de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ empleando acetato de magnesio 0.05 M (pH=6.0) como disolución acondicionadora. Se evaluó la influencia del caudal y el volumen de inyección en la respuesta del sistema de detección. Para ello se ensayaron distintos caudales (4, 6, 8 y $10 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$) y diferentes volúmenes de inyección (500, 1000, 1500, 3000 y $5000 \mu\text{l}$) (**Figura 4.37**). En la **Figura 4.37a** se muestran los resultados obtenidos a un caudal fijo de $8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, y variando el volumen de inyección. Se puede observar que, hasta $1500 \mu\text{l}$, el incremento del volumen de inyección provoca un incremento de la altura de pico. A partir de este valor, la señal alcanza el estado estacionario disminuyendo ligeramente. Finalmente, se escogió como óptimo un volumen intermedio de $1000 \mu\text{l}$, teniendo en cuenta que se obtenía un 90% de la señal máxima en un tiempo de análisis razonable (aprox. 50 muestras/h).

Por otra parte, en la **Figura 4.37b** puede verse que en este caso, con un volumen de muestra fijo, de $1000 \mu\text{l}$, a caudales mayores se obtienen señales más intensas. Aun tratándose de la misma configuración de celda que en los calibrados a ion potasio, esta tendencia es contraria a lo que sucedía con éste último. Esto es debido a que el coeficiente de difusión y la movilidad iónica del ion plomo (II) son menores que los del ion potasio. Así, a

caudales bajos, el grosor de la capa adyacente a la membrana es muy grande, lo que significa que el plomo difundirá más lentamente, originando menos señal. Al aumentar el caudal, la capa se reduce y difunde más ion plomo a la membrana, lo que conlleva mayor señal.

De nuevo se escogió un caudal de $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, como compromiso entre la frecuencia de muestreo, la sensibilidad y el consumo de reactivos.

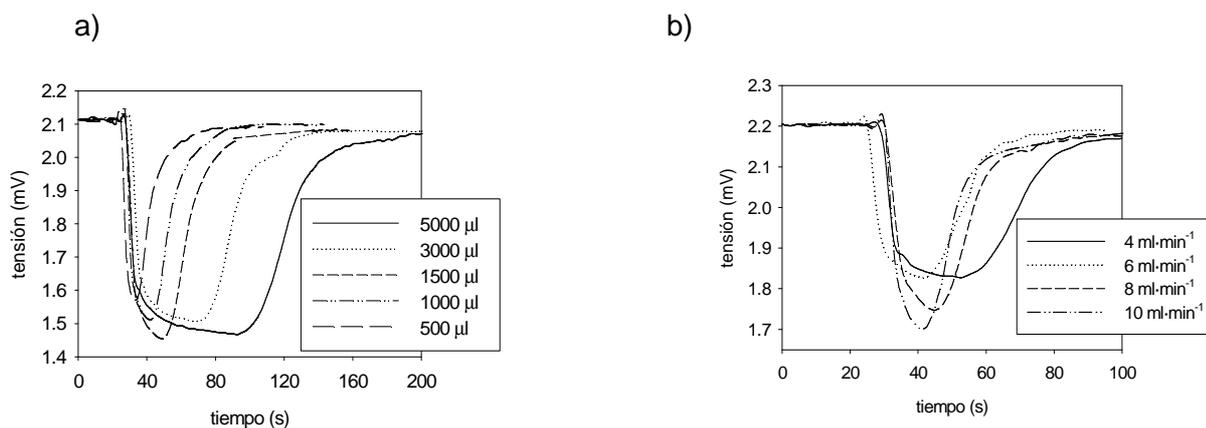


Figura 4.37. Optimización de los parámetros hidrodinámicos del sistema FIA inyectando una disolución patrón $5 \times 10^{-3} \text{ M Pb(NO}_3)_2$ en un tampón 0.05 M acético/acetato a $\text{pH } 6.0$. **a)** Variación del volumen de inyección a un caudal de $8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ y **b)** variación del caudal, empleando un volumen de inyección de $1000 \mu\text{l}$.

Sensibilidad y límite de detección

Se procedió a la determinación del efecto del pH de la disolución acondicionadora sobre algunos parámetros analíticos como el límite de detección (L.D.), la sensibilidad y el intervalo lineal de trabajo. Considerando el pK_{aMEM} del fluoroionóforo, primeramente se escogió una disolución de acético/acetato de magnesio con una adecuada capacidad tamponadora entre $\text{pH}=4$ y 6 . Para optimizar el pH de la disolución acondicionadora, se probaron previamente tres disoluciones tampón (a $\text{pH}=4.0$, 5.0 y 6.0) en un sistema de flujo continuo. En estas condiciones ácidas, el colorante de la membrana está completamente protonado y se obtiene la máxima emisión de fluorescencia posible. En consecuencia, la interacción de la membrana con el analito puede llegar a provocar una variación máxima de señal que se correspondería con la desprotonación total del colorante. La concentración del tampón se fijó de nuevo en 0.05 M , ya que es la menor concentración que asegura un adecuado ajuste del pH de la muestra antes de la detección. Como se observa en la **Figura 4.38**, a $\text{pH}=4$ casi no existe respuesta. El incremento del pH del tampón facilita la liberación de los protones del colorante en la membrana (más fácil cuanto más cerca estemos del

$pK_{aMEM}=10.3$), con un consiguiente aumento de la sensibilidad. Esto permite detectar concentraciones de plomo cada vez menores hasta llegar al L.D. El intervalo de trabajo, que abarca dos décadas de concentración a los valores de pH evaluados, se desplaza a concentraciones de plomo inferiores cuando el pH aumenta, y la sensibilidad, determinada como la pendiente de la curva de calibración, aumenta (pH=4, negligible; pH=5, $-0.10 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$ y pH=6, $-0.17 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$). Fijando un pH de trabajo de 6,0 se obtiene el menor límite de detección (pH=4, L.D.=no detectable; pH=5, L.D.= $1.1 \times 10^{-4} \text{ M}$ y pH=6, L.D.= $6.2 \times 10^{-5} \text{ M}$) y la mayor variación total de señal. El límite de detección se determinó gráficamente, siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el sistema de potasio (**Figura 4.39b**).

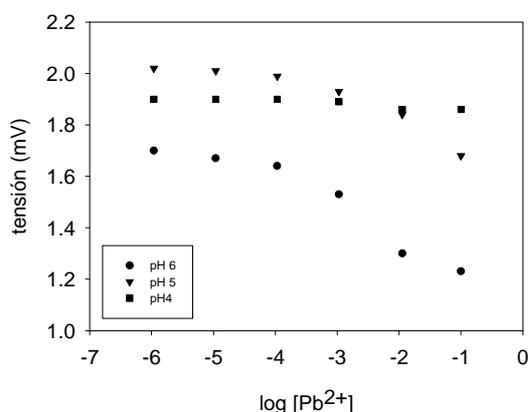


Figura 4.38. Curvas de calibración de la membrana Mpb1 frente a ion plomo (II) a distintos pH de la disolución tampón realizados en la plataforma de fluorescencia miniaturizada en condiciones de flujo continuo. Las disoluciones patrón fueron preparadas en un tampón de acetato de magnesio 0.05 M ajustado al pH seleccionado.

A continuación, se realizaron calibrados frente a ion plomo (II) en el sistema FIA optimizado. En las **Figura 4.39a** y **Figura 4.39b** respectivamente, se muestran ejemplos representativos de registros obtenidos con el sistema de flujo continuo, así como la correspondiente curva de calibrado. La sensibilidad ($0.16 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$) y el L.D. ($8.5 \times 10^{-6} \text{ M}$) son calculados en condiciones no estacionarias, por lo que se espera una cierta variación de éstos respecto a los valores previamente obtenidos en el sistema de flujo continuo. En este caso, la sensibilidad apenas ha variado y el L.D. ha disminuido.

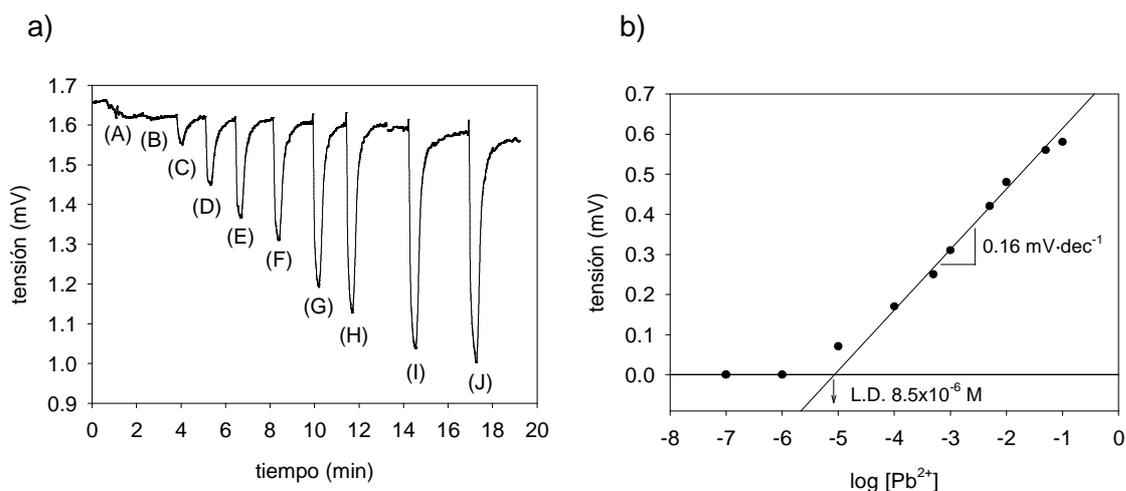


Figura 4.39. a) Diagrama de la inyección de distintas disoluciones patrón de plomo en el sistema FIA optimizado. Concentraciones de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (M): (A) 1×10^{-7} , (B) 1×10^{-6} , (C) 1×10^{-5} , (D) 1×10^{-4} , (E) 5×10^{-4} , (F) 1×10^{-3} , (G) 5×10^{-3} , (H) 1×10^{-2} (I) 5×10^{-2} y (J) 1×10^{-1} . **b)** Curva de calibración de plomo correspondiente; se representan las alturas de pico y se muestran el límite de detección (L.D.) y la pendiente del intervalo de respuesta lineal.

Repetitividad y reproducibilidad

La repetitividad de las medidas se evaluó inyectando sucesivamente una disolución patrón de plomo (II) 1×10^{-4} M en el sistema previamente optimizado (**Figura 4.40**). Se calculó la desviación estándar relativa a partir de las alturas de pico registradas, obteniéndose una RSD ($n=15$) de 5.4%. La señal es reversible en un corto periodo de tiempo. Para el estudio de la reproducibilidad, se siguió la evolución de la sensibilidad a lo largo de cinco calibrados secuenciales empleando la misma membrana, y se observó que disminuía con cada calibrado (**Figura 4.41**). La reproducibilidad es baja, seguramente debida a la fotodescomposición del fluoroionóforo, bajo la prolongada exposición a la radiación láser.

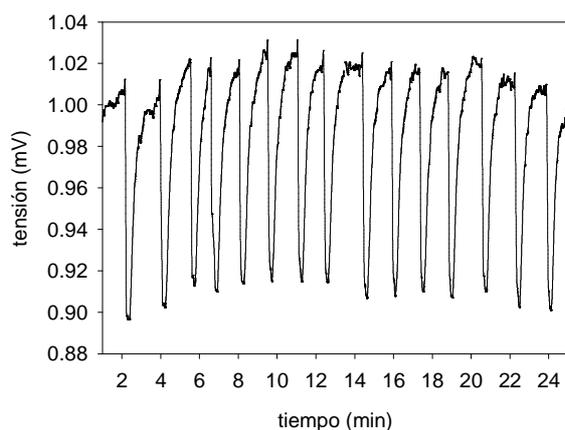


Figura 4.40. Registro de la respuesta de la membrana frente a inyecciones sucesivas de 1000 µl de una disolución patrón 1x10⁻⁴ M Pb(NO₃)₂ en el sistema FIA optimizado para evaluar la repetitividad.

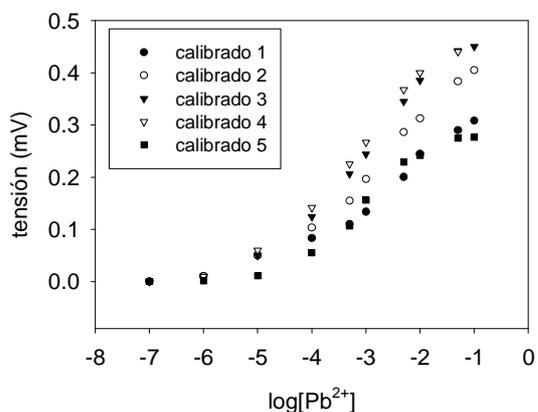


Figura 4.41. Curvas de calibrado de ion plomo (II) en el sistema FIA optimizado de cinco calibrados de plomo consecutivos empleando el mismo optodo.

Interferencias iónicas

Para validar el empleo de la plataforma sensora miniaturizada en muestras naturales, se evaluó la selectividad de la membrana de ion plomo frente a cationes potencialmente interferentes del ionóforo empleado. Los cationes evaluados son los que se encuentran de forma habitual en agua potable de red de distribución (ion amonio, calcio, sodio y potasio) y otros iones de metales pesados (aluminio, cadmio y zinc) que pueden ser encontrados en aguas contaminadas con plomo. Para determinar la selectividad de la membrana se utilizó el método de las interferencias fijas (FIM, Fixed Interference Method). Aunque se demostró que el ion cobre (II) no interaccionaba con el fluoroinóforo empleado, **ca3**, su efecto sobre la respuesta también fue evaluado. Se observó que, empleando el optodo Mpb1, la señal obtenida no era reversible, y que existe algún tipo de interacción del ion cobre con el

ionóforo de plomo ETH5435, que provoca el envenenamiento de la membrana. La aplicación de la membrana en la determinación de plomo en agua de red presenta como inconveniente la presencia de cobre a niveles de concentración entre 10 y 100 veces superior al ion principal. Para evitar este problema se estudió el empleo de ácido picolínico en la disolución acondicionadora como agente enmascarante. Se midieron muestras de agua de red (que contenían Cu^{2+}) utilizando una disolución acondicionadora de acetato de magnesio (II) 0.05M y 1×10^{-3} M de ácido picolínico a pH=6. En estos experimentos se observó la desaparición del pico correspondiente a la respuesta de la membrana a Cu^{2+} , lo que permitió verificar la efectividad del ácido picolínico como enmascarante de dicho metal.

Durante los estudios dirigidos a determinar el potencial efecto interferente de diferentes iones, los calibrados se llevaron a cabo incrementando la concentración de plomo de disoluciones que incorporaban una concentración constante del ion interferente. En todos los casos, la concentración de estos iones se fijó en 10^{-3} M, excepto para el caso del ion cadmio (II) donde la concentración fue de 10^{-4} M. [3] Los coeficientes de selectividad se determinaron gráficamente a partir de la concentración de plomo obtenida en la intersección de los dos segmentos lineales extrapolados de la curva de calibrado, y considerando la concentración del ion interferente de fondo. El procedimiento es análogo al seguido con los electrodos selectivos a iones, tal y como se explica en el capítulo 3 (ecuación (25)).

Los coeficientes de selectividad obtenidos ($\log K_{\text{POT}} = -2.60; -2.14; -2.34; -2.01; -3.21; 0.45$ y -2.41 para $\text{Na}^+; \text{K}^+; \text{NH}_4^+; \text{Ca}^{2+}; \text{Al}^{3+}; \text{Cd}^{2+}$ y Zn^{2+} , respectivamente) prueban la idoneidad del optodo formulado para el análisis de ion plomo (II) en agua y en extractos de suelos contaminados, considerando las concentraciones usuales de estos iones potencialmente interferentes en este tipo de muestras. [47] Aunque el ion Cd^{2+} presenta una importante interferencia que podría llevarnos a decir que el ionóforo de Pb es igual de selectivo para plomo que para cadmio, la concentración de este último ion en los extractos de suelos contaminados a los que se pretende aplicar el sistema de medida es despreciable. Asimismo, este tipo de muestras no contienen Cu^{2+} .

Aplicación de la plataforma de fluorescencia en la determinación de ion plomo (II) en extractos de suelos contaminados

El sensor se aplicó al análisis del contenido de plomo en extractos acéticos de suelos contaminados procedentes de una empresa minera de México. Con el objetivo de validar su funcionamiento, los resultados obtenidos se compararon con los suministrados por un método estándar de referencia. En este caso se utilizó la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente, (ICP-OES, *Inductively Coupled Plasma Optical*

Emission Spectroscopy). Los extractos acéticos fueron inyectados en el sistema FIA optimizado por triplicado dejando circular la disolución acondicionadora entre muestras para asegurar la recuperación total de la línea base. Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 4.19**. Los intervalos de confianza de las medidas efectuadas con el sistema propuesto se calcularon a partir del error de interpolación de cada muestra en el intervalo de respuesta lineal de la curva de calibrado, mientras que los intervalos de confianza de las medidas con ICP-OES se obtuvieron de las medidas de tres replicados. No se encontraron diferencias significativas ($|t_{\text{tab}}|=2.17 > |t_{\text{exp}}|=-2.10$) entre los resultados obtenidos por ambos métodos al aplicar la prueba t para medias de dos muestras emparejadas, con un 95% de confianza.

Tabla 4.19. Contenido de plomo en extractos acéticos de suelos contaminados analizado con la plataforma de fluorescencia miniaturizada en el sistema FIA optimizado y por el método de referencia (ICP-OES).

Muestra	Concentración de Pb^{2+} ($\times 10^{-5}$ M)	
	optodo	ICP-OES
1	0.8 ± 0.1	2.32 ± 0.02
1'	0.8 ± 0.1	2.27 ± 0.03
2	1.95 ± 0.01	3.0 ± 0.1
2'	1.95 ± 0.01	2.9 ± 0.1
3	8.61 ± 0.01	18 ± 1
4	1.66 ± 0.03	1.06 ± 0.02
4'	1.24 ± 0.03	1.11 ± 0.02
5	1.4 ± 0.03	1.54 ± 0.03
5'	1.3 ± 0.03	1.50 ± 0.03
6	1.3 ± 0.02	2.0 ± 0.2
6'	1.2 ± 0.02	1.9 ± 0.1

' son replicados

4.4.2. Desarrollo de una sonda de fluorescencia para la determinación de ion plomo (II) en discontinuo

La determinación de plomo es de especial importancia, debido a su toxicidad, [48] que se ve magnificada por los procesos de bioacumulación que éste sufre. El amplio uso de este metal en aplicaciones industriales hace que las actividades antropogénicas sean la principal fuente de polución medioambiental de plomo. La preocupación generada por sus severos efectos negativos en la salud ha promovido el desarrollo de métodos analíticos para

determinarlo. [49-52] A menudo se trata de técnicas analíticas basadas en espectrometría atómica, tanto de absorción como de emisión. Sin embargo, estas técnicas necesitan de instrumentación compleja, de personal especializado y de ambientes controlados de laboratorios analíticos centralizados.

Actualmente, y como alternativa, existe una demanda creciente de instrumentación portátil y de bajo coste para llevar a cabo medidas preliminares *in situ*, con la finalidad de establecer niveles de concentración de plomo en suelos y aguas, y ser capaces así de identificar rápidamente episodios de contaminación.

Con el objetivo de construir un sensor de fluorescencia de aplicación *in situ* a medidas medioambientales, que fuera más portátil y manejable, se diseñó y construyó una sonda de fluorescencia para realizar medidas en discontinuo. La sonda está constituida por una fibra óptica polimérica (POF, *Polymer Optical Fiber*) para guiar la luz de excitación procedente de la fuente al área sensora (donde se deposita el optodo) y otra POF para recoger la luz fluorescente emitida por la membrana y dirigirla hacia el detector. El empleo de POFs asegura la ausencia de ruido modal en el área de detección. La disposición de las POFs en la sonda se optimizó en el Grupo de Tecnologías Fotónicas I3A de la Universidad de Zaragoza, mediante el desarrollo de un programa de simulación basado en la discretización homogénea de la superficie de la membrana. Con este programa, se simularon distintas configuraciones (distancia de las fibras a la membrana y ángulo entre ellas), así como la influencia de las características de las fibras (apertura numérica (NA) y patrón de radiación) en el funcionamiento del dispositivo.

El sistema instrumental óptico consiste en un láser de diodo que emite a 650 nm como fuente de excitación, la sonda sensora optoquímica basada en POFs y el mismo sistema de detección empleado en la plataforma fluorosensora miniaturizada, que como ya se ha comentado, incluye un filtro óptico, un fotodetector (fotodiodo PIN de silicio) y un amplificador lock-in (**Figura 4.42**). La sonda fluorescente se activó químicamente con el optodo previamente optimizado selectivo a plomo Mpb1 y se caracterizó su respuesta. Finalmente, se aplicó a la medida del contenido de plomo en extractos acéticos de muestras de suelos contaminados.

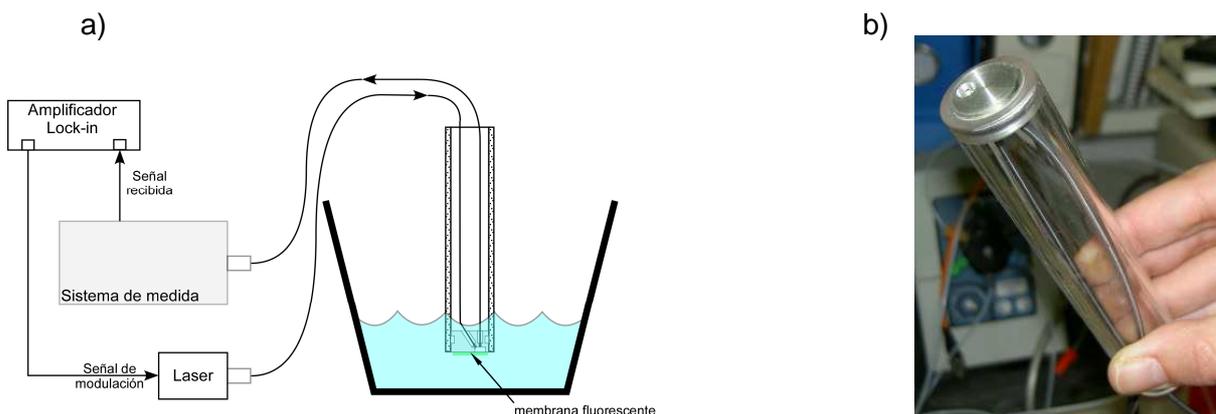


Figura 4.42. Esquema completo del sistema desarrollado (izquierda) y fotografía de la sonda de fluorescencia antes de la deposición de la membrana (derecha).

4.4.2.1. Respuesta analítica

El optodo empleado en la sonda es el mismo que en la plataforma fluorosensora, por lo que el mecanismo de respuesta es idéntico. Se mide la disminución de la intensidad de fluorescencia por desprotonación del fluoroionóforo al intercambiar sus protones cuando el ionóforo interacciona con el plomo de la muestra.

Para llevar a cabo la evaluación de los parámetros analíticos de calidad de la sonda activada con el optodo Mpb1, ésta fue sometida a diversos calibrados, en los cuales la sonda era sumergida en una solución tampón de acetato de magnesio 0.05M a pH=6. A dicha disolución se adicionaron distintos volúmenes de disoluciones patrón de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ a distintas concentraciones. Se empleó la técnica de la adición estándar para eliminar los efectos de matriz de las muestras. Análogamente a los estudios previamente descritos, a partir de las curvas de calibrado obtenidas, se determinó el L.D.= 7×10^{-6} M Pb^{2+} ; la sensibilidad, de -35.10 mV·década de concentración⁻¹; la reproducibilidad, con una RSD (n=5) de 5.1%; y el intervalo de respuesta lineal, de 7×10^{-6} - 1×10^{-2} M Pb^{2+} . El tiempo de respuesta de la sonda (**Figura 4.43**), calculado como el tiempo necesario para alcanzar el estado estacionario, es del orden de un minuto ($t_{r95}=1.0 \pm 0.5$ min).

Además, se comprobó que la respuesta analítica es completamente reversible, como se muestra en la **Figura 4.44**, en la que se aprecia la recuperación total de la señal al sumergir la sonda en una disolución tampón de acetato de magnesio 0.05M a pH=6, como punto inicial. De entre los tampones ensayados, fue escogido el acetato de magnesio al no presentar ninguna interferencia en la medida de ion plomo (II); fue ajustado a pH=6 (dentro del intervalo pK_a (4.8 ± 2), ya que fue a este valor de pH en el que la sonda mostró una mayor sensibilidad.

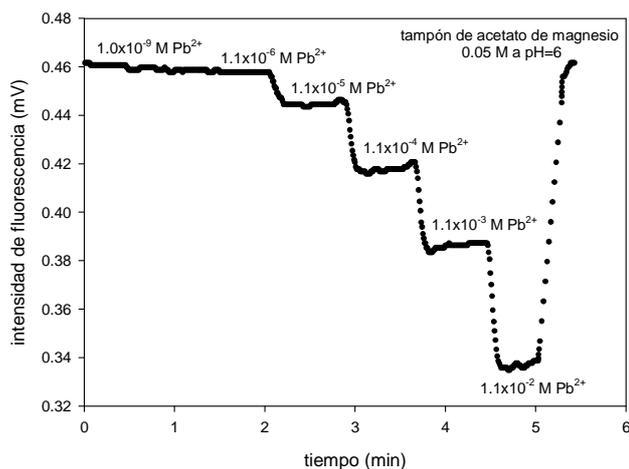


Figura 4.43. Tiempo de respuesta de la sonda fluorescente a lo largo de un calibrado a ion plomo (II) y posterior emplazamiento de la sonda en tampón de acetato de magnesio 0.05 M a pH=6 para recuperar la señal inicial.

Los parámetros analíticos obtenidos con el dispositivo desarrollado demuestran un adecuado comportamiento para su aplicación en la determinación del contenido de ion plomo (II) en muestras naturales contaminadas. Sin embargo, y como ya se ha comentado a lo largo del presente trabajo, la tendencia a la fotodegradación de los fluoroionóforos del tipo cianina representa una importante desventaja en este tipo de aplicaciones. Por este motivo, se estudió la fotoestabilidad del optodo Mpb1 bajo la exposición de un láser de diodo de 0.5 mW de potencia emitiendo a 650 nm sobre una superficie de 1 mm² de membrana. Se calculó un 25% de descomposición del fluoroionóforo tras de 2h de continua irradiación como medida del tiempo de vida del fluoroionóforo en el medio membrana y utilizando la sonda. Por lo tanto, para evitar pérdidas significativas de señal debidas a la fotodegradación, el optodo no debería emplearse más de 1h seguida (intervalo de tiempo en el que la pérdida de señal no es significativa). Otra posibilidad sería efectuar medidas a intervalos de tiempo predeterminados que limiten la irradiación de la membrana.

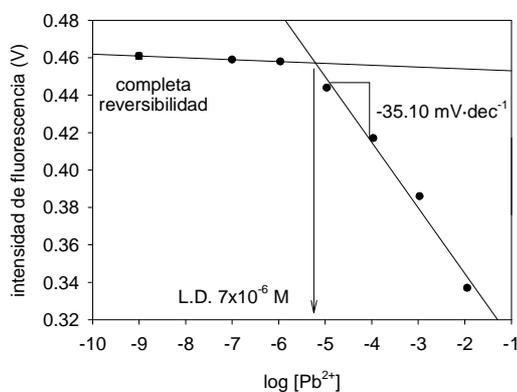


Figura 4.44. Curva de calibrado de Pb²⁺ del optodo Mpb1 depositado en la sonda desarrollada en tampón acetato de magnesio 0.05M a pH=6.

Otra alternativa sería el empleo de una fuente de luz pulsada y medir tiempos de vida de fluorescencia, en vez de intensidad de fluorescencia. En este tipo de medidas, la membrana sería iluminada durante menos tiempo y el fluoroionóforo, probablemente, descompondría más lentamente. Es en esta dirección hacia la que van dirigidos los trabajos futuros en nuestro grupo de investigación.

4.4.2.2. Aplicación de la sonda de fluorescencia en la determinación de ion plomo (II) en extractos de suelos contaminados

Para evaluar la respuesta de la sonda en muestras naturales, ésta se aplicó a la determinación de ion plomo (II) en muestras provenientes de los alrededores de una compañía minera en Torreón (Coahuila, México), empleando el método de adición estándar (**Tabla 4.20**). La prueba t para medias de dos muestras emparejadas, con un 95% de confianza, se empleó para comparar los resultados obtenidos con la sonda selectiva a plomo con los obtenidos con el método ICP-OES, como referencia. La comparación revela que no existen diferencias significativas entre ambos métodos, ($|t_{\text{tab}}|=|2.36| > |t_{\text{exp}}|=|1.77|$). Por lo tanto, se demuestra la viabilidad de la sonda propuesta como una alternativa portable y de bajo coste para determinar el contenido de plomo en extractos ácidos de suelos contaminados.

Tabla 4.20. Concentración de ion plomo (II) en los extractos de suelos contaminados analizados con la sonda fluorescente y por el método de referencia ICP-OES.

Concentración de Pb ²⁺ (x 10 ⁻⁵ M)	
sonda	ICP-OES
8.670±0.003	5.1±0.2
4.790±0.002	3.0±0.1
2.3±0.2	2.32±0.02
22.680±0.002	18.3±0.1
18.680±0.002	17.9±0.2
17.910±0.002	18.3±0.4
17.370±0.002	18.3±0.4
2.800±0.001	2.36±0.01

Como conclusión, se ha diseñado y construido una sonda sensora para medidas de fluorescencia simple y que representa dos importantes ventajas respecto a la instrumentación desarrollada anteriormente en el presente trabajo. Éstas son su versatilidad y su portabilidad. La versatilidad viene dada por la posibilidad de variar la formulación de la

membrana selectiva a iones: al cambiar el ionóforo pueden analizarse distintos analitos y, como consecuencia, otras aplicaciones medioambientales serían posibles. Por otro lado, el uso de POFs posibilita determinaciones *in situ*, lo cual es deseable en la mayoría de las aplicaciones.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Encinas, C.; Otazo, E.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, J. "Croconines: new acidochromic dyes for the near infrared region". *Tetrahedron Letters*, 2002, 43, 8391-8393.
- [2] Puyol, M.; Encinas, C.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, J. "Synthesis of new ketocyanine dyes for the development of optical sensors". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2006, B115, 287-296.
- [3] Puyol, M.; Salinas, I.; Garcés, I.; Villuendas, F.; Llobera, A.; Domínguez, C.; Alonso, J. "Improved integrated waveguide absorbance optodes for ion-selective sensing". *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 3354-3361.
- [4] Cao, X.; Tolbert, R. W.; McHale, J. L.; Edwards, W. D. "Theoretical study of solvent effects on the intramolecular charge transfer of a hemicyanine dye". *Journal of Physical Chemistry, A*, 1998, 102, 2739-2748.
- [5] Lehmann, F.; Mohr, G. J.; Czerney, P.; Grummt, U-W. "Synthesis of amphiphilic styrylpyridinium and styrylquinolinium hemicyanines and merocyanines". *Dyes and Pigments*, 1995, 29, 85-94.
- [6] Mannini, M.; Gambinossi, F.; Baglioni, P.; Caminati, G. "Immobilization of a fluorescent dye in Langmuir-Blodgett films". *Bioelectrochemistry*, 2004, 63, 9-12.
- [7] Yoon, C-B.; Shim, H-K. "Facile synthesis of new NLO-functionalized polyimides via Mitsunobu reaction". *Journal of Materials Chemistry*, 1999, 9, 2339-2344.
- [8] Moon, K-J.; Shim, H-K.; Lee, K-S.; Zieba, J.; Prasad, P. N. "Synthesis, characterization, and second-order optical nonlinearity of a polyurethane structure functionalized with a hemicyanine dye". *Macromolecules*, 1996, 29, 861-867.
- [9] Gallos, L. K.; Stathatos, E.; Lianos, P.; Argyrakos, P. "Photophysical behavior of a homologous series of amphiphilic hemicyanine dyes in thin AOT films". *Chemical Physics*, 2002, 275, 253-260.
- [10] Encinas, C.; Miltsov, S.; Otazo, E.; Rivera, L.; Puyol, M.; Alonso, J. "Synthesis and spectroscopic characterisation of heptamethincyanine NIR dyes for their use in optochemical sensors". *Dyes and Pigments*, 2006, 71, 28-36.
- [11] Puyol, M.; Encinas, C.; Rivera, L.; Miltsov, S.; Alonso, J. "Nortricarbocyanine dyes as suitable long wavelength pH indicators for chemical sensing". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2007, B122, 53-59.

- [12] Matsuoka M. (ed.) *Infrared absorbing dyes*, Plenum Press, New York, 1993.
- [13] Rivera, L.; Puyol, M.; Miltsov, S.; Villuendas, F.; Alonso, J. "New ketocyanine-based fluorescent optodes for the development of integrated waveguide sensors". *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 2006, 114, 705-712.
- [14] Brooker, L. G. S.; White, F. L.; Keyes, G. H.; Smyth, C. P.; Oesper, P. F. "Color and constitution. II. Absorptions of some related vinylene-homologous series". *Journal of the American Chemical Society*, 1941, 63, 3192-3203.
- [15] Hofer, L. J. E.; Grabenstetter, R. J.; Wiig, E. O. "The fluorescence of cyanine and related dyes in the monomeric state". *Journal of the American Chemical Society*, 1950, 72, 203-209.
- [16] Miltsov, S.; Encinas, C.; Alonso, J. "New cyanine dyes: norindosquarocyanines". *Tetrahedron Letters*, 1999, 40, 4067-4068.
- [17] Simard T. P.; Yu J. H.; Zebrowski Y. J. M.; Haley N. F., Detty M. R. "Soluble, infrared-absorbing croconate dyes from 2,6-di-tert-butyl-4-methylchalcogenopyrylium salts". *Journal of Organic Chemistry*, 2000, 65, 2236-2238.
- [18] Brooker L.G.S., Fumia Ar. Jr. Fr.Patent 1 574 253 (1969) (CA 73:26632)
- [19] Smothers W.K. US Patent 4 917 977
- [20] Slominskii, Yu. L.; Radchenko, I. D. "Diaminopolyenyl ketones and their reactions". *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal* (edición rusa), 1977, 43, 263-270.
- [21] Makin, S. M.; Boiko, L. I.; Shavrigina, O. A. "Study of the aminoformylation of unsaturated aldehydes, 2-alkoxy aldehydes, and their alicyclic acetals and ketones". *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1977, 13, 1189-1192.
- [22] Slominskii, Yu. L.; Radchenko, I. D.; Popov, S. V.; Tolmachev, A. I. "Polymethine dyes with hydrocarbon bridges. Enamine ketones in the chemistry of cyanine dyes". *Zhurnal Organicheskoi Khimii*, 1983, 19, 2134-2142.
- [23] Sturmer, D. M. *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*, John Wiley and Sons, Inc.: New York, 1979, 7, pp. 335-358.

- [24] Harris, D. A. *Análisis químico cuantitativo*, Editorial Reverté S. A.: Barcelona, 2001, pp. 535-537.
- [25] Baker, M. E. J.; Narayanaswamy, R. "The modelling and control of the pH response of an immobilized indicator". *Sensors and Actuators B*, 1995, 29, 368-373.
- [26] Hamer, F. M., en: Weissberger, A. (ed.), *The chemistry of heterocyclic compounds*, vol. 18, Interscience Publishers: New York, 1964, cap. 16.
- [27] Fry, D. J. *Cyanine dyes and related compounds*, en: Coffey, S.; Ansell, M.; Rood, F. (eds.), "Chemistry of carbon compound", 2nd edition, Elsevier Scientific: Amsterdam, 1977.
- [28] Puyol, M.; Miltsov, S.; Salinas, I.; Alonso, J. "Ketocyanine dyes: H⁺-selective ionophores for use in integrated waveguides absorbance optodes". *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 570-576.
- [29] Skoog, D. A.; Leary, J. J. *Análisis instrumental*, McGraw-Hill: Madrid, 1994, pp 177-180.
- [30] Puyol, M. Trabajo de investigación, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Química, 1998.
- [31] Encinas, C. Trabajo de investigación, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Química, 1998.
- [32] Encinas, C. Tesis de doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Química, 2003.
- [33] Puyol, M. Tesis de doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Química, 2002.
- [34] Miltsov, S.; Encinas, C.; Alonso, J. "Novel synthesis of ketocyanine dyes". *Tetrahedron Letters*, 2001, 42, 6129-6131.
- [35] Patonay, G.; Casay, G. A.; Lipowska, M.; Strekowski, L. "Spectroscopic studies of a near-infrared absorbing pH sensitive aminodienone-carbocyanine dye system". *Talanta*, 1993, 40, 935-942.
- [36] Kessler, M. A.; Wolfbeis, O. S. "New highly fluorescent ketocyanine polarity probes". *Spectrochimica Acta*, 1991, 47A, 187-192.
- [37] Banerjee, D.; Kumar Laha, A.; Bagchi, S. "Studies of solvation in homogeneous media by a spectroscopic method: a ketocyanine dye in neat and mixed binary solvents". *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemical*, 1995, 85, 153-159.

[38] Baraldi, I.; Brancolini, G.; Momicchioli, F.; Ponterini, G.; Vanossi, D. "Solvent influence on absorption and fluorescence spectra of merocyanine dyes: a theoretical and experimental study". *Chemical physics*, 2003, 288, 309-325.

[39] Doroshenko, A. O.; Pivovarenko, V. G. "Fluorescence quenching of the ketocyanine dyes in polar solvents: anti-TICT behavior". *Journal of photochemistry and photobiology A: Chemical*, 2003, 156, 55-64.

[40] Doroshenko, A. O.; Grigorovich, A. V.; Posokhov, E. A. Pivovarenko, V. G.; Demchenko, A. P. "Bis-azacrown derivative of dibenzylidene-cyclopentanone as alkali earth ion chelating probe: spectroscopic properties, proton accepting ability and complex formation with Mg^{2+} and Ba^{2+} ions". *Molecular Engineering*, 1999, 8, 199-215.

[41] Das, P. K.; Pramanik, R.; Banerjee, D.; Bagchi, S. "Studies of solvation of ketocyanine dyes in homogeneous and heterogeneous media by UV/vis spectroscopic method". *Spectrochimica Acta Part A*, 2000, 56, 2763-2773.

[42] Melhuish, W. H. "Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: effect of solvent and concentration of the fluorescent solute". *Journal of physical chemistry*, 1961, 65, 229-235.

[43] Demas, J. N.; Crosby, G. A. "The measurement of photoluminescence quantum yields. A review". *Journal of physical chemistry*, 1971, 75, 991-1024.

[44] Haugland, R. P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6^a ed. Spence, M.T.Z. Molecular Probes: USA, 1996.

[45] Bakker, E.; Simon, W. "Selectivity of ion-sensitive bulk optodes". *Analytical Chemistry*, 1992, 64, 1805-1812.

[46] Umezawa, Y. *Handbook of Ion-selective electrodes: selectivity coefficients*, CRC Press: Boca Raton, Florida, USA, 1990, p. 587.

[47] Fonseca, O. Tesis de doctorado, Universitat Autònoma de Barcelona, Facultat de Química, 2003.

[48] Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Cairns J. *Handbook of Ecotoxicology*, Washington D.C.: Lewis Publishers, 1994.

[49] Ilander, A.; Vaeisaenen, A. "An ultrasound-assisted digestion method for the determination of toxic element concentrations in ash samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, 2007, 602, 195-201.

[50] Portugal, L. A.; Ferreira, H. S.; dos Santos, W. N. L.; Ferreira, S. L. C. "Simultaneous pre-concentration procedure for the determination of cadmium and lead in drinking water employing sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry". *Microchemical Journal*, 2007, 87, 77-80.

[51] Bai, F.; Fan, Z. "Flow injection micelle-mediated methodology for determination of lead by electrothermal atomic absorption spectrometry". *Microchimica Acta*, 2007, 159, 235-240.

[52] Monticelli, D.; Ciceri, E.; Dossi, C. "Optimization and validation of an automated voltammetric stripping technique for ultratrace metal analysis". *Analytica Chimica Acta*, 2007, 594, 192-198.



CONCLUSIONES

5. Conclusiones

En el presente trabajo se han diseñado, construido y evaluado dos fluorosensores miniaturizados y portátiles, que pueden representar una alternativa a la instrumentación analítica clásica de elevado coste, gran tamaño y elevado consumo de reactivos, que necesita de mantenimiento y de personal especializado para su utilización. Asimismo, los dos dispositivos desarrollados presentan una gran versatilidad para su posible uso en la detección de diversos analitos en función del optodo seleccionado. Los optodos empleados en los dispositivos desarrollados incluyen cromo(fluoro)ionóforos que han sido diseñados, sintetizados y caracterizados en el presente trabajo para operar con la instrumentación miniaturizada y de bajo coste disponible.

El primer dispositivo opera integrado como detector en un sistema de análisis por inyección en flujo continuo (FIA), y tanto con un optodo selectivo a potasio, como con uno selectivo a plomo, ha mostrado unas apropiadas características analíticas, en términos de sensibilidad y límite de detección, buena reproducibilidad, reducidos tiempos de respuesta, excelente reversibilidad y aceptable fotoestabilidad. Su utilización en la determinación de potasio en muestras dopadas de agua potable de red y de plomo en extractos de suelos contaminados demostró su aplicabilidad en muestras reales.

El segundo dispositivo consiste en una sonda más portátil, más manejable y en la que la intercambiabilidad de la membrana es más fácil, para medidas *in-situ* y en discontinuo. Ésta se activó químicamente con un optodo selectivo a plomo y mostró adecuadas propiedades analíticas, como son una buena sensibilidad, un límite de detección aceptable, tiempo de respuesta reducido y alta reversibilidad. Finalmente, se aplicó a la determinación de plomo en muestras naturales (en extractos de suelos contaminados) y se verificó su buen funcionamiento.

Durante el periodo de realización del presente trabajo se han ido alcanzando una serie de hitos parciales ya señalados en la descripción inicial de los objetivos previstos y que se detallan a continuación:

1. Se han diseñado, sintetizado y caracterizado nuevos colorantes cianina para su utilización como cromo(fluoro)ionóforos en optodos, tanto en medidas basadas en absorbancia como en fluorescencia. Concretamente, se han sintetizado tres tipos de compuestos cianina: croconinas, cetocianinas y (nor)cianinas-anilinas. Los resultados obtenidos en su caracterización fueron los esperados atendiendo a las premisas establecidas en su diseño. Los colorantes presentan excelentes propiedades ópticas, como son longitudes de onda de absorción cercanas a la emisión de los láseres de diodo comerciales, altos coeficientes de absorción molar y algunos de ellos (las formas básicas de todas las cetocianinas estudiadas y las formas ácida y básica de las cianinas-anilinas **ca3**, **ca5** y **ca8**), intensas emisiones de fluorescencia. La inmovilización en membranas poliméricas de algunos de estos colorantes ha demostrado su idoneidad como elementos cromo(fluoro)ionóforos de membranas ópticas selectivas a iones. Como única limitación, se ha encontrado la reducida fotoestabilidad de los colorantes en el medio membrana.

2. De los colorantes sintetizados y caracterizados en solución etanólica y en membrana de PVC plastificado como cromo(fluoro)ionóforos de pH, se ha escogido una cianina-anilina (**ca3**) por su correcto comportamiento ácido-base, su adecuado pK_{aMEM} , la cercanía de su longitud de onda de absorción máxima a la de emisión de un láser de diodo y sus propiedades fluorescentes. Dada su alta absorptividad que favorece una alta sensibilidad, su reversibilidad y fotoestabilidad se aplicó en optodos en combinación con ionóforos comerciales. Se han ensayado distintas composiciones de membrana y finalmente se han formulado dos optodos empleando **ca3** como cromo(fluoro)ionóforo: uno selectivo a potasio, empleando la valinomicina como ionóforo (M4) y otro selectivo a plomo, empleando el ionóforo ETH5435 (Mpb1). Previamente, estos optodos se han caracterizado en absorbancia utilizando instrumentación convencional.

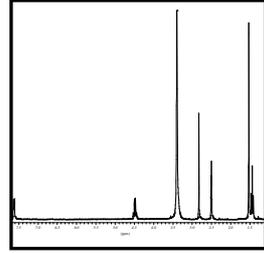
3. Se han construido, en colaboración con el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Zaragoza y el Grupo de Tecnologías Fotónicas I3A de la Universidad de Zaragoza, dos dispositivos de sensado basados en medidas de fluorescencia, compuestos por elementos ópticos discretos y miniaturizados.

- El primero consiste en una plataforma fluorosensora para análisis en flujo continuo, en la que se integra una celda de medida especialmente diseñada en el GSB, donde va insertada la membrana sensora depositada en un portaobjetos. El dispositivo incluye una fibra óptica responsable de conducir la luz de excitación proveniente de un laser semiconductor modulado por un lock-in, que emite a 650 nm; un filtro óptico centrado a 680 nm, encargado de filtrar la luz emitida por el optodo; dos lentes para focalizar la luz y un preamplificador de transimpedancia conectado a un fotodiodo de silicio PIN.
- El segundo dispositivo es una sonda de fluorescencia para medidas discretas (discontinuas) *in-situ*, que incorpora, para guiado de la radiación, dos fibras POF, La configuración final optimizada de la sonda se seleccionó después de un proceso de simulación. Para la detección de señal, se acopla a la plataforma fluorosensora previamente desarrollada. Además, esta nueva configuración ofrece más portabilidad y manejabilidad.

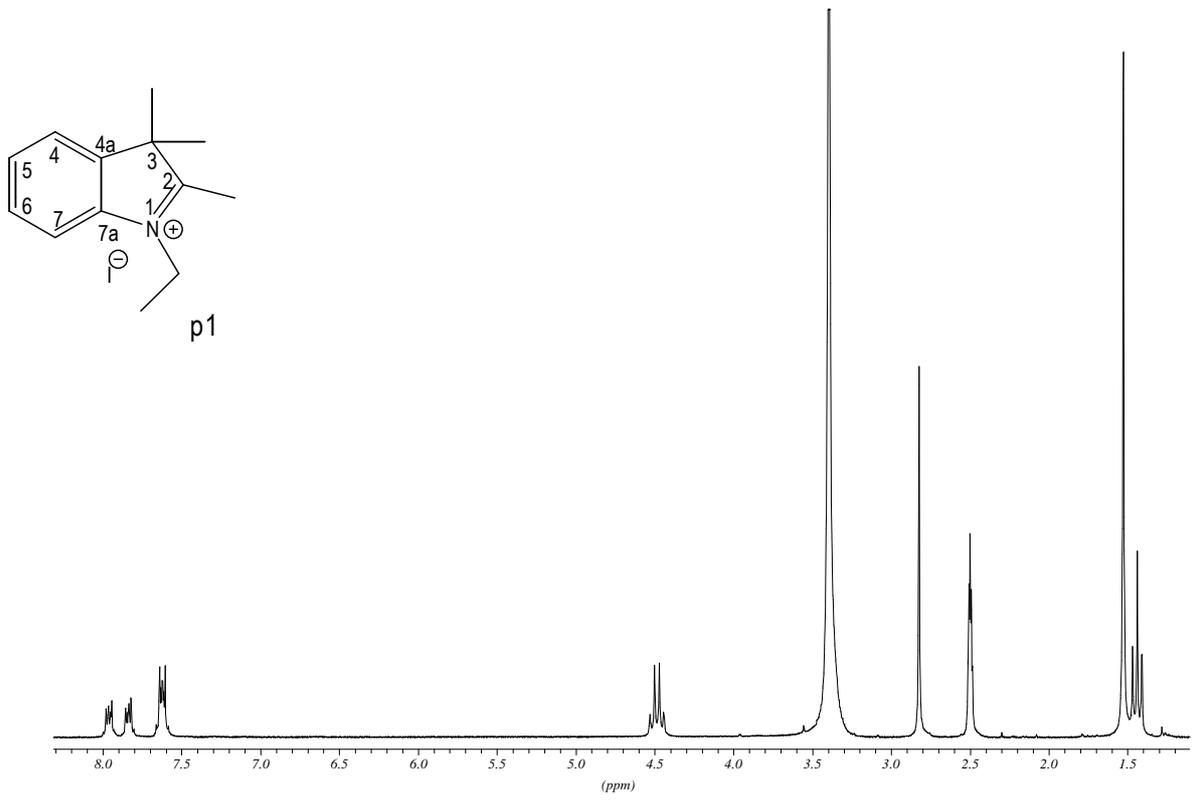
4. Inicialmente, y para comprobar la validez del dispositivo, la plataforma fluorosensora se ha activado químicamente con el optodo selectivo a potasio M4. Posteriormente, se ha activado con el optodo Mpb1, selectivo a ion plomo. En cada caso, se ha diseñado y optimizado un sistema de análisis por inyección en flujo bicanal como metodología simple, automática y reproducible para la caracterización de los optodos. Para las membranas M4 y Mpb1 se ha evaluado la sensibilidad (M4: $0.71 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$; Mpb1: $-0.16 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$), el límite de detección (M4: $2.2 \times 10^{-5} \text{ M K}^+$; Mpb1: $1.2 \times 10^{-5} \text{ M Pb}^{2+}$), la repetitividad (RSD(M4):4.2%; RSD(Mpb1):5.4%), la reproducibilidad, el tiempo de vida y las interferencias iónicas en ambas situaciones. Se ha observado que el Cu^{2+} provoca envenenamiento de la membrana selectiva a plomo, probablemente debido a algún tipo de interacción con el ionóforo. El uso de ácido picolínico en la solución tampón, solventa el problema. Los resultados demuestran la versatilidad del sistema de medida y su buen funcionamiento. Éste se ha verificado realizando medidas de muestras naturales (de potasio en agua de red dopada y de plomo en extractos de suelos contaminados) y comparando los resultados obtenidos con un método de referencia (ICP-OES), con el cual no se han encontrado diferencias significativas.

5. La sonda de fluorescencia se ha activado químicamente con el optodo selectivo a plomo Mpb1 y se ha caracterizado su respuesta analítica. Se ha obtenido una sensibilidad de $-35.10 \text{ mV}\cdot\text{dec}^{-1}$, un L.D. de $7 \times 10^{-6} \text{ M}$ de Pb^{2+} , una repetitividad (RSD) de

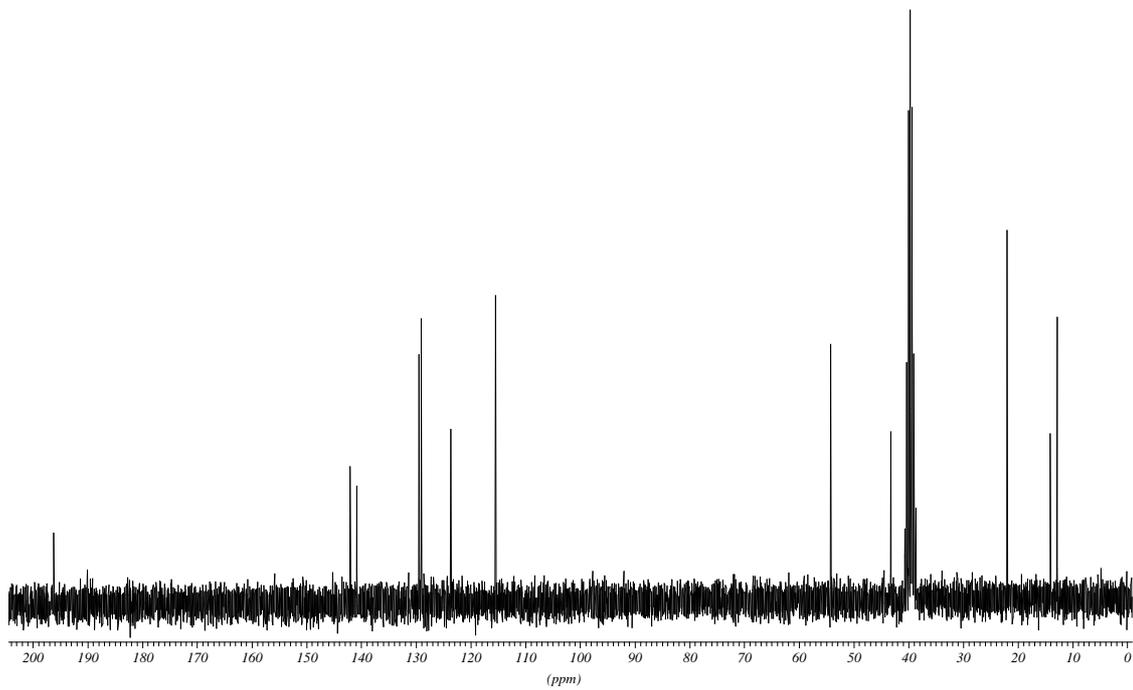
5.1% y un tiempo de respuesta de 1.5 ± 0.5 min. Además, la respuesta es reversible y el dispositivo se puede emplear durante 1h en continuo sin observar disminución de la señal debida a la fotodescomposición. En cambio, la reproducibilidad es limitada, ya que para una misma membrana, la sensibilidad disminuye durante calibrados sucesivos. El estudio de las interferencias iónicas revela que los iones evaluados no son interferentes, excepto el Cd^{2+} , el cual genera una respuesta en la membrana de plomo de la misma magnitud que la generada por el ion principal. Sin embargo, esto no representa ningún problema en su aplicación, debido a la baja concentración de este ion en las muestras analizadas. Así, su buen funcionamiento y adecuadas características han permitido su aplicación a medidas de plomo en extractos de suelos contaminados, empleando el método de la adición estándar. Al comparar los resultados obtenidos con un método de referencia (ICP-OES), no se han observado diferencias significativas.



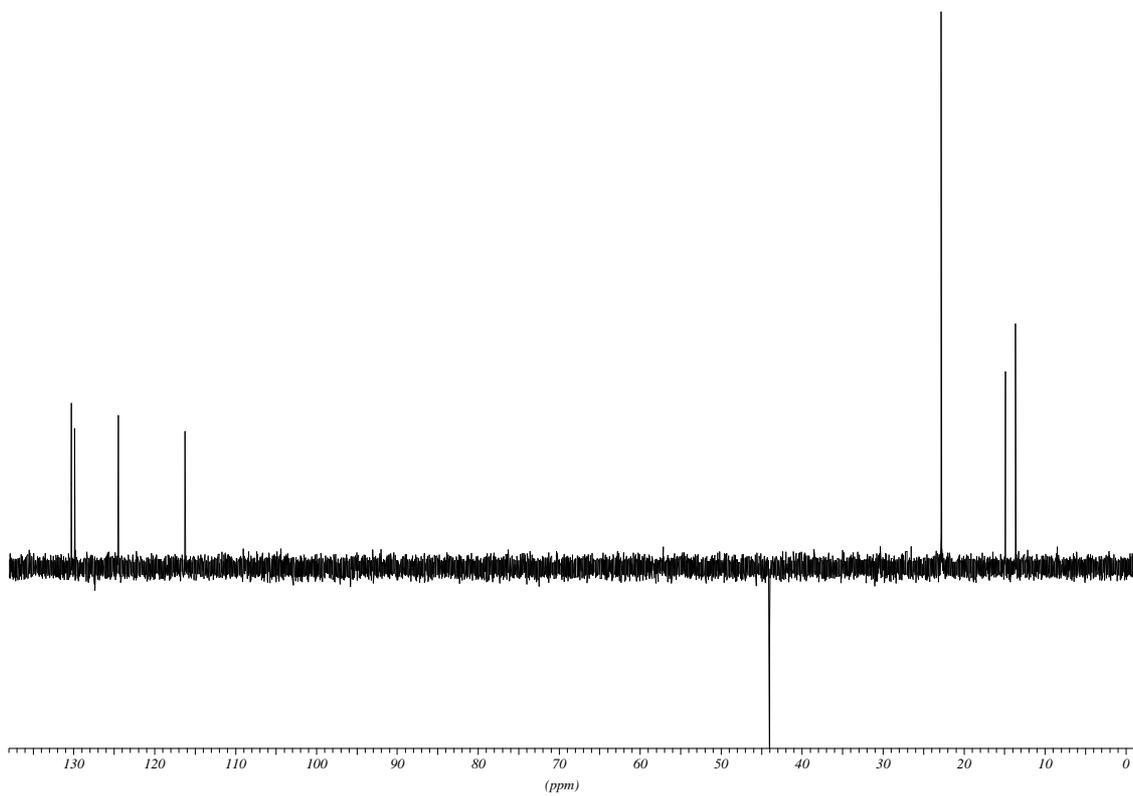
ANEXO: ESPECTROS DE RMN DE LAS MOLÉCULAS SINTETIZADAS



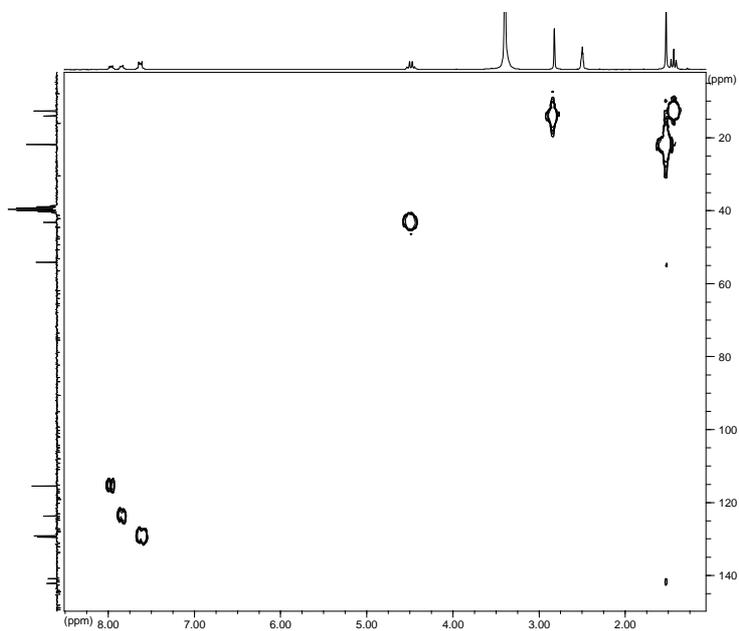
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6) de **p1**



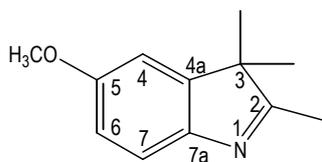
$^{13}\text{C-RMN}$ (62.5 MHz, DMSO-d_6) de **p1**



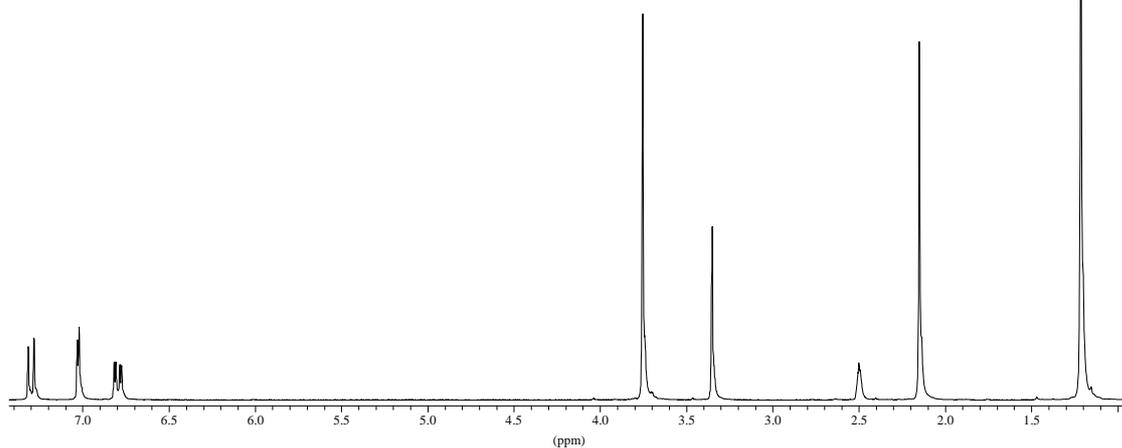
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p1



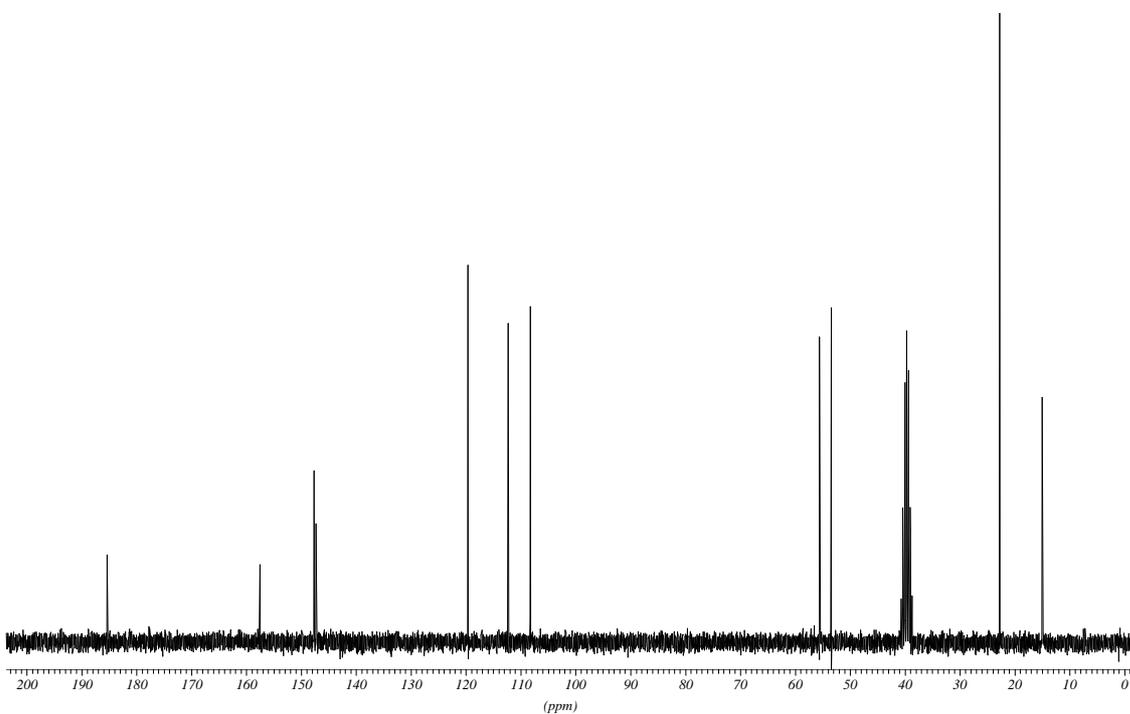
Correlación ¹H/¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) de p1



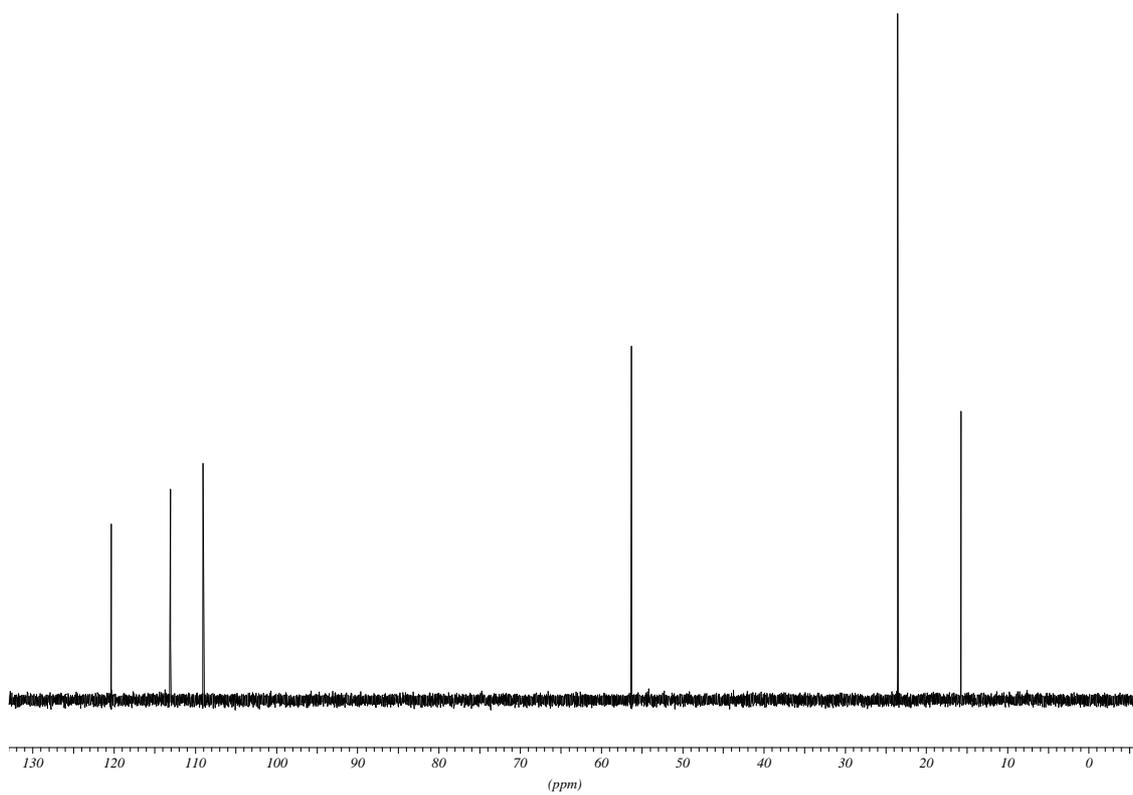
p2



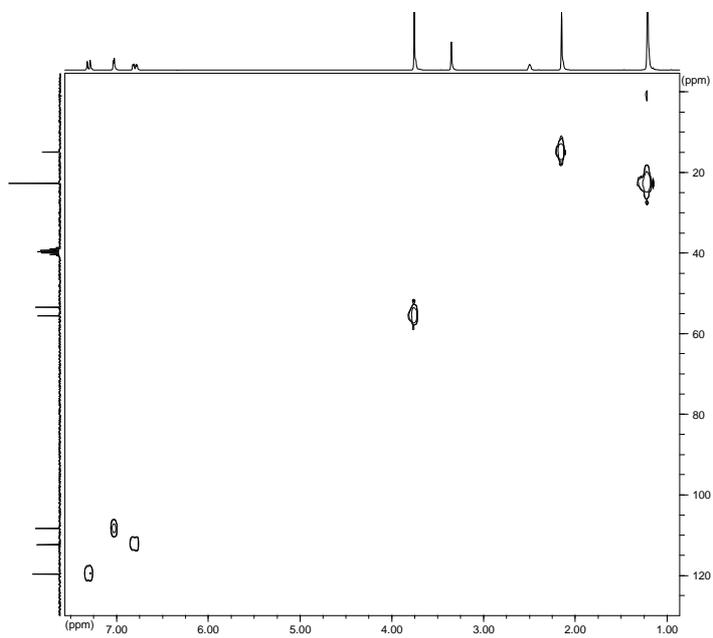
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de p2



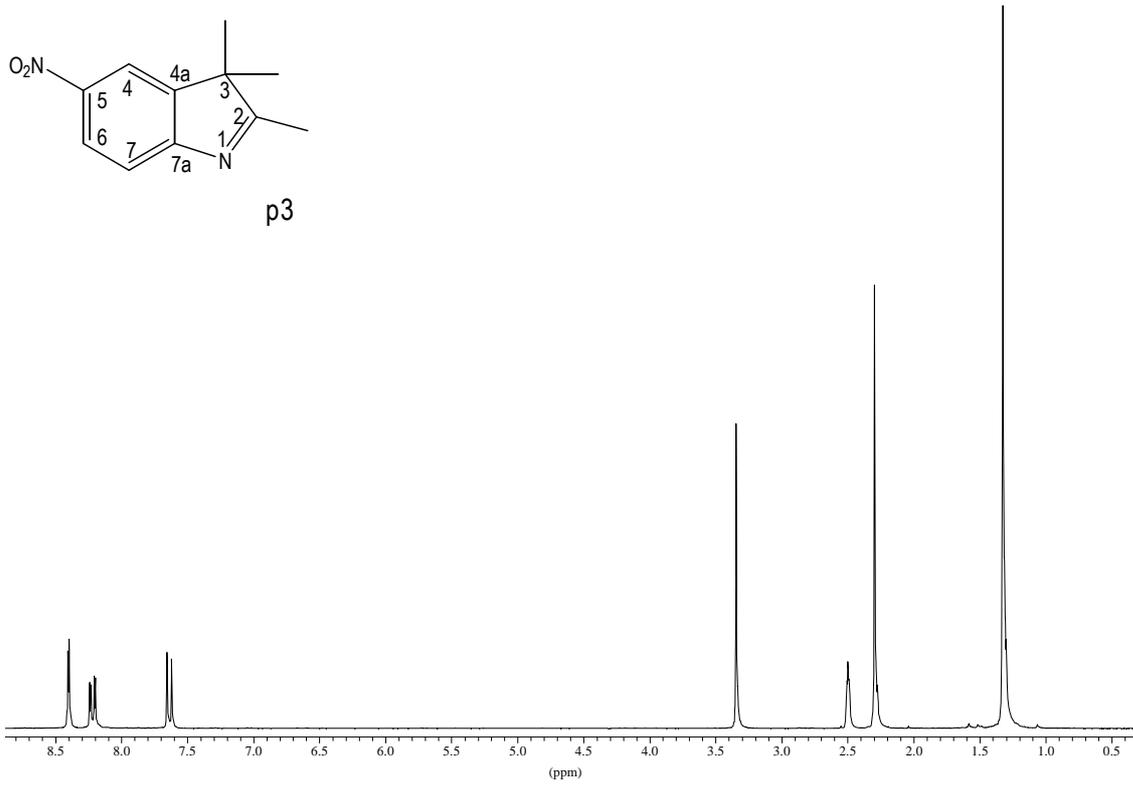
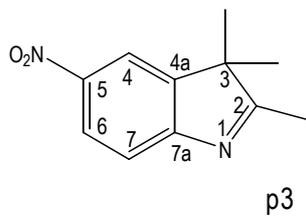
¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p2



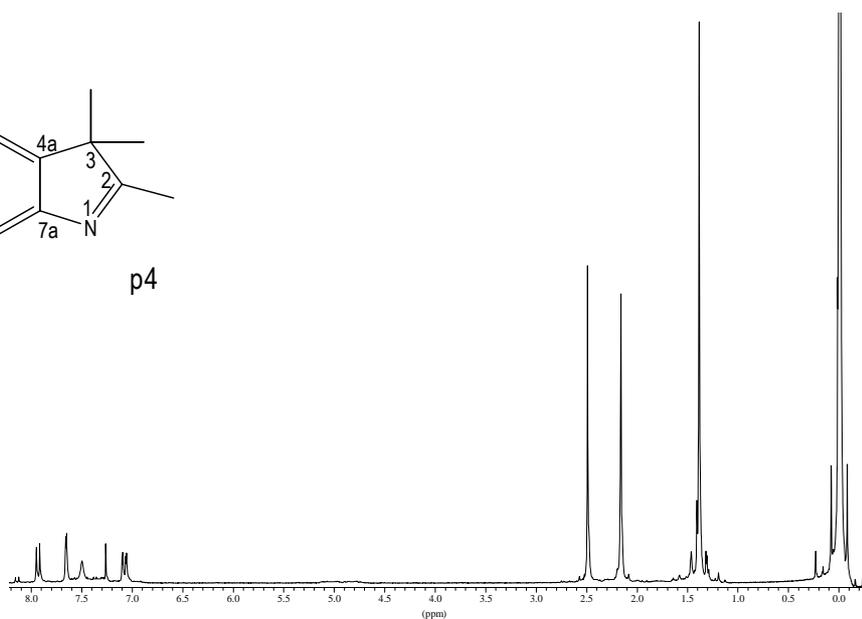
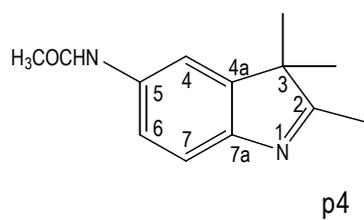
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de **p2**



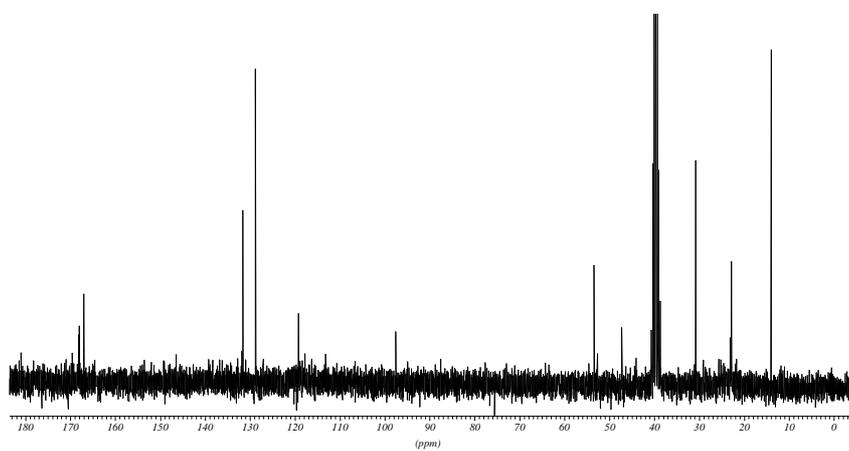
Correlación ¹H/¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) de **p2**



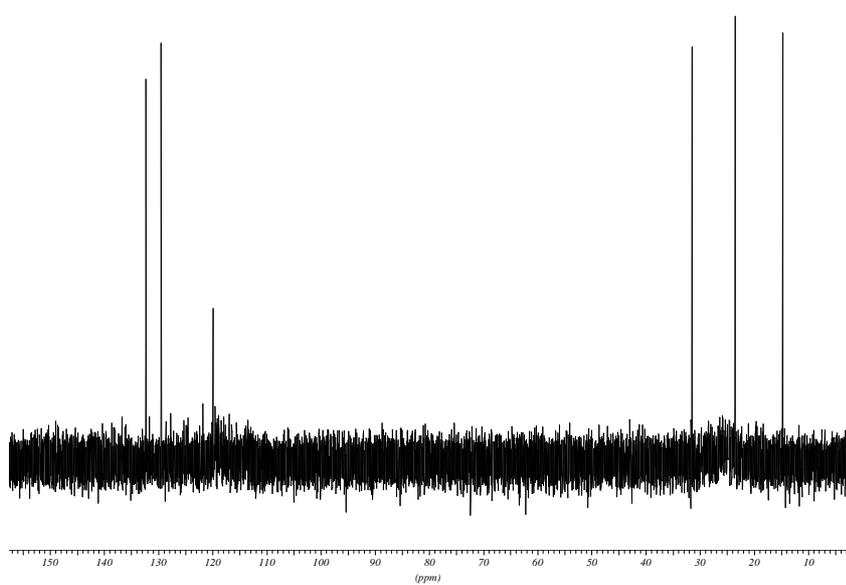
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de p3



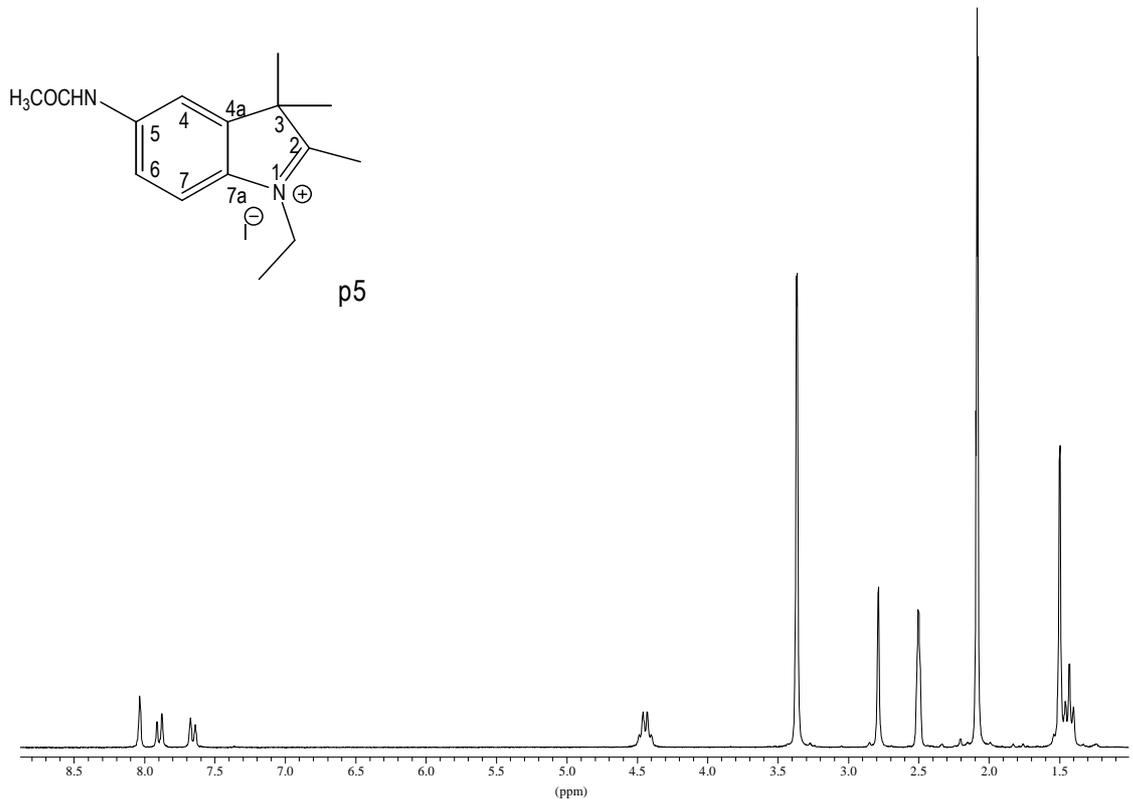
¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) de p4



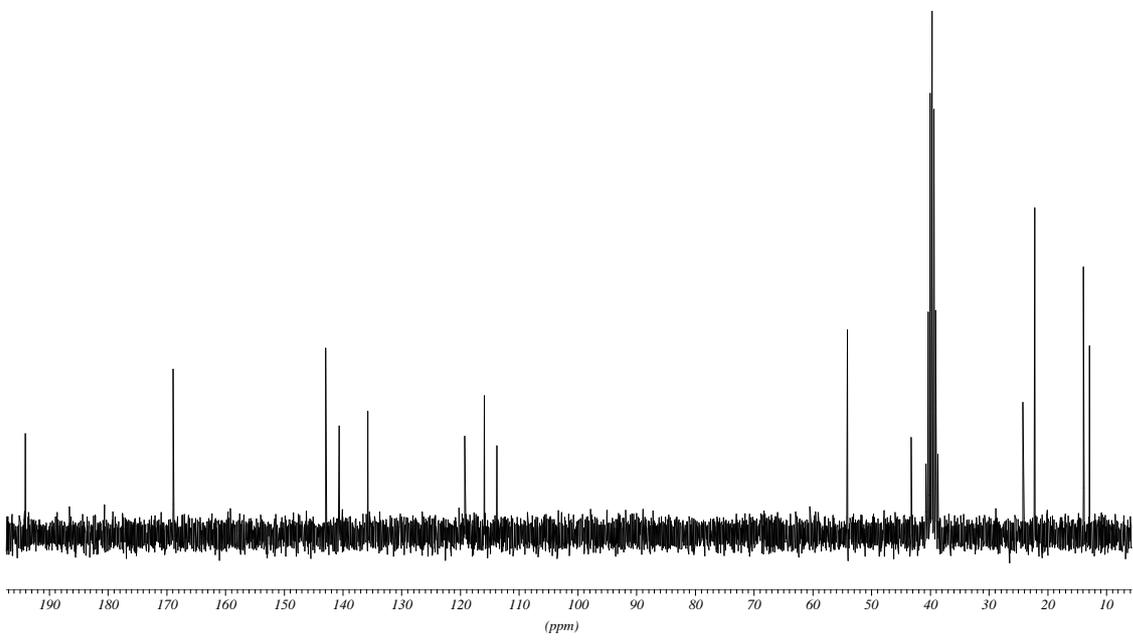
¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p4



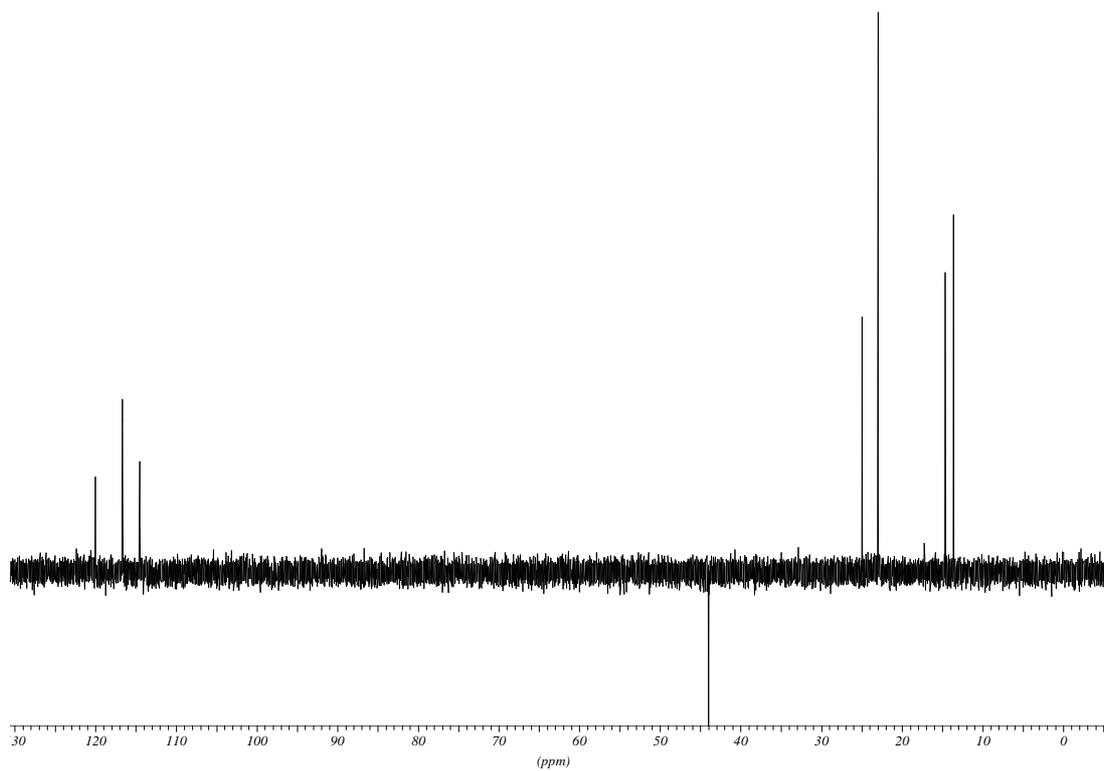
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p4



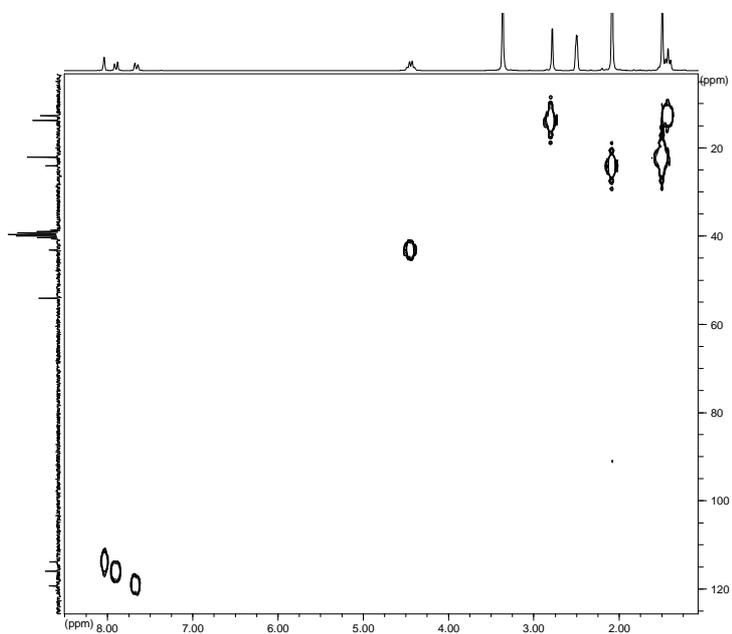
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d₆) de **p5**



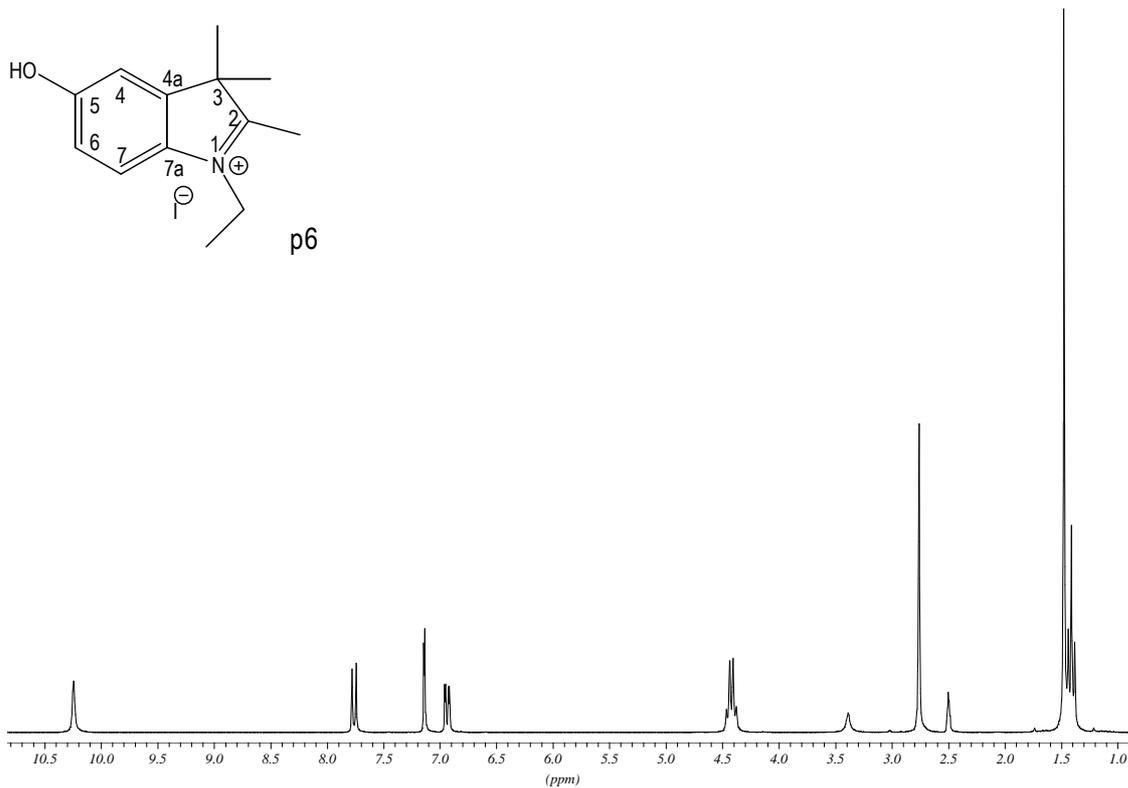
$^{13}\text{C-RMN}$ (62.5 MHz, DMSO-d₆) de **p5**



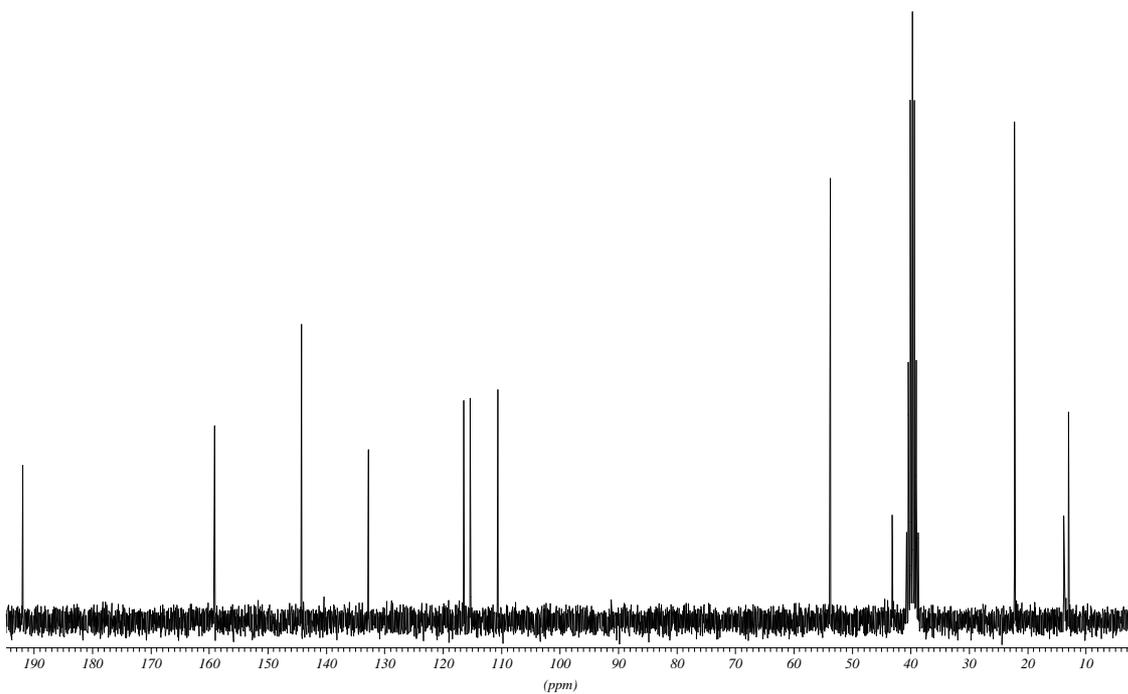
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p5



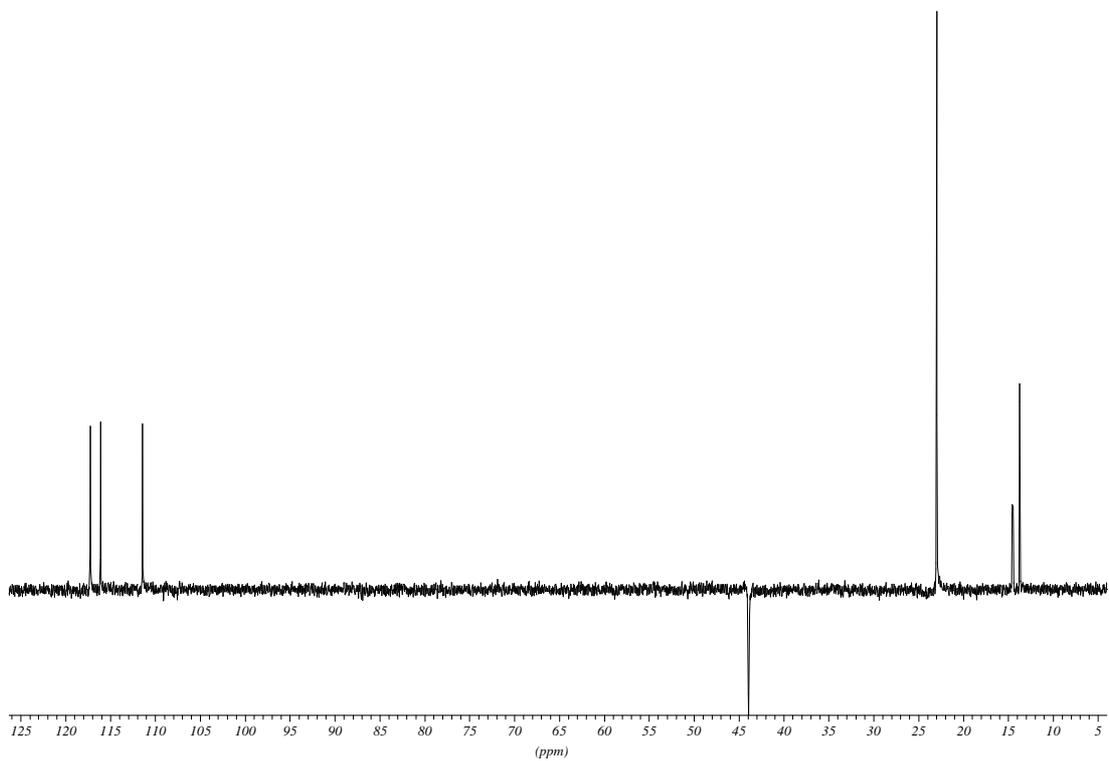
Correlación ¹H/¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) de p5



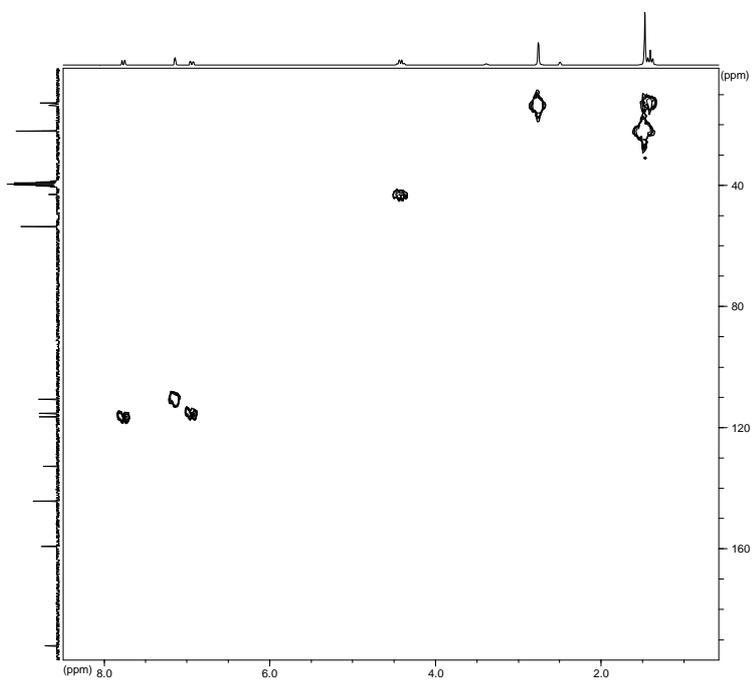
$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, DMSO-d_6) de **p6**



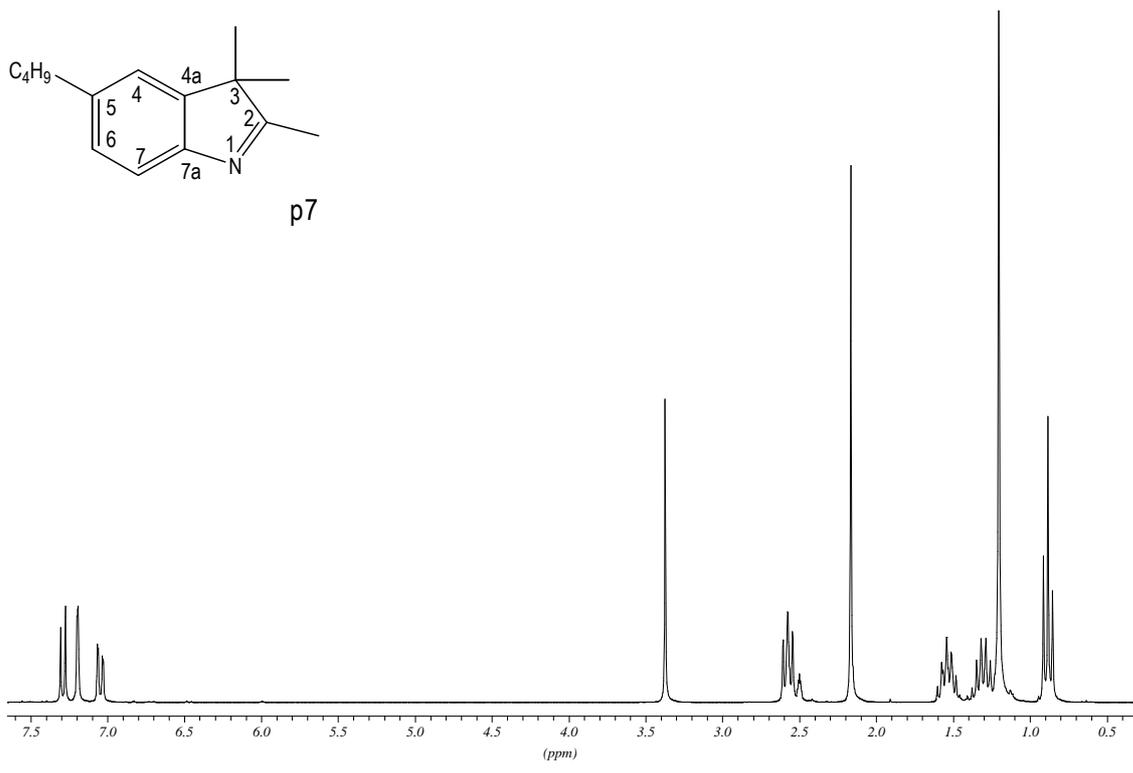
$^{13}\text{C-NMR}$ (62.5 MHz, DMSO-d_6) de **p6**



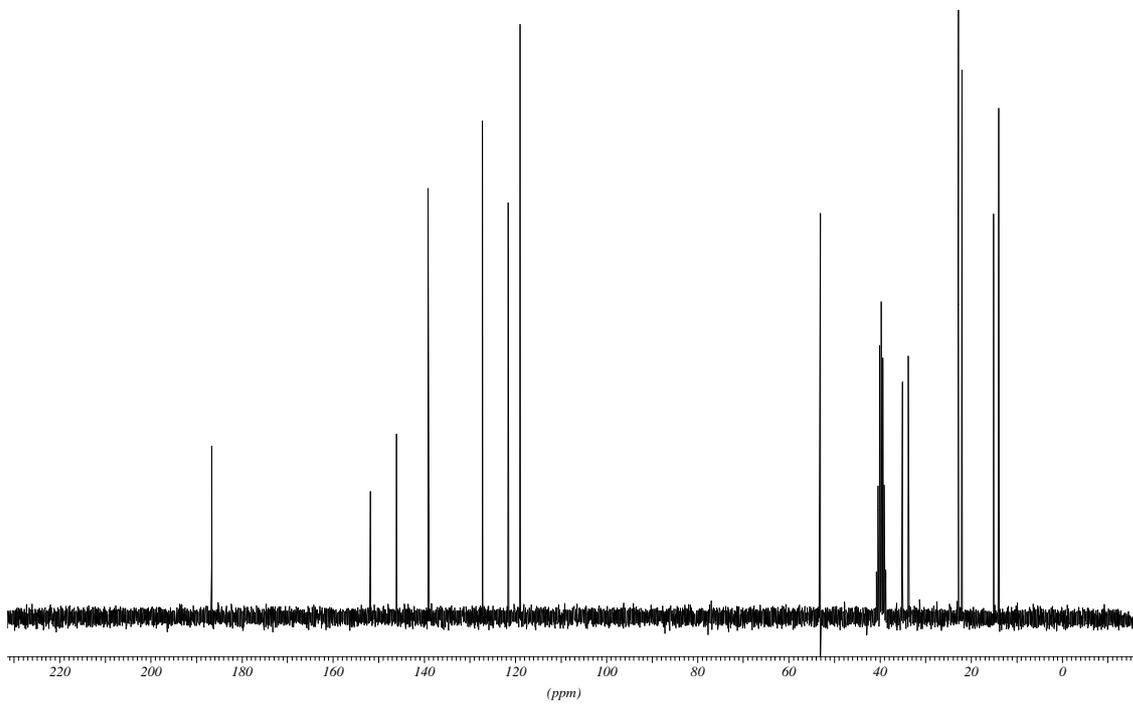
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p6



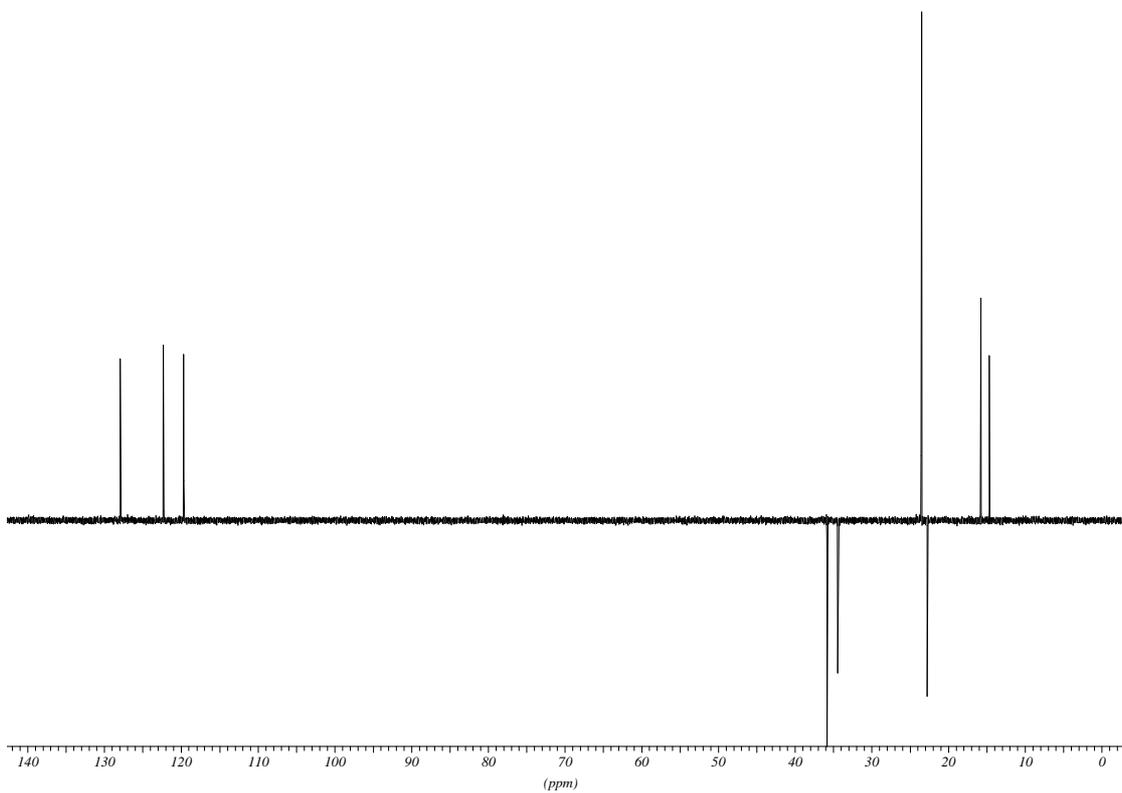
Correlación ¹H/¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) de p6



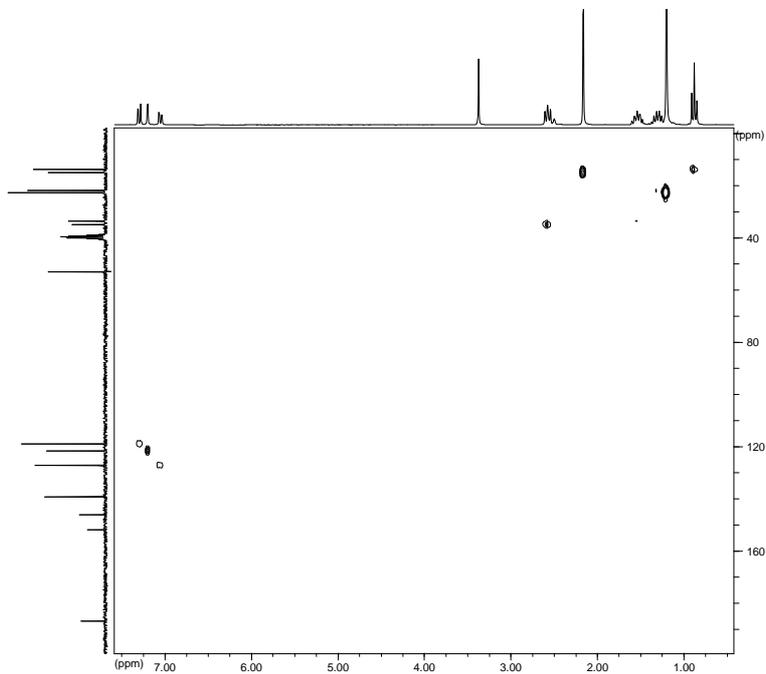
1H -RMN (250 MHz, DMSO- d_6) de p7



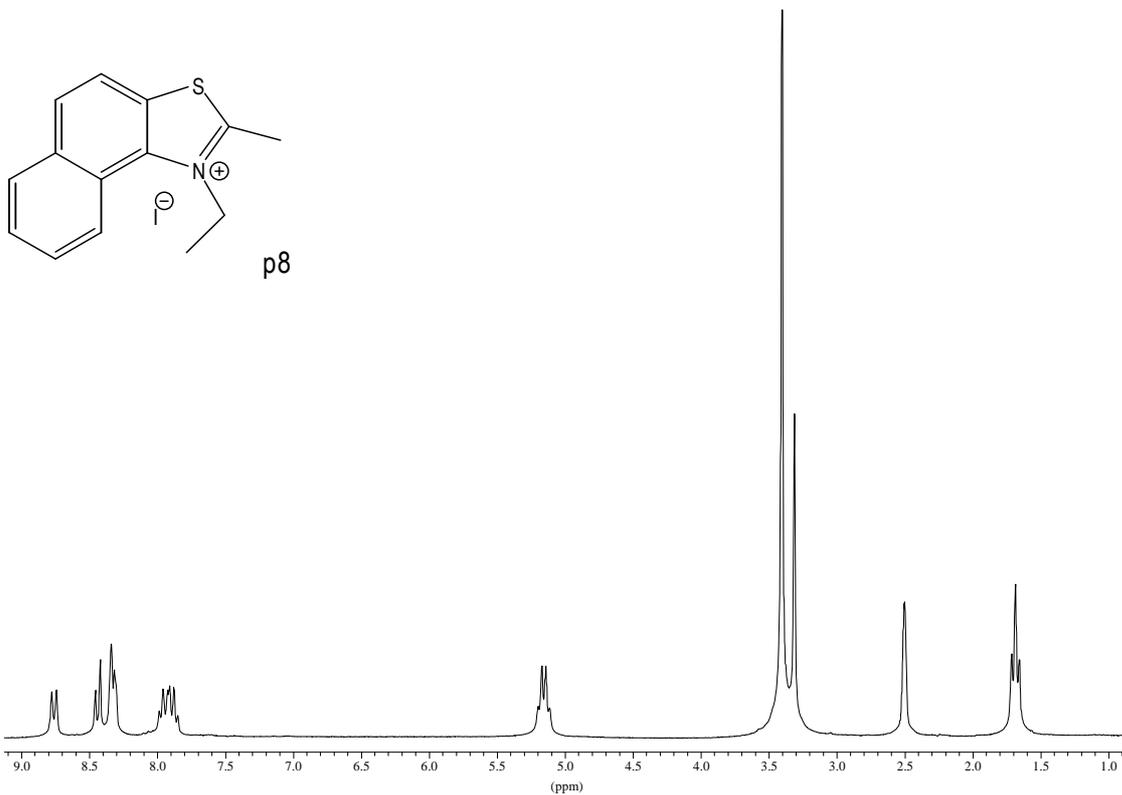
^{13}C -RMN (62.5 MHz, DMSO- d_6) de p7



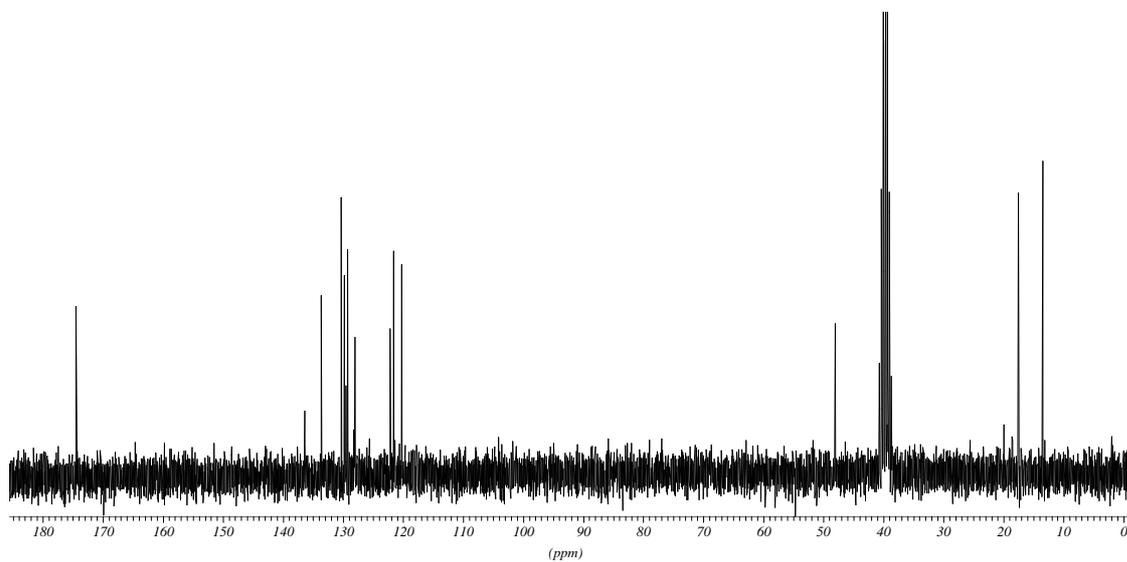
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p7



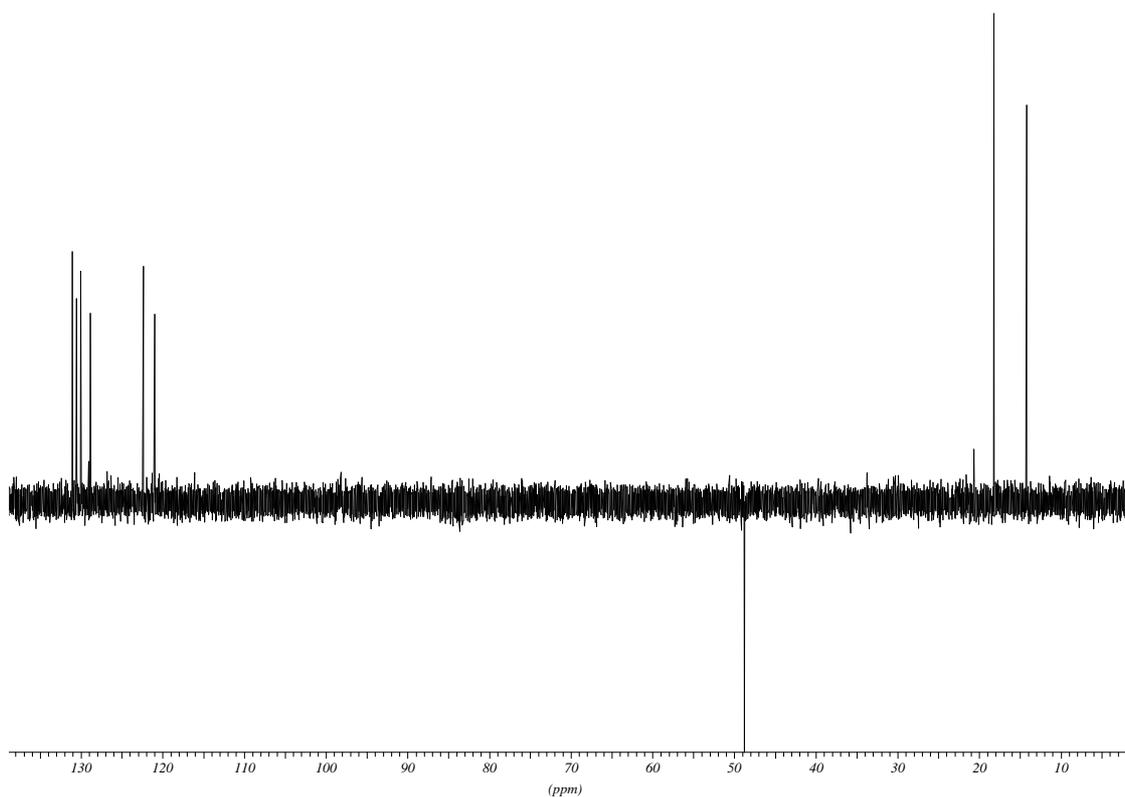
Correlación ¹H/¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) de p7



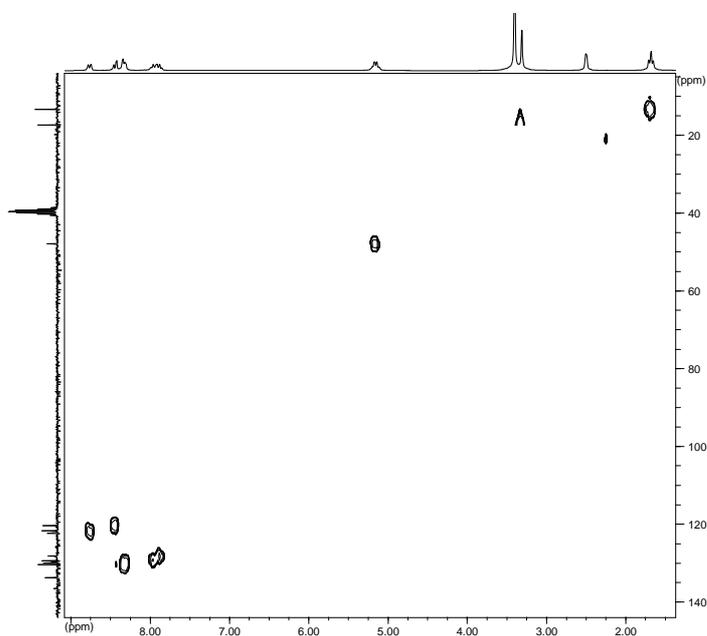
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO- d_6) de **p8**



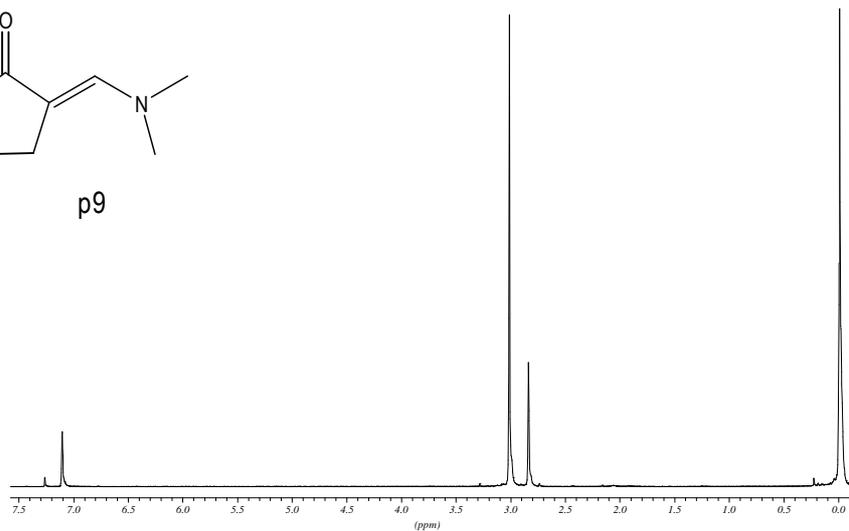
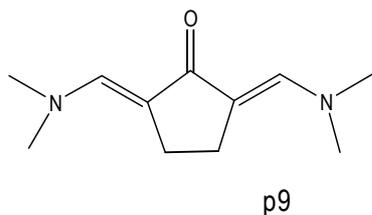
$^{13}\text{C-RMN}$ (62.5 MHz, DMSO- d_6) de **p8**



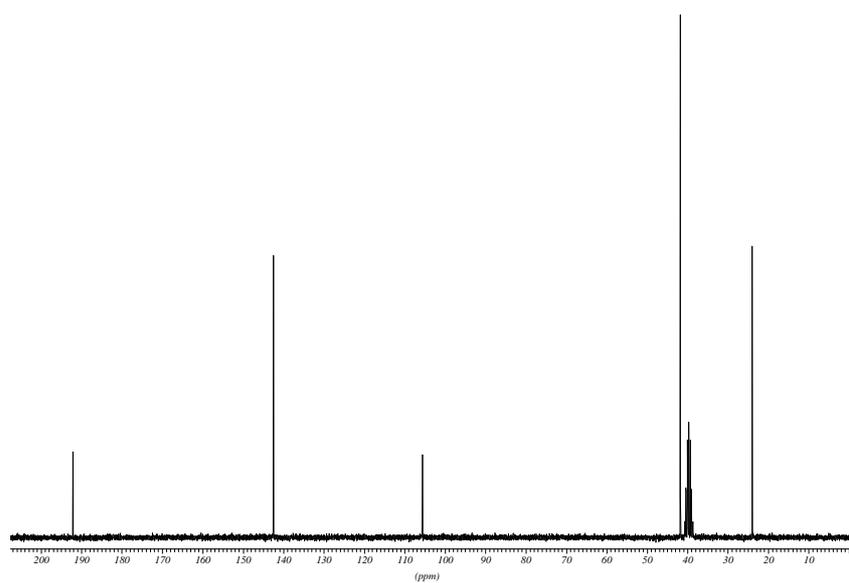
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de **p8**



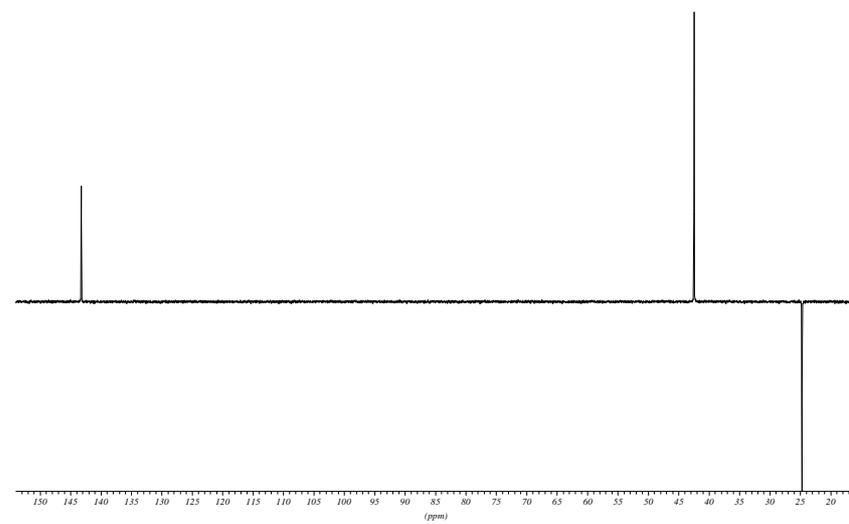
Correlación ¹H/¹³C (250 MHz, DMSO-d₆) de **p8**



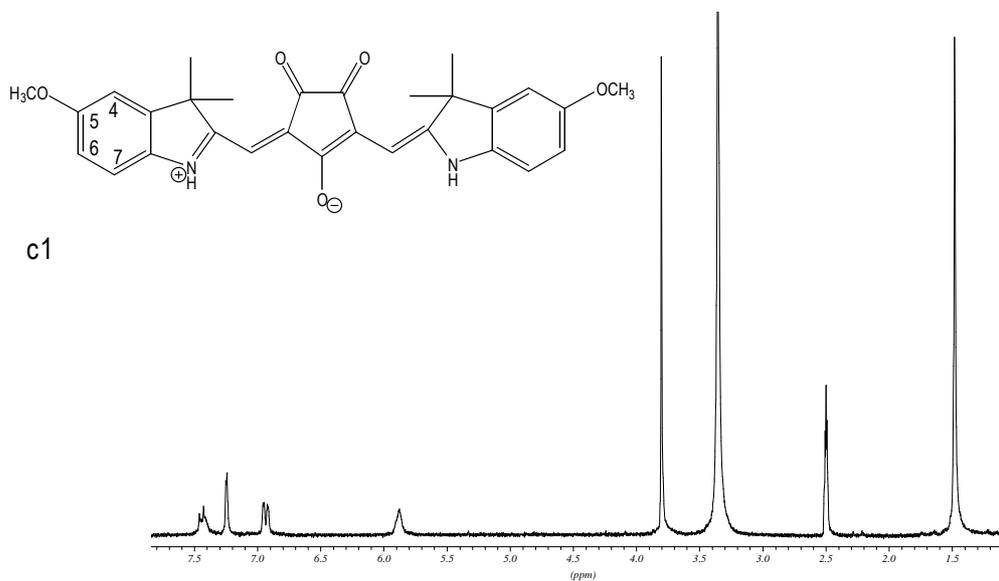
¹H-RMN (250 MHz, CDCl₃) de p9



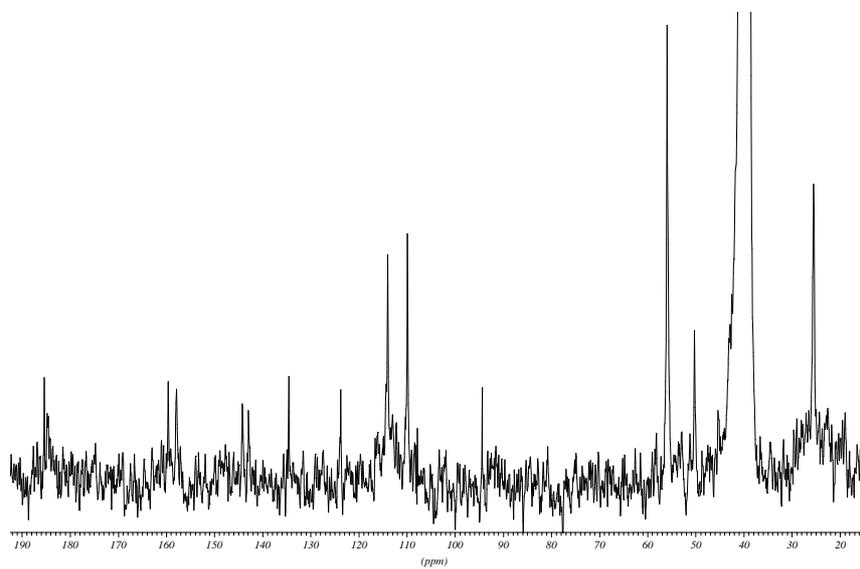
¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p9



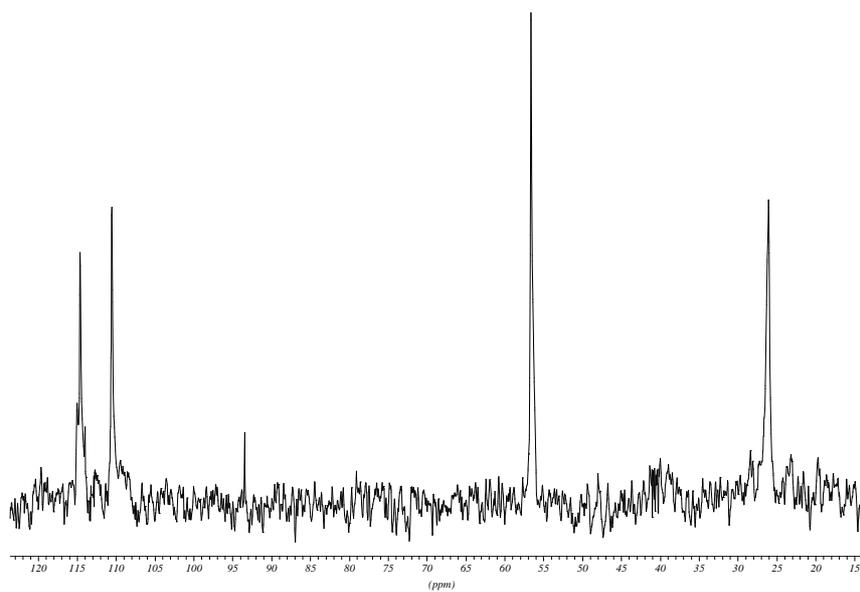
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de p9



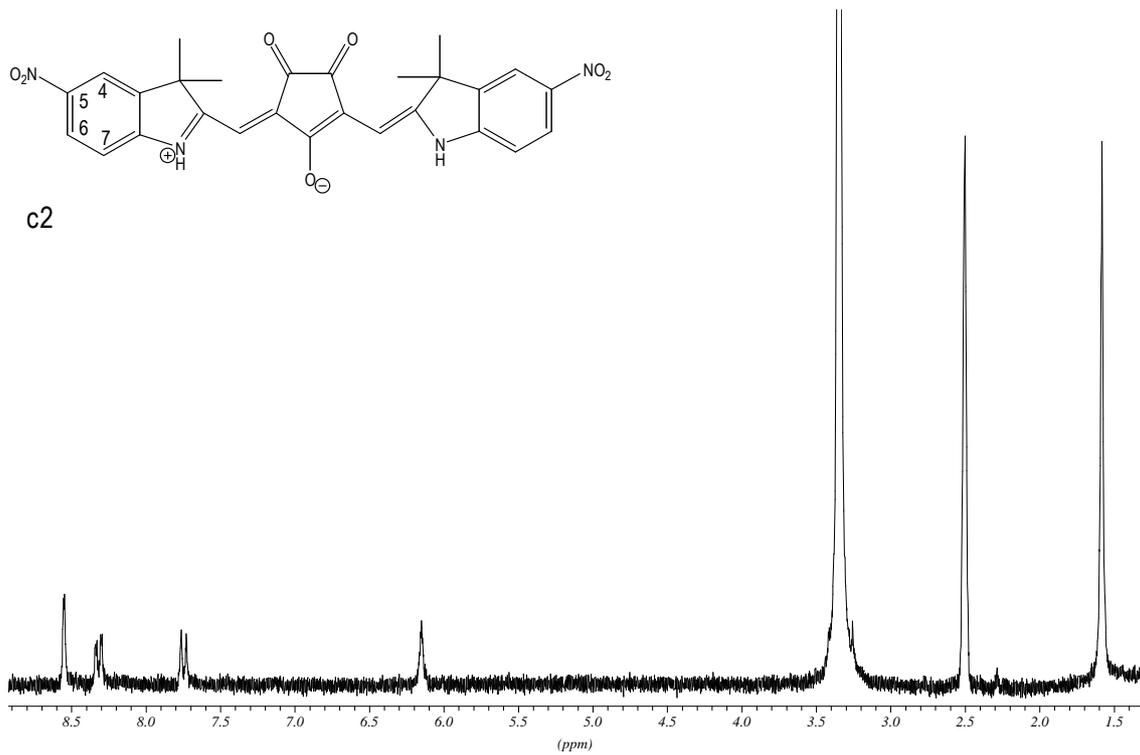
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de c1



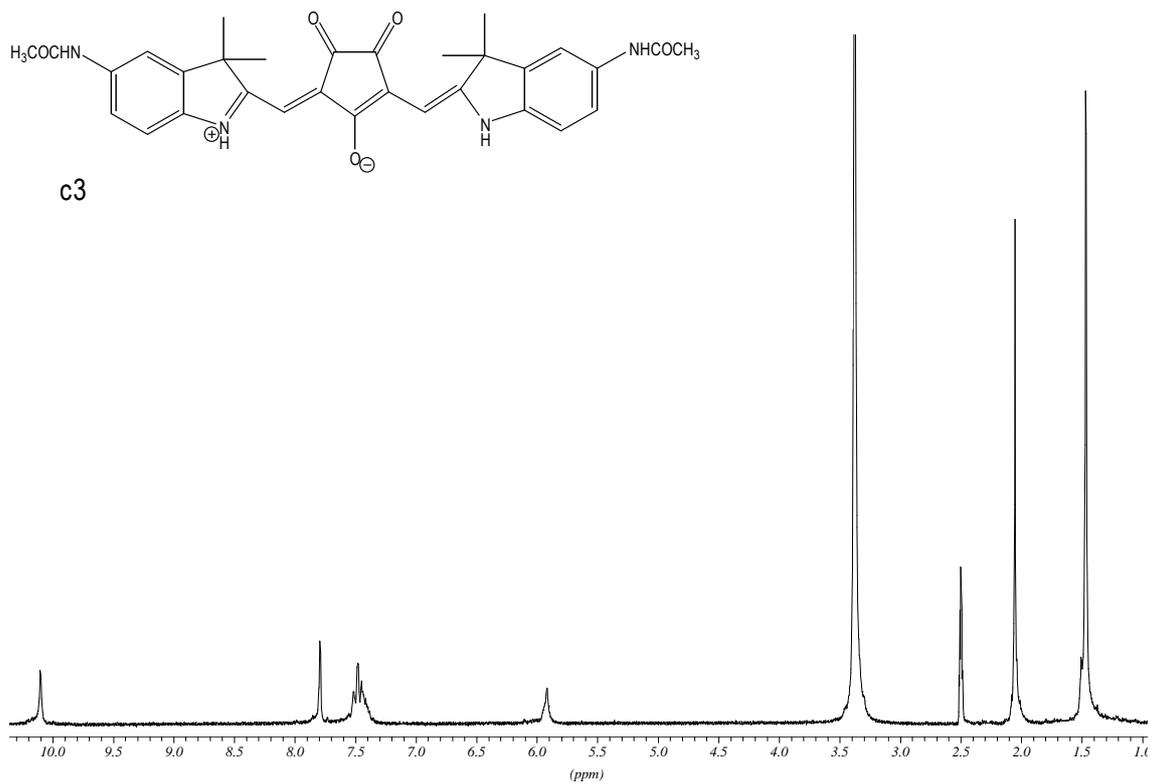
¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆) de c1



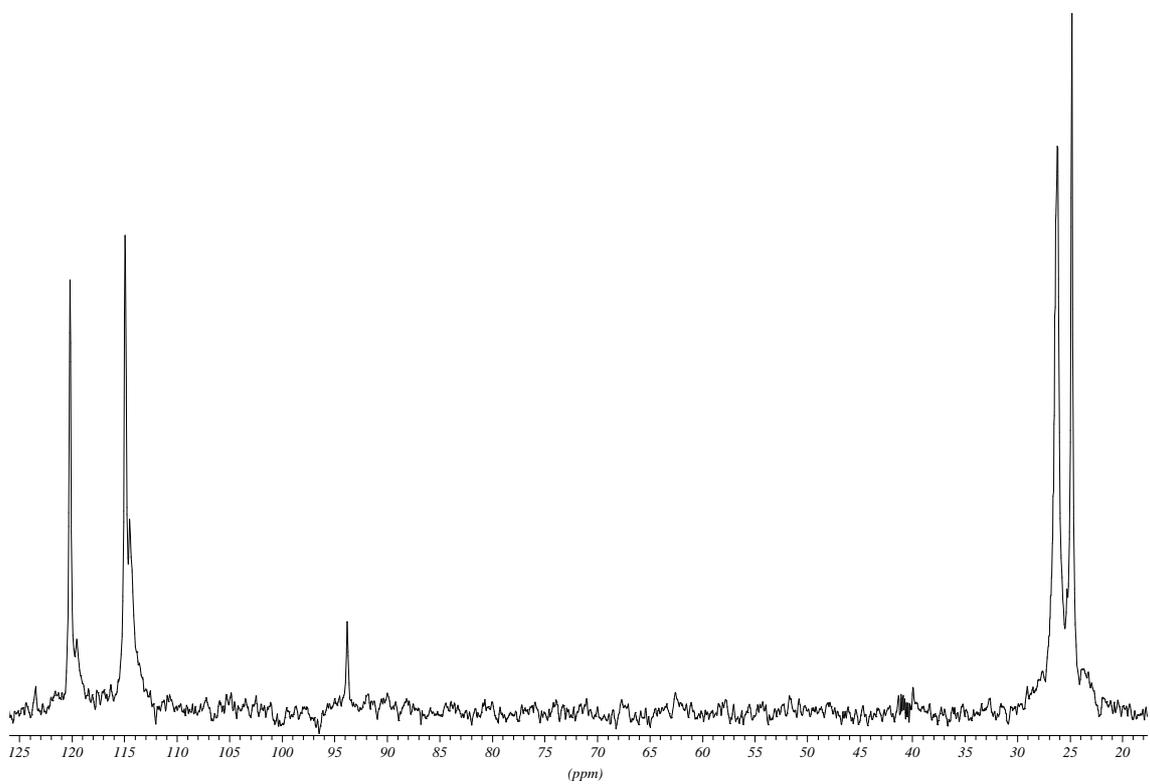
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de c1



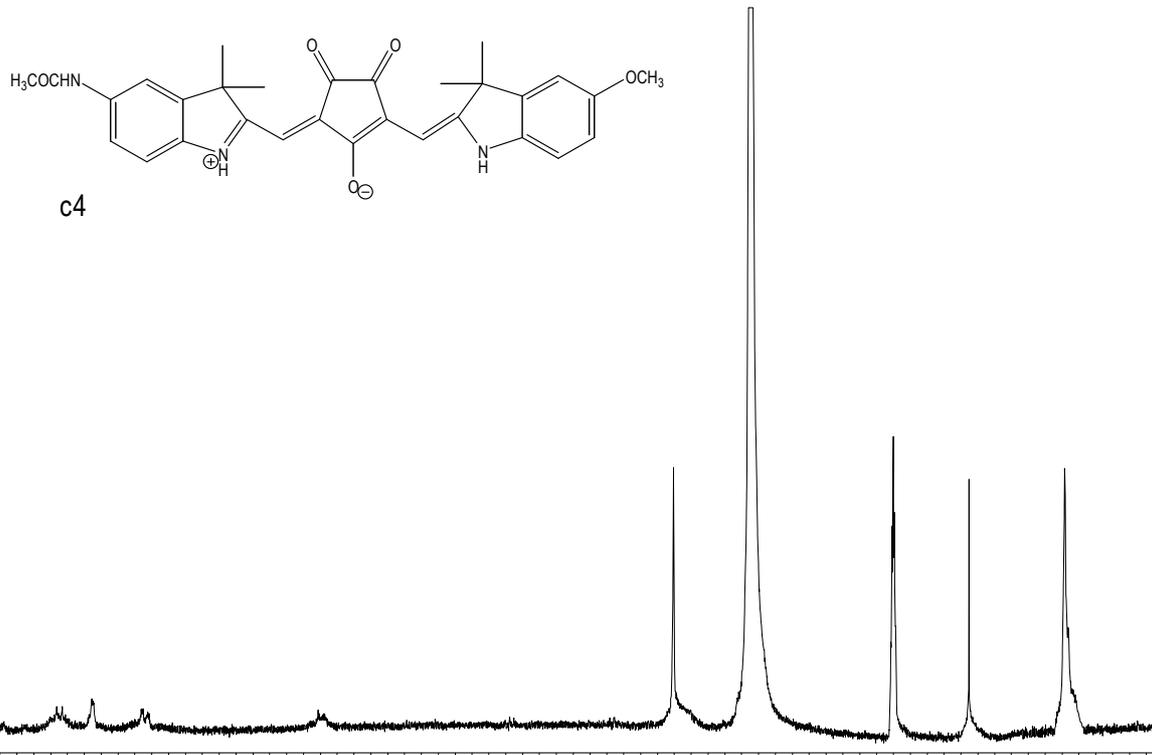
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de **c2**



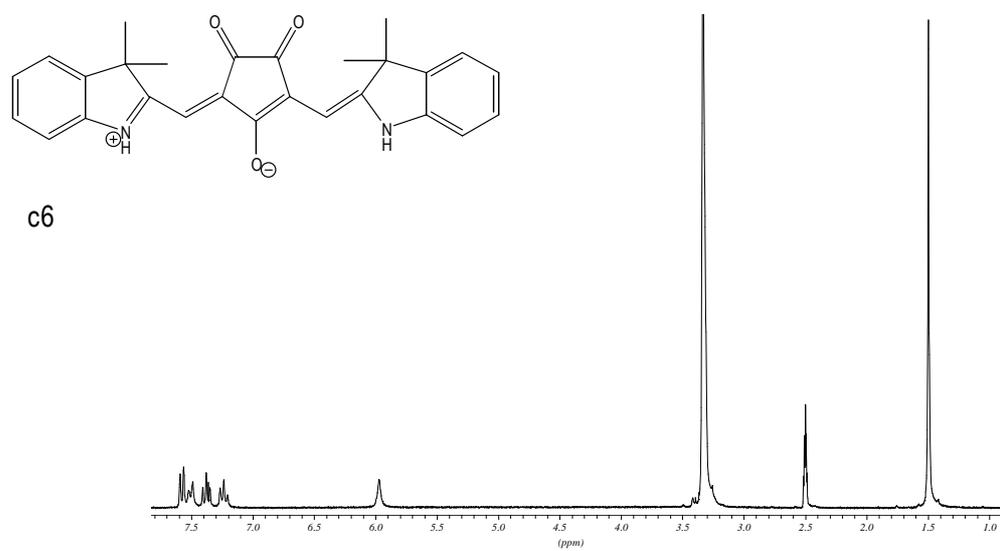
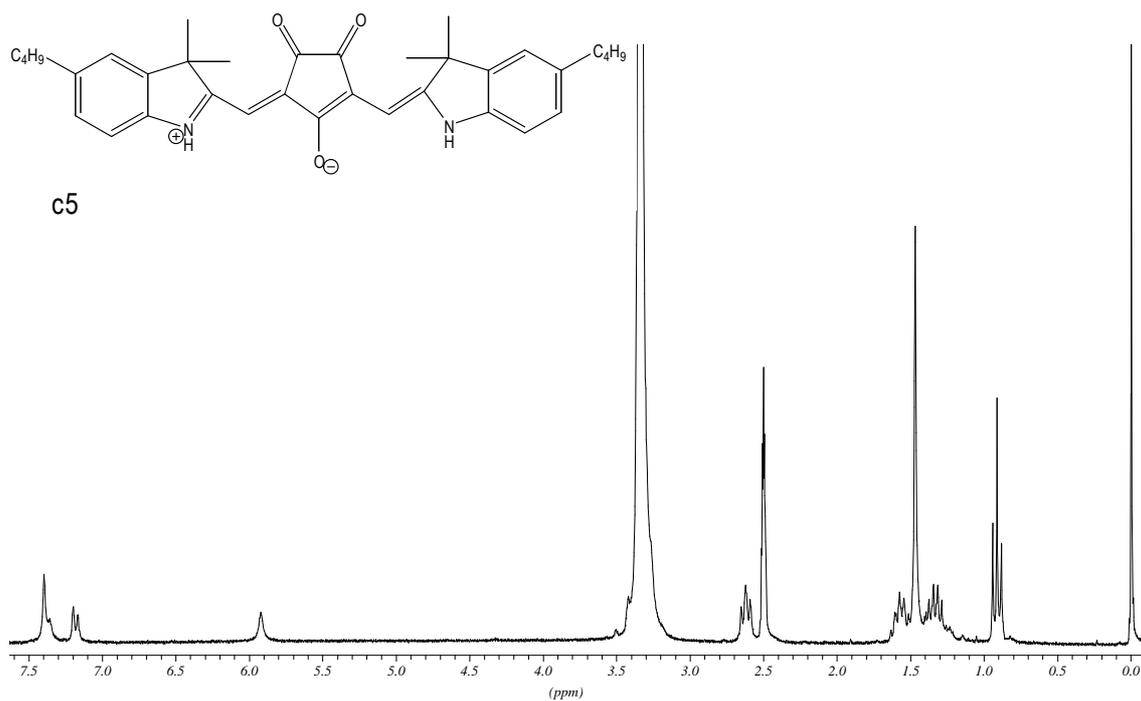
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de c3

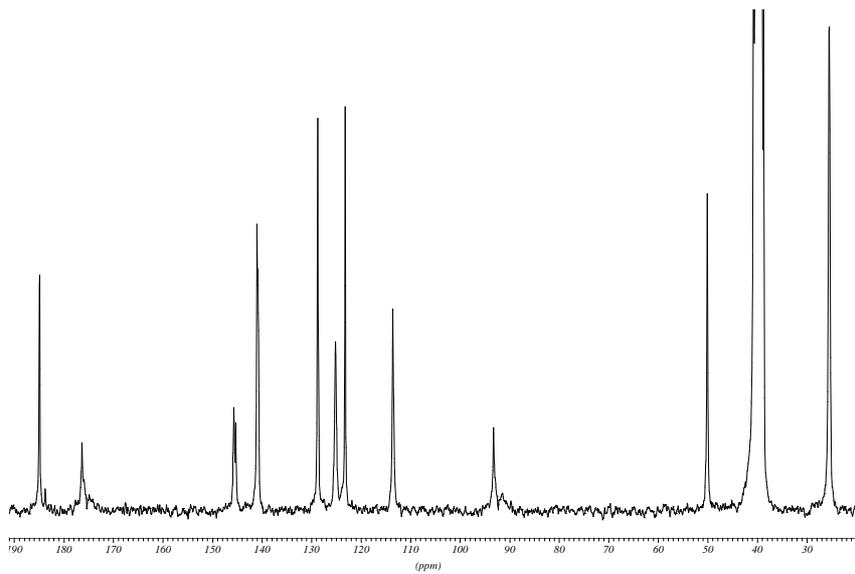


DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de c3

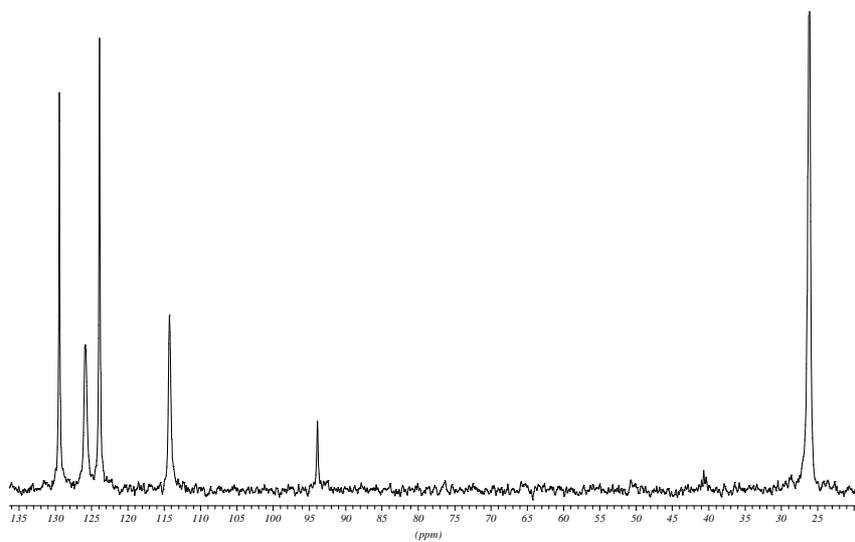


¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de c4

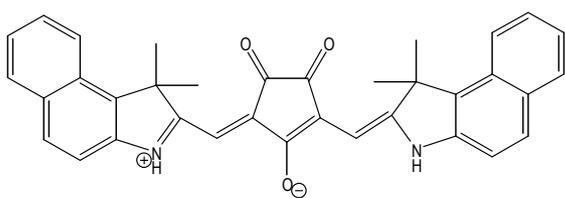




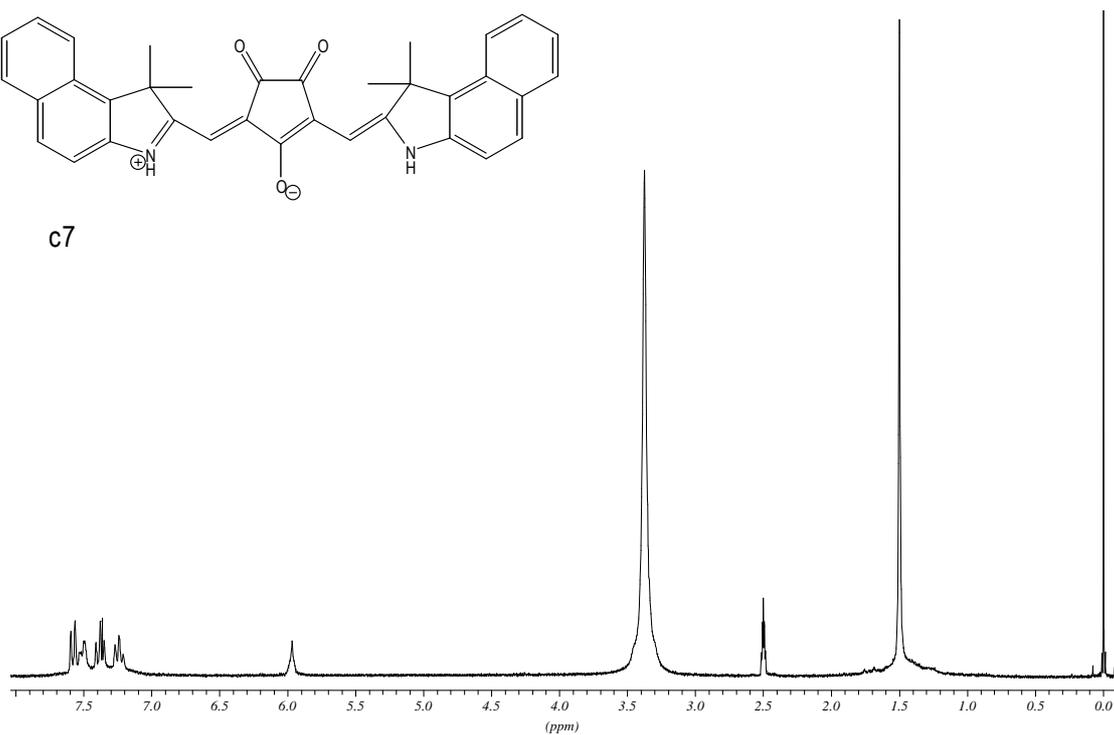
¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆) de c6



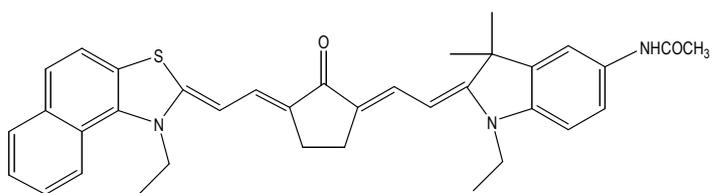
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de c6



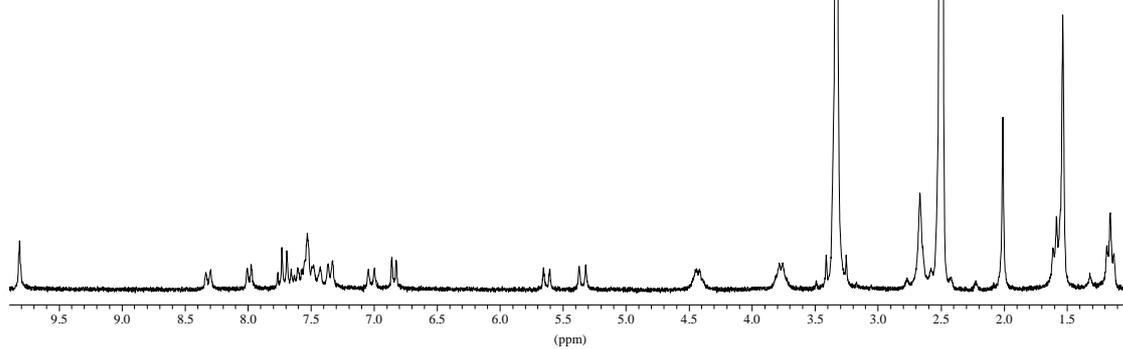
c7



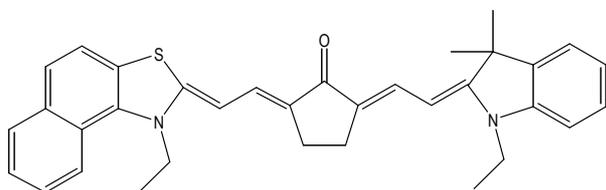
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de c7



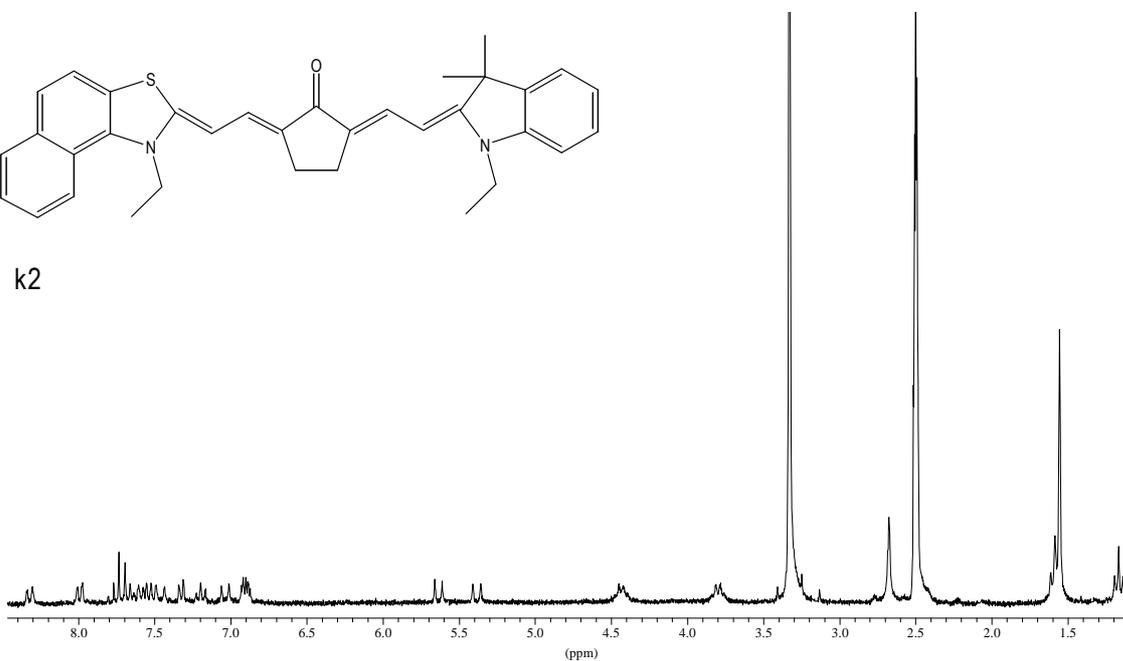
k1



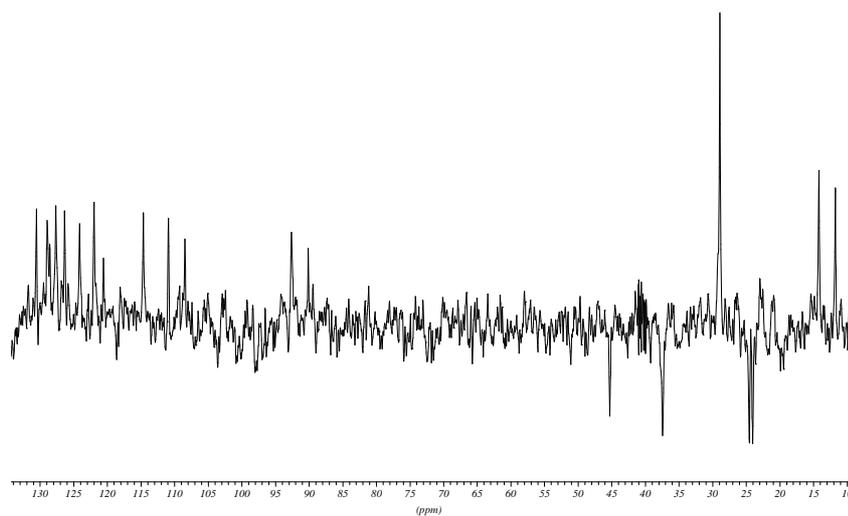
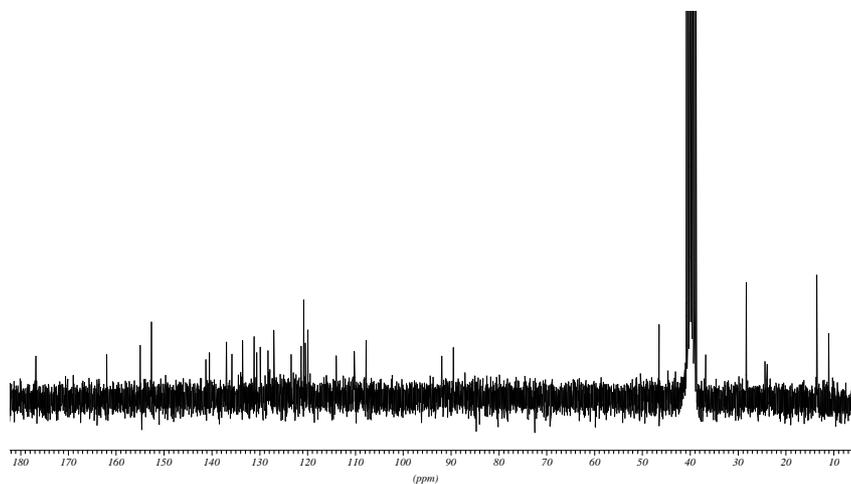
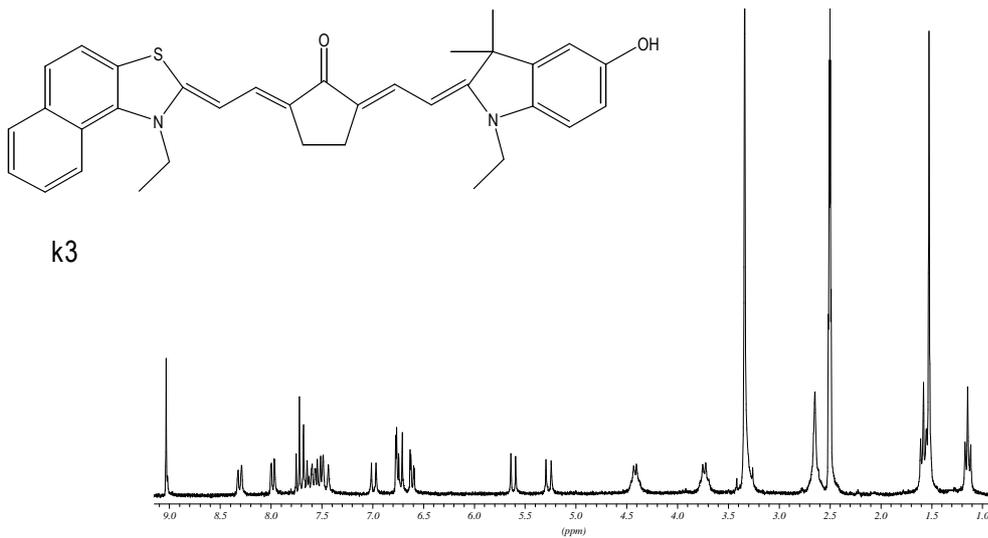
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de k1

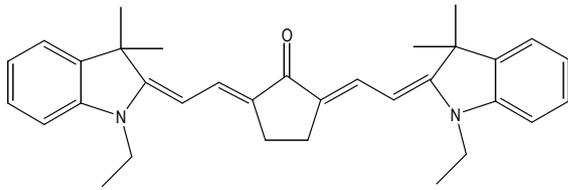


k2

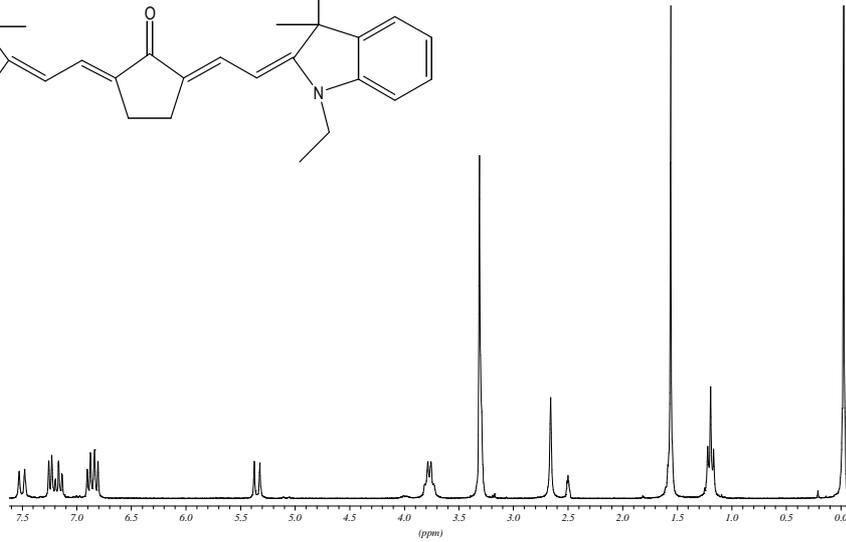


¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de k2

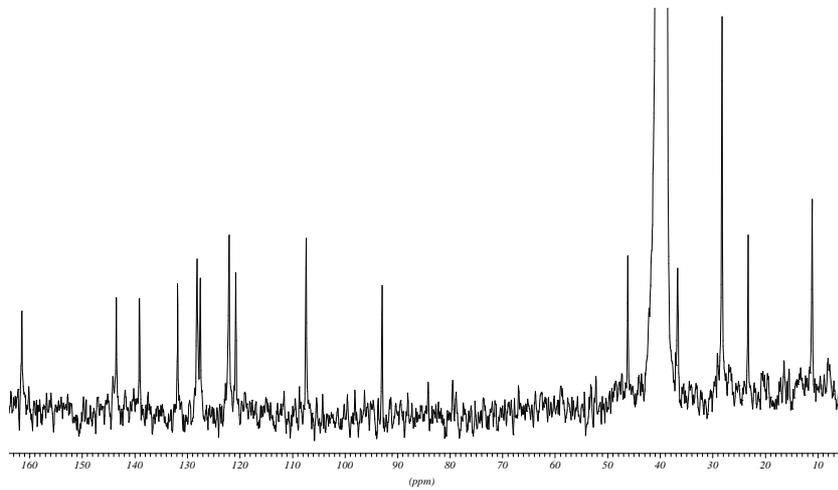




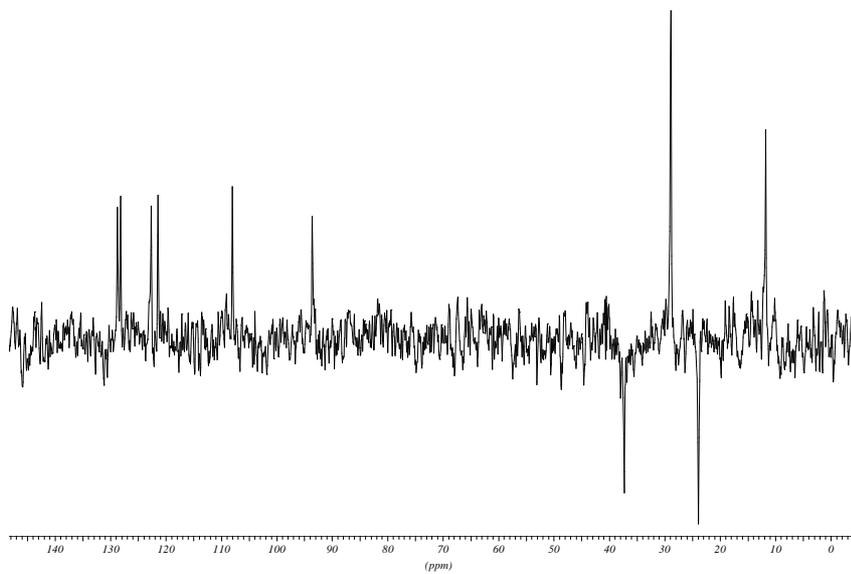
k4



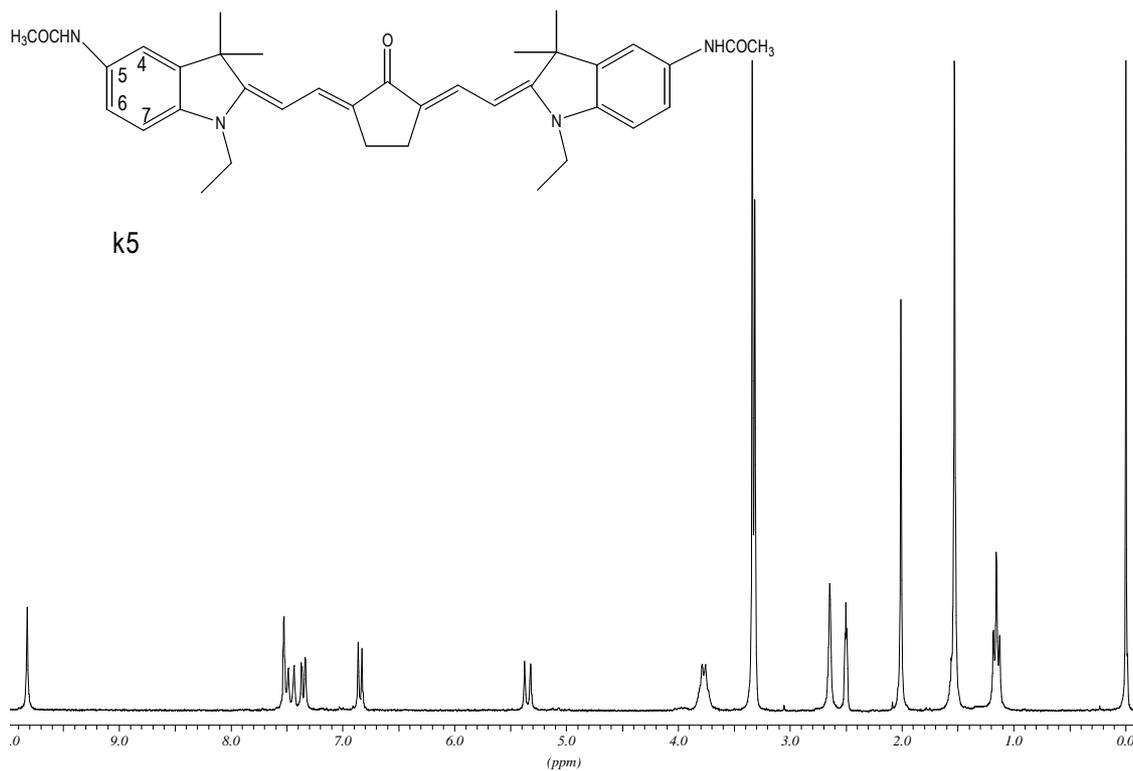
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de k4



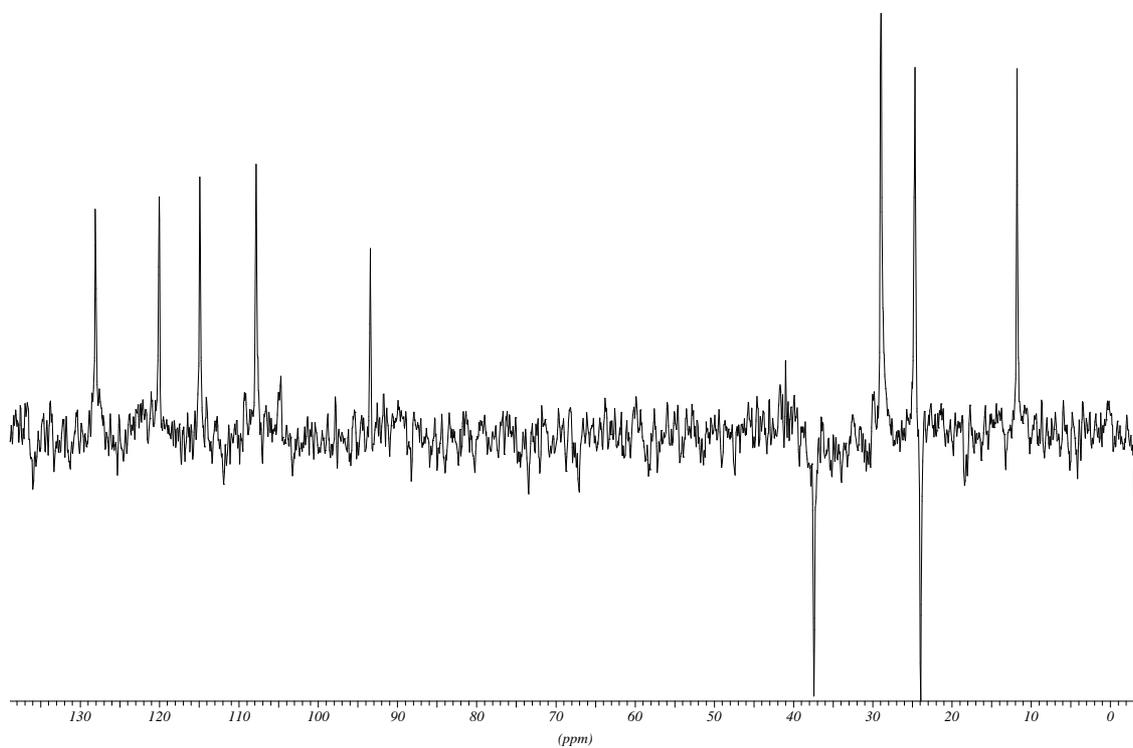
¹³C-RMN (62.5 MHz, DMSO-d₆) de k4



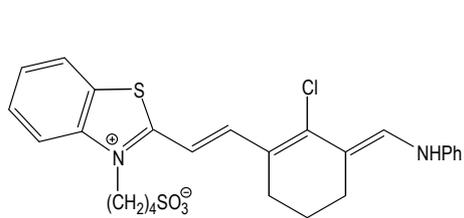
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de k4



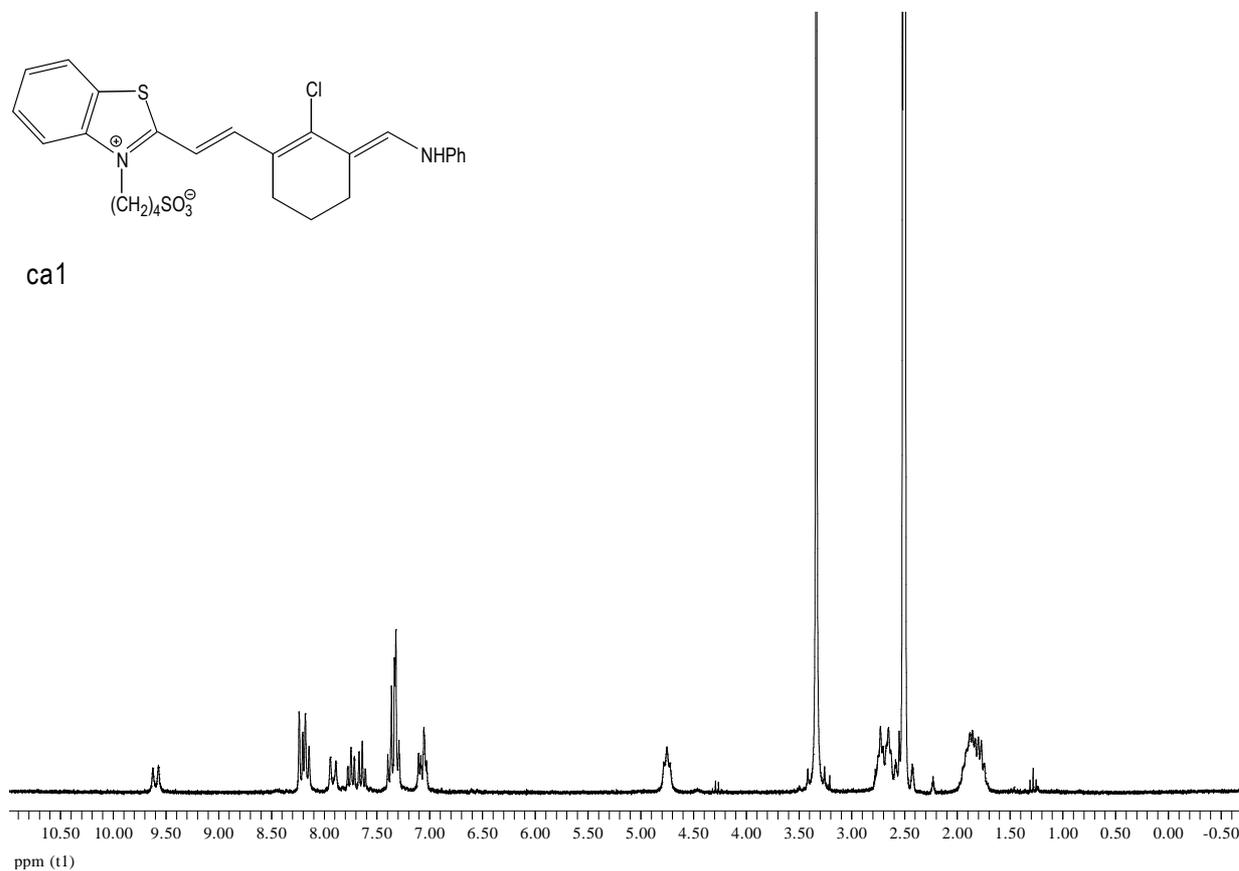
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de k5



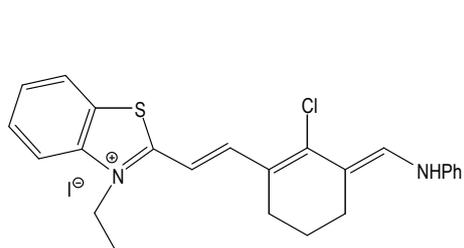
DEPT (62.5 MHz, DMSO-d₆) de k5



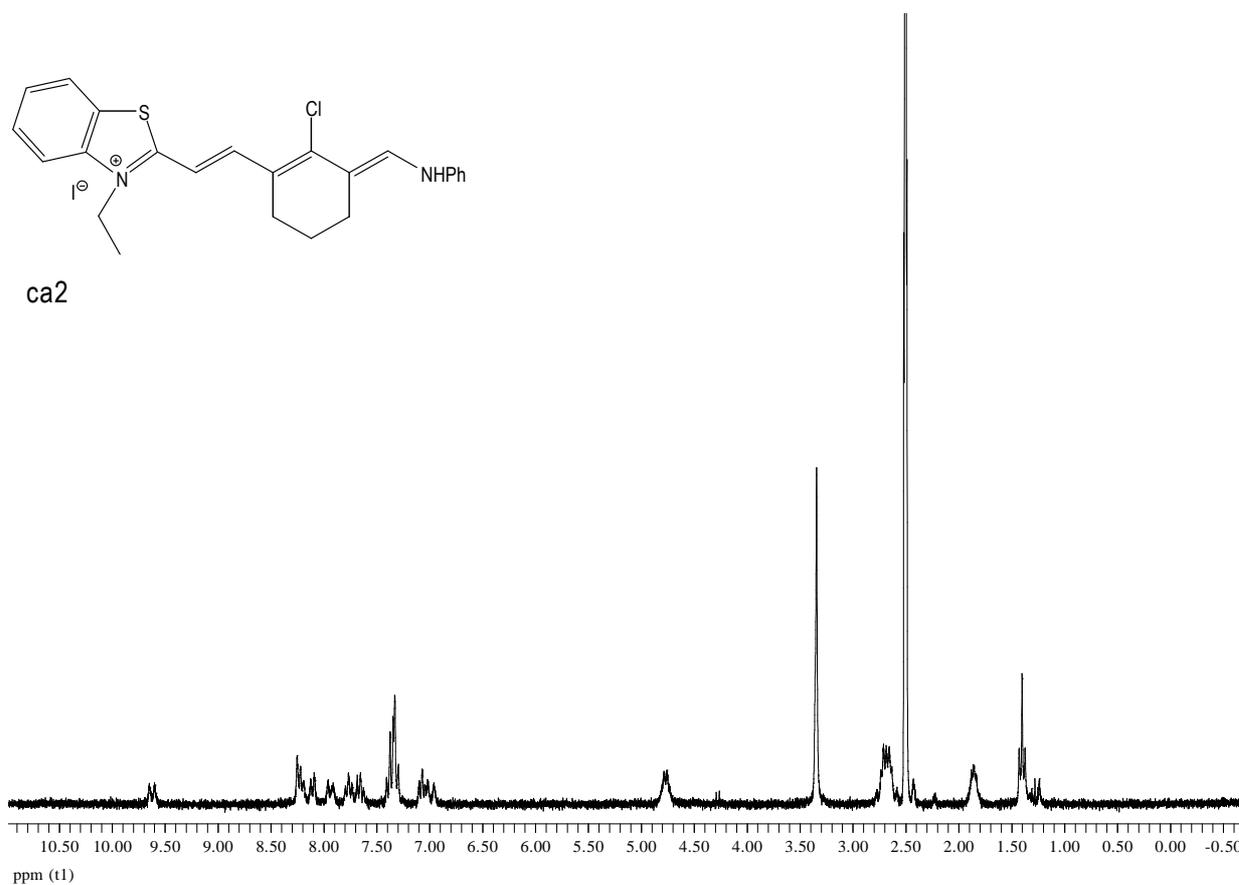
ca1



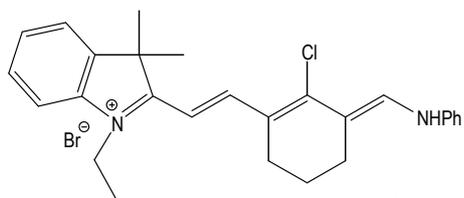
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6) de ca1



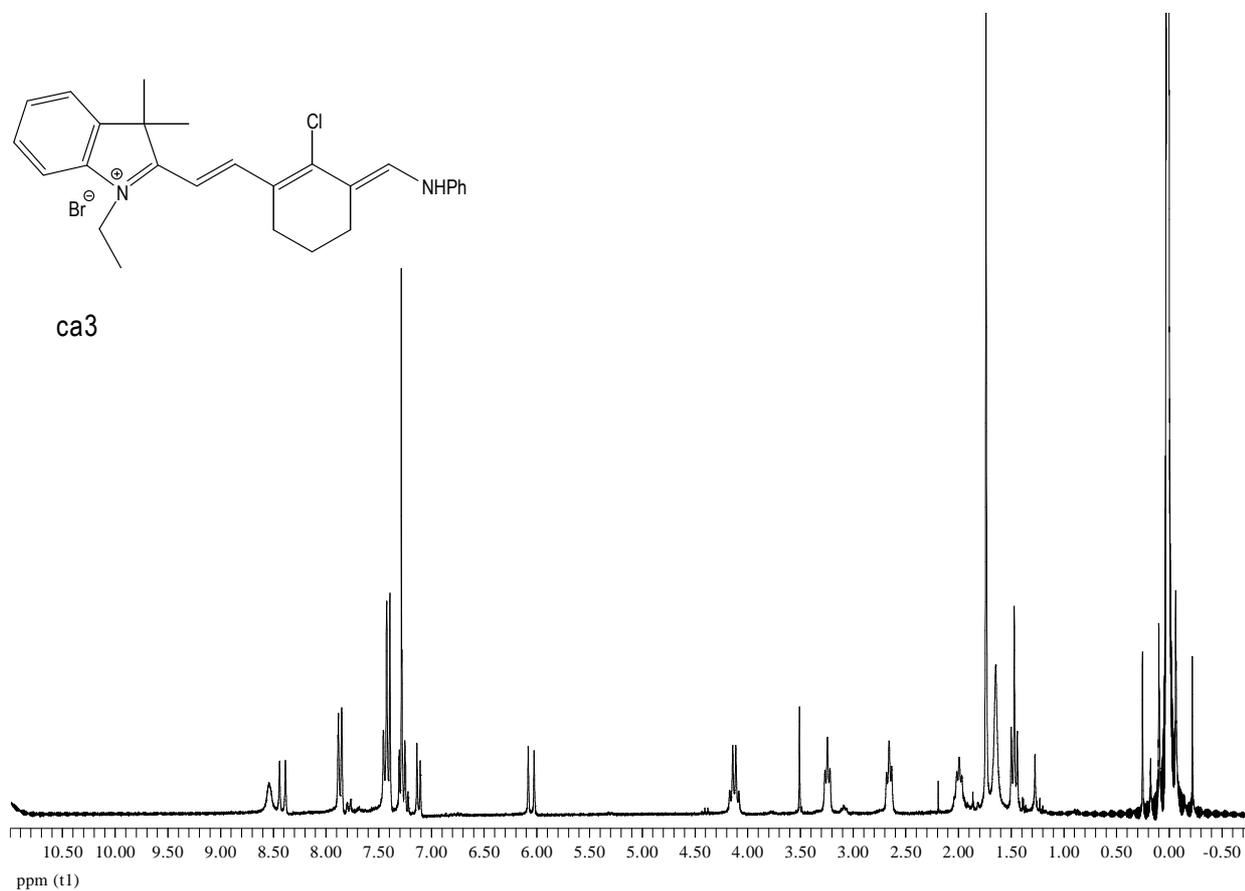
ca2



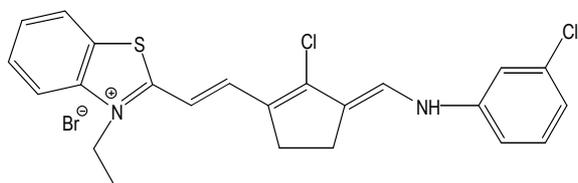
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6) de ca2



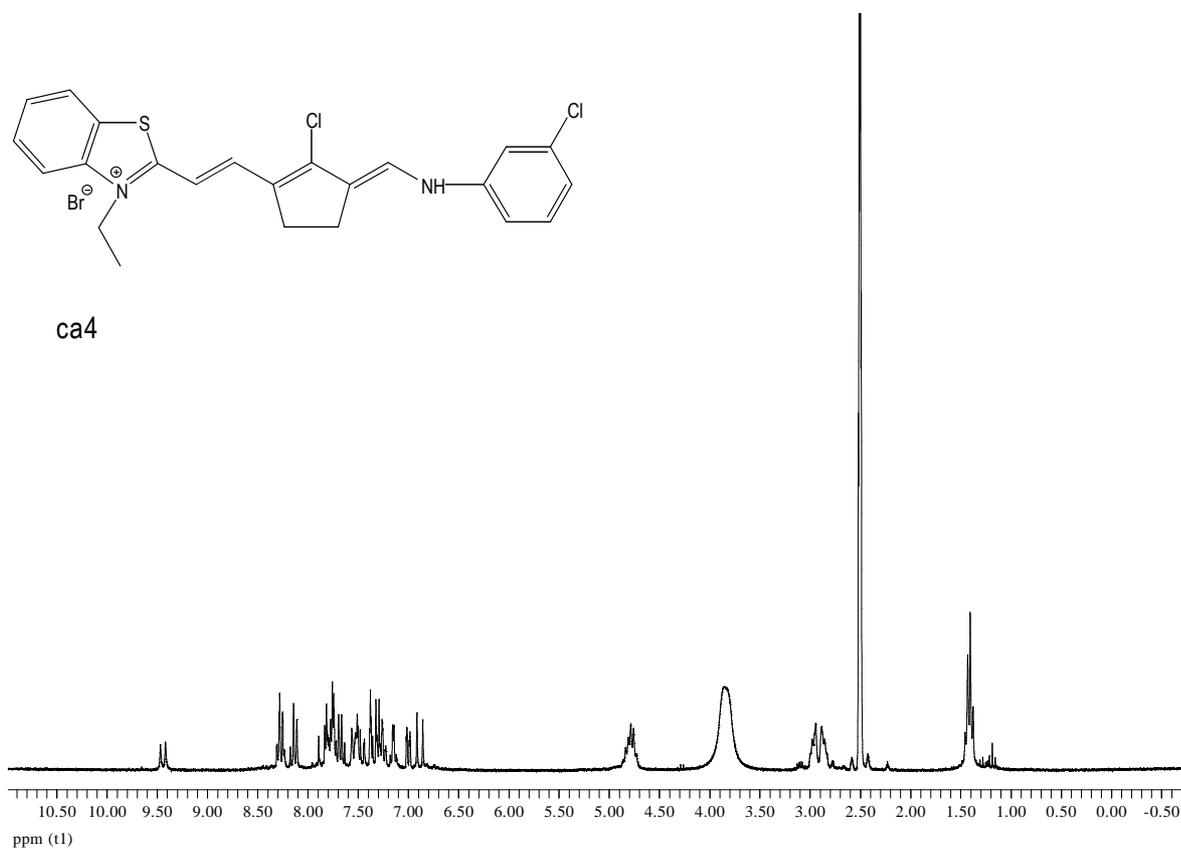
ca3



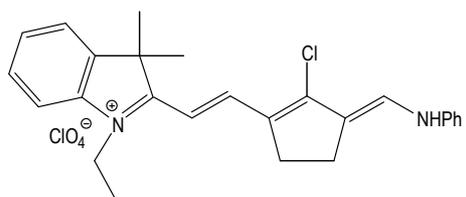
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de ca3



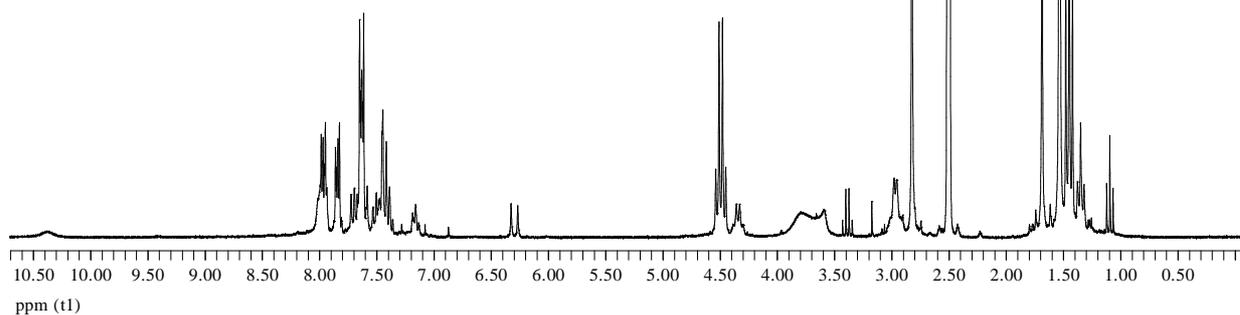
ca4



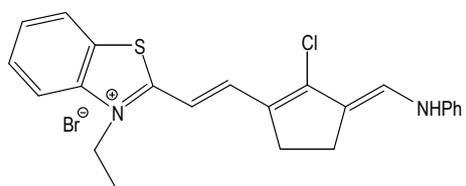
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de ca4



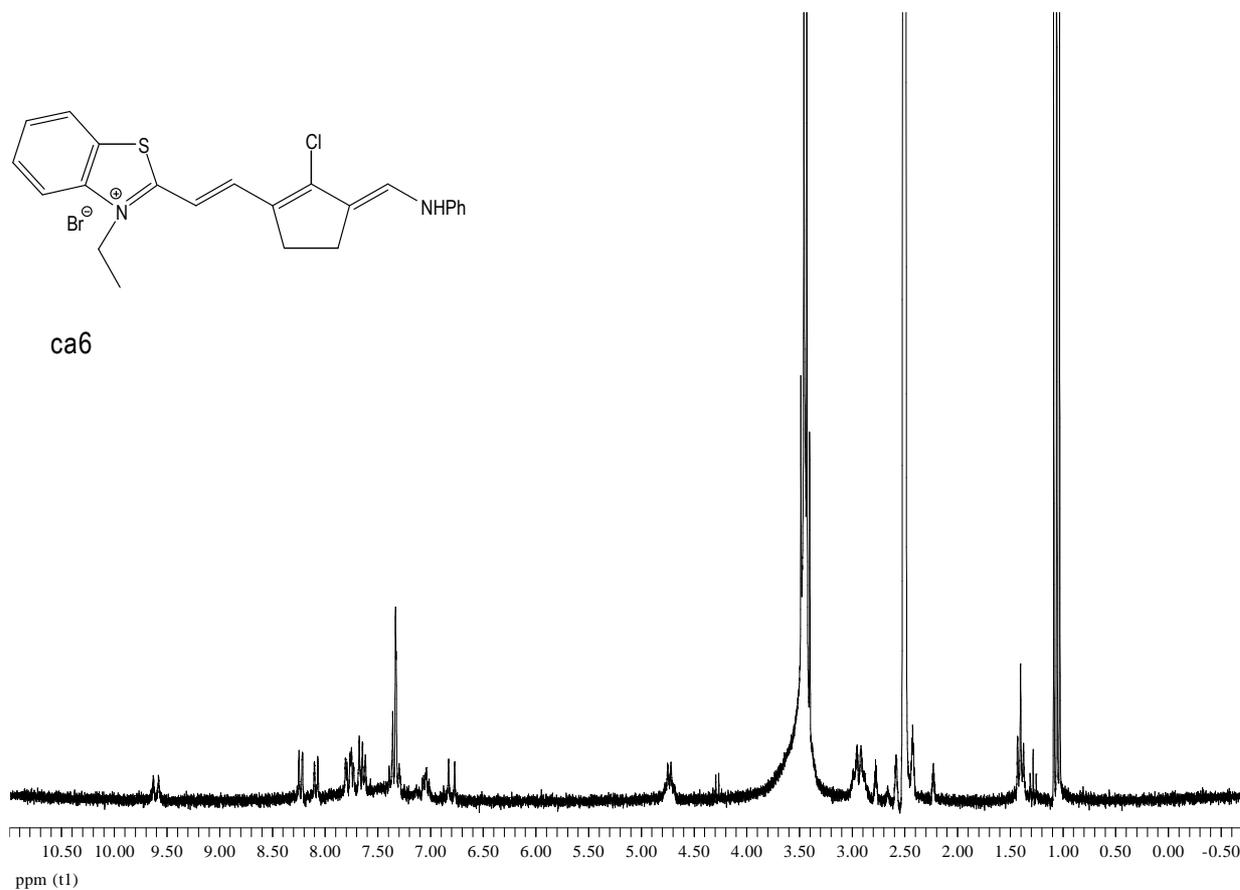
ca5



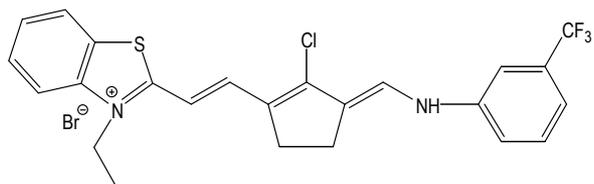
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6) de **ca5**



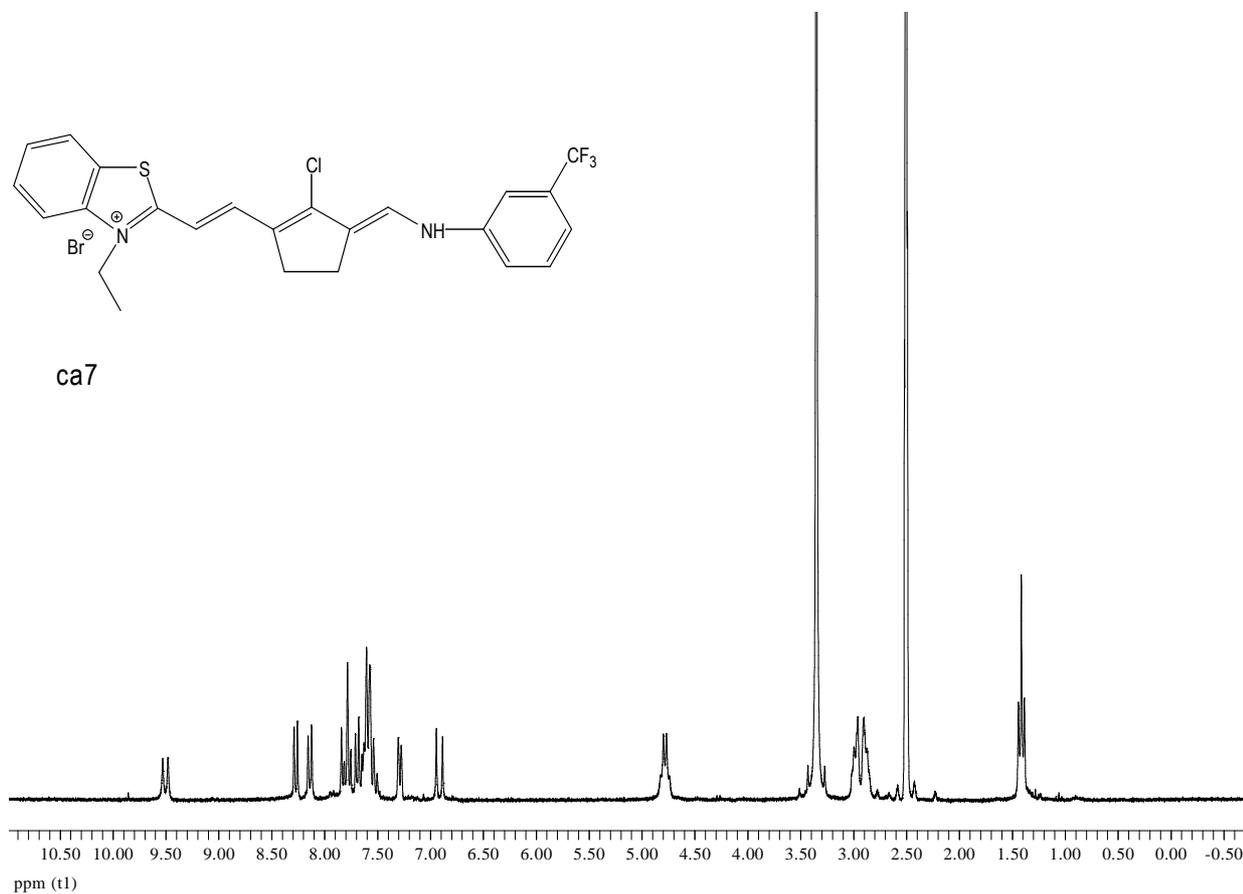
ca6



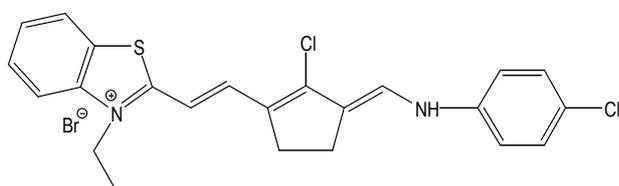
$^1\text{H-RMN}$ (250 MHz, DMSO-d_6) de **ca6**



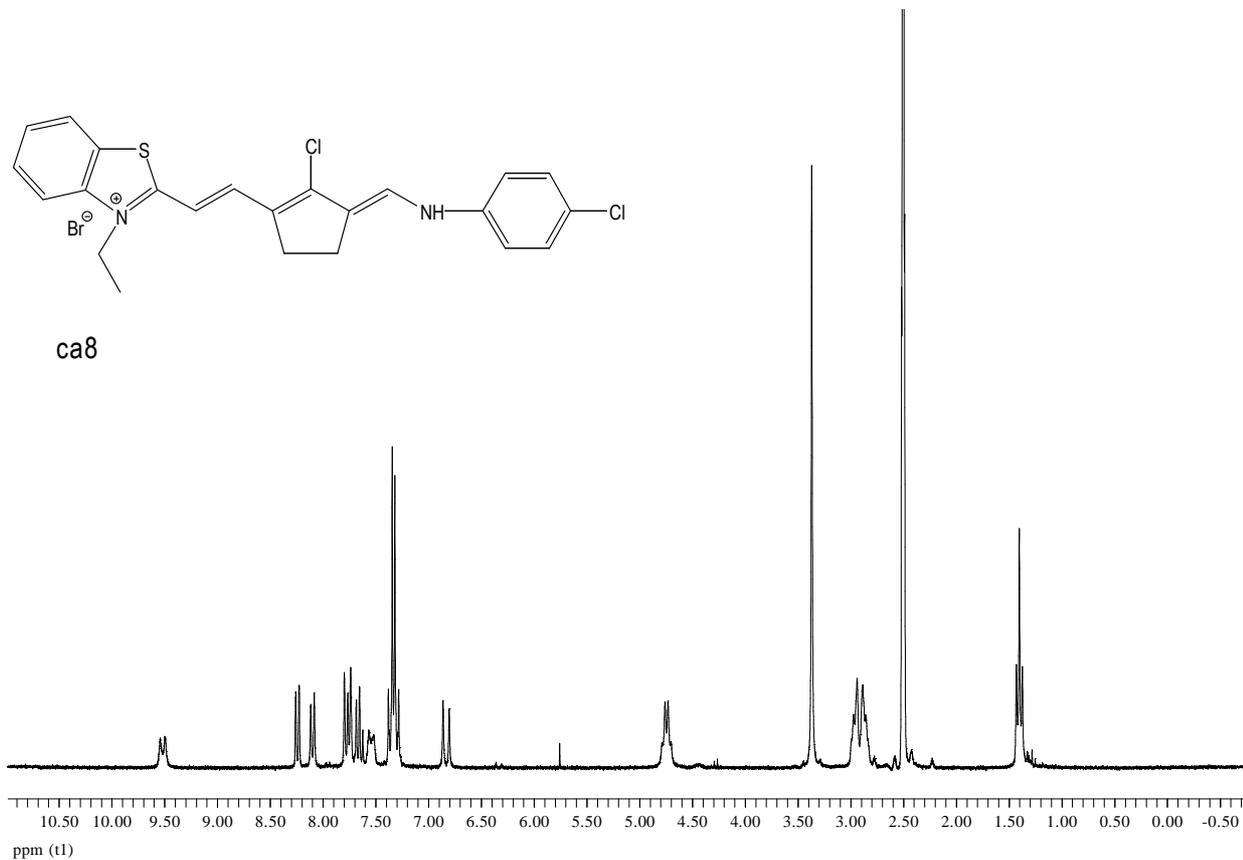
ca7



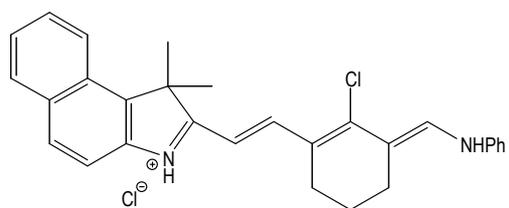
¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de ca7



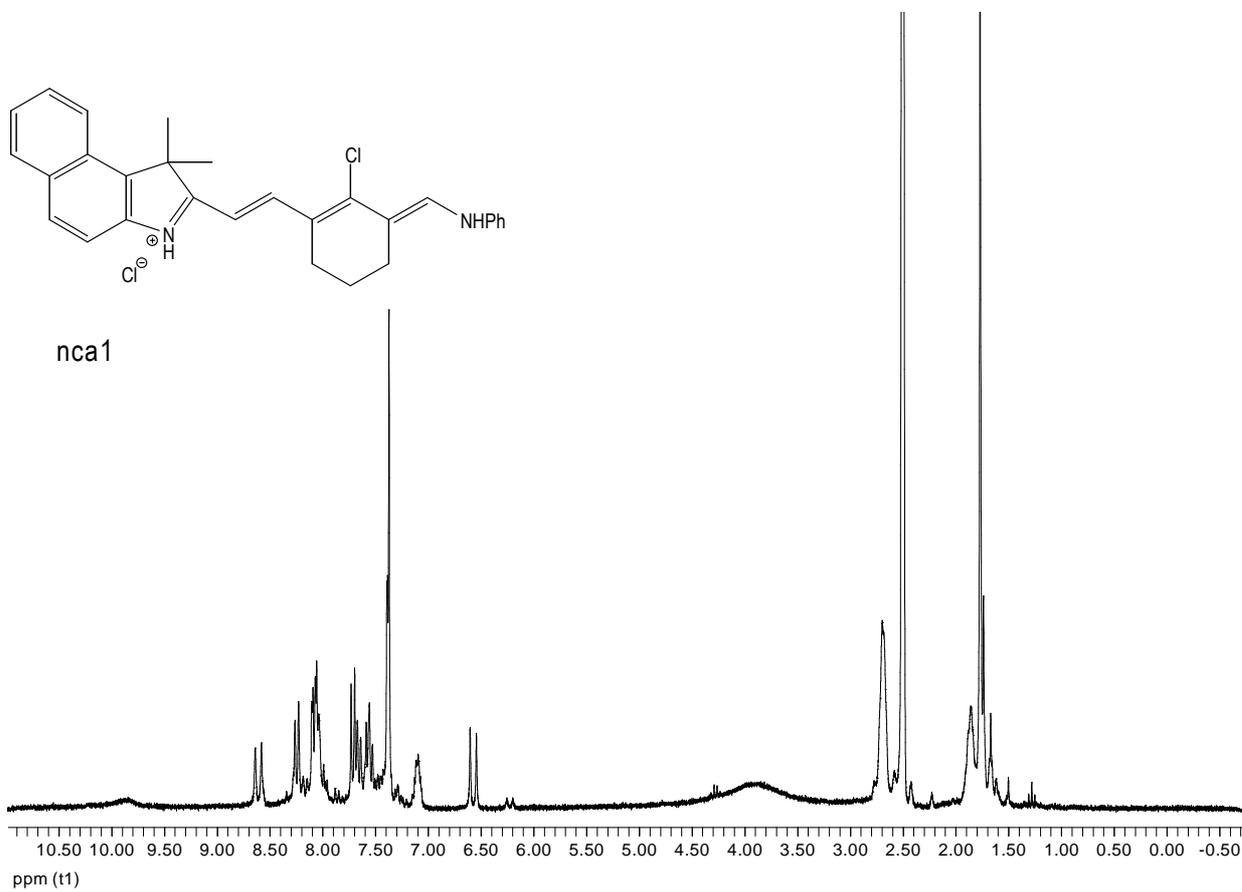
ca8



¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de ca8



nca1



¹H-RMN (250 MHz, DMSO-d₆) de **nca1**

