



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Aplicació de polímers sulfonats per a la construcció
d'elèctrodes selectius d'ions i biosensors
potenciomètrics.**

ANNA GONZALEZ BELLAVISTA

TESI DOCTORAL

PROGRAMA DE DOCTORAT EN CIÈNCIA I TECNOLOGIA AMBIENTALS

DIRECTOR: ESTEVE FÀBREGAS MARTÍNEZ

INSTITUT DE CIÈNCIA I TECNOLOGIA AMBIENTAL

DEPARTAMENT DE QUÍMICA

BELLATERRA, Desembre 2015

**Aplicació de polímers sulfonats per a la construcció
d'elèctrodes selectius d'ions i biosensors
potenciomètrics.**

MEMÒRIA PRESENTADA PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR PER:

ANNA GONZALEZ BELLAVISTA



Vist i plau:

ESTEVE FÀBREGAS MARTÍNEZ

Professor Titular

BELLATERRA, 14 DE DESEMBRE DE 2015

La present tesi doctoral descrita en aquesta memòria, s'ha portat a terme gràcies al finançament de:

Aplicación de nuevos materiales compuestos a la construcción de biosensores electroquímicos compactos. MAT2003-01253. Projecte concedit pel Ministeri de Ciència i Tecnologia.

BioSensores basados en micro/nanoestructuras. Integración en sistemas autoadaptativos de análisis. CTQ2006-15681-C02-01. Projecte concedit pel Ministeri d'Educació i Ciència.

A la meva àvia, Rosa Bachs

Agraïments

Vaig passar molt anys a l'Autònoma, primer estudiant i després fent la tesi doctoral. Quan la tenia pràcticament enllestida, vaig marxar a treballar a l'empresa privada sense presentar-la. Després de tants anys de feina, hagués estat una llàstima deixar-la passar. Malgrat l'esforç sigui inhumà, la recompensa és enorme.

Durant tots aquest anys, mai he perdut el contacte amb la persona que ha fet possible que acabi i presenti aquesta tesi doctoral, el meu director i amic, el Dr. Esteve Fàbregas. Algú que m'ha ensenyat a parlar amb propietat, a ser rigorós, a tenir sentit crític.... i que per damunt de tot, m'ha fet ser millor persona. Sempre amb energia positiva. Sempre amb amor. Esteve, ets una persona excepcional!!! Tots els agraïments han de ser per tu, perquè tu vas parir aquesta tesi, tu em vas buscar el finançament, i tu m'has donat la força perquè no tirés mai la tovallola. Ets un 10 Esteve!

Un especial agraïment a les Doctores Maria Muñoz, Mercè Capdevila i Sílvia Atrian, que han col·laborat activament en el desenvolupament dels treballs publicats. Heu estat unes professionals excel·lents i m'heu ajudat i animat molt. I com a gran suport tècnic i científic, el Dr. Jordi Macanás, que sempre ha tingut un sí per mi a tots els nivells. Ets un crack Jordi!. Gràcies a tots vosaltres aquest somni es fa realitat!

Vull parlar de la meva mare, l' Anna Maria Bellavista. És una "súper mamix" amb majúscules. Sense límits. Ets tot amor, alegria i generositat. Sempre i d'una manera incondicional, m'has adorat bojament. I aquest amor que he sentit, m'ha donat l'energia, l'autoestima i la seguretat per tirar endavant. Gràcies mamita! També vull agrair al meu germà Xavier, els bons consells, i perquè la distància ha reforçat la nostra relació en aquests últims anys. Especial menció familiar a la meva àvia Rosa i la tieta Montse, per cuidar-me sempre com una princesa quan hi vaig a dinar. I als que ja no hi són, la tieta "peque" i l'avi Joanet que ens van deixar massa aviat i els trobo a faltar.

A dues de les grans millors amigues, la Mariona Massana i la Núria Ibañez. Ens vam conèixer fent el doctorat, i va néixer quelcom que ha perdurat fins l'actualitat. Una amistat forta i de cor. Us estimo molt precioses! Que mai perdem les ganes d'estar juntes i de recolzar-nos mútuament.

Seria un crim deixar-me a tots els companys del laboratori que a l' època compartíem poiata, pels bon moments compartits, a les "puts" de l'escola-pia de Granollers, perquè sempre hi han sigut i sempre hi són, als meus actuals companys de feina que m'animen constanment, quin equip més maco que som i que bé que ens ho passem!!! I sobretot, a tots aquells que sempre em volen bé, i que m'estimen, agrair profundament tot el recolzament rebut i les mostres d'ànims i amor.

Índex

| | |
|--|----------|
| Índex | i |
| Abreviatures..... | v |
| Resum | vii |
| Abstract | ix |
| 1. Introducció | 1 |
| 1.1 Sensors Químics | 2 |
| 1.1.1 Futur i tendència | 6 |
| 1.1.2 Elèctrodes selectius d'ions, ESI | 7 |
| 1.1.2.1 Classificació | 7 |
| 1.1.2.2 ESI de portador iònic mòbil..... | 9 |
| 1.1.2.3 Fonaments de la tècnica potenciomètrica | 10 |
| 1.1.3 Evolució històrica dels ESIs fins l'actualitat | 17 |
| 1.2 Polímers | 22 |
| 1.2.1 Polímers i sensors químics | 24 |
| 1.2.1.1 El PVC..... | 25 |
| 1.2.1.2 La polisulfona | 27 |
| 1.2.1.3 Polímers funcionalitzats (o carregats) | 30 |
| 1.3 Metal·lotioneïnes | 32 |
| 1.3.1 Definició | 32 |
| 1.3.1 Mètodes d'obtenció | 33 |
| 1.3.1 Classificació | 33 |
| 1.3.1 Estructura..... | 34 |
| 1.3.1 Funció biològica | 35 |
| 1.3.1 Quantificació | 36 |
| 1.3.1 Biomarcadors de contaminació | 38 |
| 1.4 ESIs, polímers i metal·lotioneïnes..... | 38 |

| | |
|---|----|
| 2. Objectius | 41 |
| 3. Materials i mètodes | 45 |
| 3.1 Reactius i solucions..... | 45 |
| 3.2 Construcció dels elèctrodes..... | 47 |
| 3.2.1 Construcció dels suports cilíndrics conductors..... | 47 |
| 3.2.2 Preparació de les membranes selectives de portador mòbil..... | 49 |
| 3.2.2.1 Membranes de PVC..... | 49 |
| 3.2.2.2 Membranes de polisulfona..... | 50 |
| 3.2.2.3 Membranes de SPEEK..... | 53 |
| 3.3 Instrumentació..... | 55 |
| 3.3.1 Mesures discretes (batch) en el laboratori..... | 55 |
| 3.3.2 Mesures en planta pilot..... | 56 |
| 3.3.3 Mesures en planta industrial..... | 57 |
| 4. Resultats i discussió | 59 |
| 4.1 Quimiosensors potenciomètrics emprant la polisulfona (PS) com a matriu polimèrica..... | 62 |
| 4.1.1 Elèctrode selectiu de nitrat (ESI-NO ₃ ⁻)..... | 62 |
| 4.1.1.1 Elecció del solvent mediador i estudi de la resposta vers la relació polímer/ solvent/ ionòfor..... | 63 |
| 4.1.1.2 Influència del pH..... | 66 |
| 4.1.1.3 Estudi de les interferències..... | 67 |
| 4.1.1.4 Estudi del temps de vida..... | 68 |
| 4.1.2 Elèctrode selectiu de dial·lil dimetil amoni (ESI-DADMA ⁺)..... | 68 |
| 4.1.2.1 Control del procés industrial..... | 68 |
| 4.1.2.2 Optimització de les membranes selectives de l'ió DADMA ⁺ | 69 |
| 4.1.2.3 Temps de vida..... | 71 |
| 4.1.2.4 Influència del pH..... | 72 |
| 4.1.2.5 Interferències..... | 73 |
| 4.2 Aplicació industrial del sensor de DADMA ⁺ amb matriu de PVC..... | 75 |
| 4.2.1.1 Estudis d'estabilització..... | 75 |
| 4.2.1.2 Efecte de la temperatura..... | 76 |

| | |
|--|------------|
| 4.2.1.3 Efecte del medi | 77 |
| 4.2.1.4 Pseudocalibratges en condicions reals de producció | 79 |
| 4.2.1.5 Reaccions en planta | 80 |
| 4.3 Sensors potenciomètrics emprant la poli(èterètercetona) sulfonada (SPEEK) com a matriu polimèrica..... | 82 |
| 4.3.1 Elèctrode selectiu d'amoni (ESI-NH ₄ ⁺)..... | 82 |
| 4.3.1.1 Optimització del material | 83 |
| 4.3.1.2 Característiques de resposta de les membranes assajades | 83 |
| 4.3.1.3 Diagrama de Riley | 85 |
| 4.3.1.4 Estudi de les interferències | 86 |
| 4.3.2 Elèctrode selectiu de nitrat (ESI-NO ₃ ⁻) | 87 |
| 4.3.2.1 Característiques de resposta dels elèctrodes | 88 |
| 4.3.2.2 Efecte del pH | 90 |
| 4.3.2.3 Estudi de les interferències | 90 |
| 4.3.3 Conclusions | 92 |
| 4.4 Biosensors amb metal·lotioneïnes emprant la polisulfona (PS) com a matriu polimèrica..... | 92 |
| 4.4.1 Elèctrode selectiu de plata (ESI-Ag ⁺)..... | 92 |
| 4.4.1.1 Avaluació preliminar de la membrana sensora..... | 94 |
| 4.4.1.2 Influència del pH | 96 |
| 4.4.1.3 Interferències | 97 |
| 4.4.2 Elèctrode selectiu de metal·lotioneïnes | 100 |
| 4.4.2.1 Avaluació de la membrana sensora | 100 |
| 4.4.2.2 Influència del pH | 101 |
| 4.4.2.3 Interferències | 102 |
| 4.4.3 Conclusions | 103 |
| 5. Conclusions | 105 |

6. Annex. Publicacions

Art. 1. Polysulfone as an alternative material to PVC in the design of Ion-Selective Electrodes. *Sens. Actuators B*, 115 (2006) 691-696

A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas.

Art. 2. Sulfonated poly(ether ether ketone as an alternative charged material to polyvinyl chloride in the design of Ion-Selective Electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 577 (2006) 85-90

A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas.

Art. 3. Sulfonated poly(ether ether ketone), an ion conducting polymer, as alternative polymeric membrane for the construction of anion-selective electrodes. *Sens. Actuators B*, 125 (2007) 100-105

A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas.

Art. 4. Novel potentiometric sensors based on polysulfone immobilized metallothioneins as metal-ionophores. *Talanta*, 77 (2009) 1528-1533

Anna González-Bellavista , Silvia Atrian, Maria Muñoz, Mercè Capdevila, Esteve Fàbregas.

Art. 5. The first isoform –selective protein biosensor; a metallothionein potentiometric electrode. *Chem. Commun.*, 46 (2010) 2040-2042

Mercè Capdevila, Anna González-Bellavista, Maria Muñoz, Silvia Atrian, Esteve Fàbregas.

Abreviatures

| | |
|--------------------|---|
| apoMT | apoMetal·lotioneïna (sense metall) |
| BBPA | Adipat de bis(1-butilpentil) |
| DADMAC | Clorur de dial·lil dimetil amoni |
| DADMA ⁺ | Ió dial·lil dimetil amoni |
| DBP | Ftalat de dibutil |
| DMF | N,N-dimetilformamida |
| DOP | Ftalat de bis(2-etilhexil) |
| ESI | Elèctrode selectiu d'ions |
| FIM | Mètode de la interferència fixa |
| HPLC | Cromatografia líquida d'alta resolució |
| IEM | Membranes de bescanvi iònic |
| IF | Inversió de fase |
| $K_{x,y}^{pot}$ | Coefficient de selectivitat potenciomètrica de l'espècie principal x respecte l'espècie interferent y |
| LD | Límit de detecció |
| LIRL | Límit inferior de resposta lineal |
| LSRL | Límit superior de resposta lineal |
| MT | Metal·lotioneïna |
| MT1 | Metal·lotioneïna de mamífer |
| MT4 | Metal·lotioneïna de ratolí |

| | |
|----------------|----------------------------------|
| NPOE | Nitrofenil octil èter |
| PEEK | Poli(èterètercetona) |
| PEM | Membranes de bescanvi de protons |
| PS | Polisulfona |
| PVC | Policlorur de vinil |
| SPEEK | Poli(èterètercetona) sulfonada |
| SPES | Polietersulfona sulfonada |
| SpMTA | Metal·lotioneïna d'equinoderm |
| SPSF | Polisulfona sulfonada |
| TEHP | Fosfat de tris (2-etilhexil) |
| T _g | Temperatura de transició vítria |
| THF | Tetrahidrofurà |
| TOAN (T8) | Nitrat de tetraoctilamoni |

RESUM

En els últims anys, el camp dels sensors i biosensors ha experimentat un desenvolupament exponencial degut a una combinació de diferents factors. Per una banda, existeixen noves tècniques per a la construcció de microdispositius, i per altra, a les bones característiques intrínseques que aquests dispositius presenten, com són la robustesa, la selectivitat, el baix cost i la rapidesa de resposta. Aquestes característiques els fan molt adequats per a la monitorització de molts paràmetres en camps tan diversos com el mediambiental, el mèdic, l'industrial, etc.

Els elèctrodes selectius d'ions (ESIs) són sensors electroquímics que, degut al potencial electrostàtic de la seva membrana quan aquesta està en contacte amb una solució, permeten analitzar quantitativament l'analit al que és selectiva aquesta membrana. La selectivitat ve conferida per una espècie química (ionòfor) que interacciona de forma selectiva amb l'analit a determinar. La consistència física de la membrana, factor que defineix la viabilitat pràctica del sensor, ve determinada pel material emprat en la construcció d'aquesta, habitualment un polímer.

Fins al moment, el material polimèric més emprat en la construcció d'ESIs de membrana de portador mòbil ha estat el policlorur de vinil (PVC). Una de les limitacions d'aquest polímer és que la incorporació de material biològic per a la construcció de biosensors no és fàcil degut a l'ús de dissolvents orgànics (normalment tetrahidrofurà). Les proteïnes (enzimes, anticossos) no es dissolen bé en aquests dissolvents, i se n'alteren les propietats, fet que dificulta abastament l'ús del PVC per a la construcció d'aquest tipus de dispositius.

En el treball d'investigació presentat en aquesta tesi, s'estudien polímers alternatius al PVC per a la construcció de quimiosensors i biosensors potenciomètrics. Concretament, polímers amb sofre com la polisulfona i la poli(èterètercetona) sulfonada (SPEEK) que, per les seves característiques, s'han considerat que poden ser bons candidats alternatius.

S'ha decidit estudiar el SPEEK perquè és un material que, a més de presentar bones característiques físiques per a la construcció de membranes potenciomètriques, té grups amb càrrega negativa que probablement afectaran la resposta del sensor. Així, s'han construït elèctrodes per a un catió (amoní) i per a un anió (nitrat). En tots dos casos la resposta ha estat raonablement correcta, però especialment positiva per a l'ió nitrat ja que

la repulsió electrostàtica provocada pels grups sulfònics del polímer ha reduït l'efecte interferent dels anions estudiats.

També s'ha estudiat la polisulfona que, a més de subministrar bones membranes potenciomètriques amb ionòfors convencionals per als quimiosensors, permet incorporar material d'origen biològic en l'etapa final de preparació de les membranes mitjançant el procés de precipitació del polímer per inversió de fase des d'una solució aquosa on es troben les biomolècules. D'aquesta manera no en surten malmeses i, per tant, mantenen la seva activitat. Aquesta tècnica no és viable amb el PVC i representa una gran millora en la construcció de biomembranes potenciomètriques.

Com a analit model a l'hora de fabricar un quimiosensor per a anions s'ha escollit el nitrat i com a analit model per als cations, el dial·lil dimetil amoni (DADMAC). Aquest últim es va seleccionar per un requeriment d'una empresa química per a una aplicació industrial. Concretament, es volia desenvolupar un sensor per a la determinació de la concentració residual d'aquest monòmer en reaccions industrials de polímers carregats en solució. Finalment, per la major robustesa i temps de vida del ESI amb matriu de PVC, aquest és el que finalment s'ha aplicat en planta.

S'han desenvolupat biosensors potenciomètrics amb membranes de polisulfona on s'han incorporat proteïnes dins la membrana polimèrica. Les proteïnes seleccionades són metal·lotioneïnes que són presents a tots els éssers vius i que presenten una elevada capacitat complexant d'ions metàl·lics. Així, per una banda s'han estudiat aquestes metal·lotioneïnes com a ionòfors, i s'ha desenvolupat un elèctrode selectiu de plata per demostrar-ne la viabilitat. Per altra banda, també s'ha construït un biosensor on aquestes proteïnes fan el paper d'agents reconeixadors de les pròpies proteïnes. Aquest darrer estudi obre una nova via pel que fa al disseny de biomembranes potenciomètriques compactes que permetrà desenvolupar sensors potenciomètrics capaços de reconèixer biomolècules carregades sense cap reacció bioquímica.

ABSTRACT

Over the last years, the field of sensors and biosensors experimented an exponential development due to the combination of several factors. On the one hand, new manufacturing technologies for microdevices have appeared and, on the other hand, the intrinsic characteristics of sensors and biosensors such as robustness, selectivity, low cost and quick response have boosted their development. These characteristics make sensors and biosensors suitable for a wide range of fields such as, inter alia, environmental, medical or industrial.

Ions selective electrodes (ISEs) are electrochemical sensors, which by reason of the membrane electrostatic potential when it contacts with the solution, allow the quantitative analysis of an analyte for which the membrane is selective. This selectivity is conferred by a chemical species (ionophore) which interacts selectively with the analyte. The membrane physical consistency, which is the key factor that determines the practical viability of the sensor, is determined by the material used for its construction, usually a polymer.

Up to now, polyvinyl chloride (PVC) has been the most common polymeric material used for the construction of ISE membranes of the mobile carrier type. However, one of the limitations of this polymer is the difficulty to incorporate biologic material to generate biosensors. This is due to the use of organic dissolvent - usually tetrahydrofuran. Proteins, enzymes and antibodies, do not solve properly in those organic solvents and they also suffer alterations on their characteristics. Thus, the use of PVC for such devices is not feasible.

The research performed for this Ph.D. thesis is aimed at identifying alternative polymers to PVC in order to create potentiometric biosensors and quimiosensors. In particular, the thesis studies polymers containing sulfur such as polysulfone (PS) and sulfonated poly (ether ether ketone) (SPEEK) since both offer appropriate characteristics to achieve this purpose.

SPEEK has been chosen – besides its good physical characteristics for potentiometric membranes- because it bears negatively charged groups, which are likely to influence on the response of the sensor. Two different paradigmatic electrodes have been built: one for a cationic analyte (amonium) and one an anionic analyte (nitrate). In both cases the results

have achieved reasonably satisfactory results, especially for the anion-ISE since the electrostatic repulsion due to the sulfonic groups of the polymer reduces the interference effects.

Polysulfone has also been tested as a potential candidate for making ISEs. Along with its suitability to construct potentiometric membranes with conventional ionophore for quimiosensors as carriers, this polymer also allows the incorporation of biological material in the final stage by precipitating the polymer through an inversion phase process. This process precipitates the polymer in an aqueous solution containing the desired biomolecules. By these means, biomolecules do not suffer any alteration and do maintain their biochemical activity. This option is not feasible with PVC and represents a great improvement in the construction of potentiometric membranes.

Nitrate was chosen as a model analyte for making an anion quimiosensor whereas diallyldimethylammonium (DADMAC) was selected for the cation one. The latter compound was chosen following the requirement of a chemical company to conduct industrial applications, in particular for the determination of residual concentration of this monomer in industrial reactions. Following the analysis, in this case an electrode made with PVC was made on the basis of its robustness and improved life span, properties which are crucial for industrial purposes.

Potentiometric biosensors have also been developed using polysulfone as matrix by studying the incorporation of proteins inside the polymeric membrane. The proteins of choice were metallothioneins, a group of proteins that can be found in every living being and which show a high affinity for metallic ions. Accordingly, a silver selective electrode was developed first to prove the feasibility of this strategy and, secondly, a biosensor was made where the metallothioneins act as detecting agent for proteins of the same family. This study provides new opportunities to design compact potentiometric biosensors since it would allow the recognition and quantification of charged biomolecules without any biochemical reaction.

Capítol 1

INTRODUCCIÓ

1. Introducció

Fa ja molts anys, en els llindars del segle XX, Marie Curie va assenyalar: *a la vida no cal témer res, només és qüestió de comprendre-la. La Química Analítica és una ciència que actua com a catalitzador, com a clau, en aquest procés de comprensió.*¹ En els últims cinquanta anys, el progrés i l'evolució de la Química Analítica ha estat de tal magnitud que s'ha passat d'uns límits de detecció de micrograms a picograms, i els temps d'anàlisi, que cap al 1950 es perllongaven durant dies, en l'actualitat poden durar segons.

La Química Analítica ha de respondre a les necessitats i reptes que la societat canviant planteja en aspectes molt concrets; serveix d'exemple l'interès que desperten les determinacions analítiques dels fàrmacs anabolitzants, que ingerits pels esportistes tenen un objectiu completament diferent que quan es prenen a causa d'una manca o necessitat. Els compostos a determinar en els casos de dopatge són molts i molt variats: estimulants, analgèsics, esteroides, hormones, etc. La necessitat de disposar de mètodes d'anàlisi que permetin detectar amb fiabilitat aquests compostos en nivells de concentració extremadament baixos i de forma fiable fan necessari disposar de metodologies analítiques ràpides, de fàcil automatització i si és possible, a temps real.

¹ J.G. Graselli, *Anal. Chem.*, **64** (1992): 677A.

Així, durant les darreres dècades han adquirit especial rellevància noves àrees dintre de la Química Analítica que han afavorit el desenvolupament de noves tècniques instrumentals i la seva aplicació a diferents mostres. És el cas de l'automatització dels procediments analítics, el desenvolupament dels sensors, el disseny de noves estratègies i tractaments avançats de dades, el disseny d'instrumentació miniaturitzada, etc. Conceptes actuals com la química mediambiental, les tècniques genètiques, la nanotecnologia, el *lab-on-a-chip*, etc, s'estan desenvolupant activament, la qual cosa demostra una tendència a la simplificació, la miniaturització, l'automatització, la comunicació, la rapidesa, la portabilitat i el baix cost dels nous dispositius analítics. Així, sorgeix el concepte d'integració del procés analític que redueix a reconeixement i transducció l'esmentat procés.²

En l'actualitat s'està assistint a una nova revolució, en la que les determinacions de certs paràmetres analítics d'interès clínic es portaran a terme *in vivo* mitjançant l'ús de sensors miniaturitzats que permetin la detecció *on xip*, alhora que es podran realitzar estudis i determinacions analítiques a grans distàncies, gràcies a la utilització de sensors remots. Aquestes anàlisis són possibles, en gran mesura, pels avanços tecnològics que permeten una millor automatització i miniaturització dels sistemes instrumentals. Tots aquests dispositius, controlats per microprocessadors possibiliten que es puguin arribar a horitzons no imaginats tan sols una dècada enrere.

1.1 SENSORS QUÍMICS

El sensor químic aporta solucions originals per a la simplificació, miniaturització i automatització del procediment analític.² Aquests tipus d'instrumentació sorgeix de la necessitat creixent d'instrumentació analítica que pugui generar informació fora de les parets del laboratori com, per exemple, en el camp, al costat d'un reactor o en una visita mèdica domiciliària.

Un sensor és concebut com un petit dispositiu, robust, portàtil i fàcil d'utilitzar que subministra informació analítica fiable de paràmetres físics, químics o biològics d'una manera contínua. Una particularitat intrínseca dels sensors químics és que integra la major part de les etapes dels procediments analítics tradicionals, reduint-les bàsicament a dues: la de reconeixement i la de transducció (figura 1.1).

² S. Alegret, *Integration, a new paradigm in analytical chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 2003.

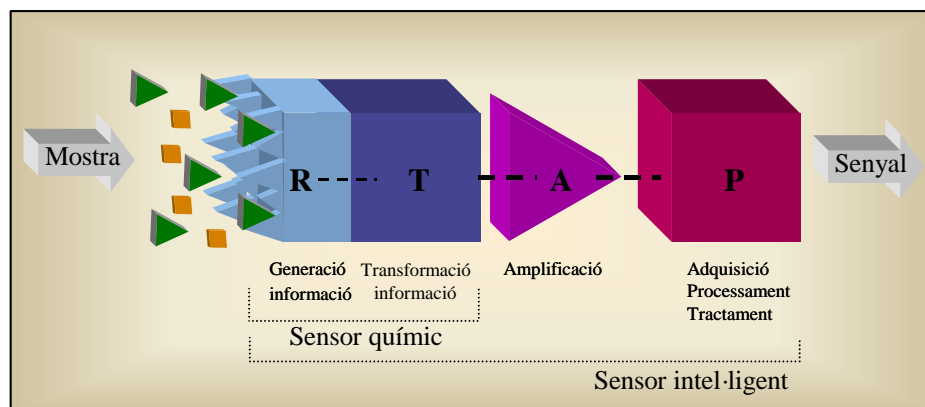


Figura 1.1. Diagrama esquemàtic del funcionament d'un sensor químic. Només un component de la mostra és reconegut pel sistema de reconeixement o receptor (R). El transductor (T) converteix el senyal associat al procés de reconeixement a un senyal elèctric, aquest senyal és amplificat i condicionat (A) i, posteriorment processat i presentat en forma de dada (P).

Ambdues parts poden trobar-se físicament separades o integrades en el propi transductor. Concretament, la primera etapa correspon a la codificació de la quantitat d'analit present en la mostra en un senyal primari (de tipus òptic, elèctric, màssic o tèrmic) derivat de la interacció selectiva d'un element de reconeixement iònic o molecular amb l'analit. En la segona etapa, un component instrumental, format bàsicament pel transductor, converteix el senyal primari en un senyal secundari, normalment de tipus elèctric, fàcilment mesurable i interpretable. La magnitud d'aquest senyal es podrà correlacionar amb la concentració d'analit reconegut en l'etapa de generació del senyal. En funció dels materials emprats com a element de reconeixement o segons el principi de funcionament del transductor es pot obtenir una àmplia varietat de sensors.

El transductor és un dispositiu capaç de transformar l'energia que codifica la informació química procedent de la mostra en un senyal analític mesurable. La IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) va donar una classificació definitiva dels sensors químics segons el mecanisme de transducció tal i com podem veure a la taula 1.1. Atesa la simplicitat conceptual i instrumental de la transducció electroquímica, aquesta constitueix una ruta exitosa per a la creació de dispositius sensors sensibles i selectius de baix cost.³

Taula 1.1. Principis, sistemes i dispositius transductors utilitzats en la construcció de sensors químics i biosensors.

Dispositius òptics

Transformen alteracions de propietats òptiques, les quals són el resultat d'una interacció de l'analit amb la part receptora. Alhora es classifiquen segons el tipus de propietat mesurada, així existeixen els sensors òptics basats en la mesura de l'absorbància, la reflectància, la luminescència, la fluorescència i l'índex de refracció.

³ E. Bakker, *Anal. Chem.*, **76** (2004): 3285.

Dispositius electroquímics

Transformen l'efecte de la interacció electroquímica entre l'analit i un elèctrode en un senyal útil. Aquests efectes poden ser estimulats elèctricament o poden ésser el resultat de la interacció espontània (en condicions de corrent nul). Aquests dispositius poden ser classificats alhora en:

- Sensors voltamperomètrics
 - **Sensors potenciomètrics**
 - CHEMFETs
-

Dispositius elèctrics

Es basen en mesuraments on tenen lloc processos electroquímics, i el senyal és produït com a conseqüència del canvi en les propietats elèctriques causat per la interacció entre l'analit i el dispositiu.

- Sensors de metall-òxid-semiconductor (MOS)
 - Sensors de semiconductor orgànic.
 - Sensors de conductivitat electrolítica.
 - Sensors de permitivitat elèctrica.
-

Dispositius sensibles a la massa (màssics)

Transformen un canvi de massa sobre una superfície especialment modificada en un canvi en una propietat del material de suport. El canvi de massa és causat per l'acumulació de l'analit. Dins d'aquest grup es troben:

- Dispositius piezoelèctrics.
 - Dispositius d'ona acústica superficial (SAW) (BAW).
-

Dispositius magnètics

Basats en el canvi de les propietats paramagnètiques del gas a analitzar.

Dispositius termomètrics

Es basen en el mesurament de variacions tèrmiques que es verifiquen en determinades reaccions químiques o processos d'adsorció en què intervé l'analit.

- Sensors catalítics.
-

Centrant-nos en l'element de reconeixement dels sensors químics podem distingir entre quimiosensors i biosensors. Aquests últims es caracteritzen per contenir un element actiu d'origen biològic (enzims, anticossos, àcids nucleics, etc)⁴ integrat en el transductor que ha d'establir una interacció selectiva i preferentment reversible amb l'analit. La selectivitat característica d'un biosensor ve donada per la capacitat del component biològic de reaccionar preferentment amb l'espècie d'interès. D'altra banda, la sensibilitat no només depèn de l'element de reconeixement sinó també de l'eficàcia del transductor per detectar la reacció de reconeixement. Els biosensors, com a conseqüència de la seva resposta més selectiva que els clàssics quimiosensors, poden ser una bona alternativa per a l'anàlisi de

⁴ S. Subrahmanyam, S. A. Piletsky, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.*, **74** (2002): 3942.

processos en àrees ben diferents i complexes.⁵ Els biosensors ja han assolit la seva maduresa conceptual (encara que no tecnològica i comercial) i s'han aplicat a la determinació de la glucosa, demanda biològica d'oxigen (BOD),⁶ fenols, metalls pesants i alguns pesticides.^{7,8} Els biosensors ofereixen, a més, la possibilitat de determinar no només determinades espècies sinó també els seus efectes biològics, com per exemple la toxicitat.

A l'hora de desenvolupar un sensor electroquímic cal considerar l'elecció de l'element de reconeixement químic o biològic; la transducció electroquímica (normalment potenciomètrica o amperomètrica) i la integració d'ambdós elements. Tradicionalment, l'element de reconeixement s'immobilitza directament sobre la superfície del transductor (adsorció, entrecreuament, enllaç covalent), o mitjançant un gel o una membrana (atrapament). Aquest procediment acostuma a ser laboriós i per això la seva producció a gran escala és difícil i costosa. Una alternativa interessant per a la construcció de sensors electroquímics és l'ús de compòsits conductors. A diferència dels elèctrodes de superfície modificada, els compòsits es caracteritzen per integrar més d'un material (element reconeixedor i material conductor) amb una matriu aglutinada. La superfície d'un compòsit pot renovar-se per poliment el que garanteix l'obtenció de material actiu per a un nou assaig. Les propietats d'aquests materials s'avaluen exhaustivament en la monografia publicada per ALEGRET i MERKOÇI.⁹

Un altre exemple d'integració (i simplificació) en la tecnologia dels sensors són els sensors d'estat sòlid (*All-solid-state*) que estan formats per materials sòlids o semisòlids (semiconductors, electròlits sòlids, FET (*Field-Effect Transistor*), metalls) que no contenen cap element líquid intern. Aquests són dispositius robustos mecànicament, versàtils en configuració i gràcies a les tecnologies microelectròniques o serigràfiques, es poden fabricar massivament a baix cost. La substitució de la solució de referència interna per materials de contacte sòlid ha suposat un gran avenç dins del món dels elèctrodes selectius d'ions ja que li confereix al sensor una major robustesa i versatilitat mecànica. En aquesta línia, cal destacar la utilització dins el Grup de Sensors i Biosensors de compòsits conductors basats en una resina epoxi amb plata o grafit¹⁰ com a referència interna sòlida que permet obtenir sensors de diferents configuracions a baix cost.^{11,12,13,14}

⁵ S. Alegret, *Industria Farmacéutica* (1990): 33.

⁶ S. Rastogi, P. Rathee, T.K. Saxena, *Current Applied Physics*, **3** (2003): 191.

⁷ Rogers, K. R.; Mascini, M. *Field Analytical Chemistry and Technology*, **2** (1998): 317.

⁸ M.P. Marco, D. Barceló, *Measurement Science & Technology*, **7** (1996): 1547.

⁹ Alegret, S.; Merkoçi, A. *Cap. VIII. Composite and biocomposite materials for electrochemical sensing*. pp 377-411 Elsevier Science B.V., 2003.

¹⁰ F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, *Trac-Trends in Anal. Chem.*, **15** (1996): 296.

¹¹ J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, A. Florido, *Química Analítica*, **4** (1985): 145.

¹² S. Alegret, M.T. Escalas, *Biosens. Bioelectron.*, **6** (1991): 609.

¹³ S. Alegret, A. Florido, *Analyst*, **116** (1991): 473.

¹⁴ G.J. Moody, J.D.R. Thomas, J.L.F.C. Lima, *Analyst*, **113** (1988): 1023.

1.1.1 FUTUR I TENDÈNCIA

Actualment, la implementació de la microelectrònica i la microinformàtica juntament amb els avenços en la indústria de les telecomunicacions han tingut una gran repercussió en l'automatització i en la robotització de les anàlisis químiques així com en l'accessibilitat i la disponibilitat de la informació analítica.

La utilització d'una matriu de sensors (*array sensors*) no gaire selectius, junt amb els tractaments matemàtics adequats obre una nova àrea d'investigació cap al que s'anomena *nassos* o llengües electròniques. Amb aquest objectiu s'empren els anomenats *sensors multidimensionals*, que es caracteritzen per presentar sensibilitats entrecruades entre ells.¹⁵ Amb tècniques de processament de senyals i mètodes de reconeixement de models és possible reduir o aprofitar positivament els entrecruaments de sensibilitats entre els sensors, arribant a fer possible identificar qualitativament i quantitativa, i d'una manera simultània, un nombre d'analits superior al nombre de sensors que forma la matriu.¹⁶ Aquesta situació és similar a la que s'esdevé en els sentits de l'olfacte i del gust d'aquí el nom de *nassos*^{17,18,19} i llengües electròniques.^{20,21,22}

Una de les tendències de la tecnologia moderna és la *miniaturització*. Un exemple és la indústria microelectrònica, on la reducció i la integració dels components electrònics és un fet ben conegut i en evolució constant. Existeixen microsensors d'unes dimensions inferiors als mil·límetre quadrat. I també hi ha una certa analogia amb la moderna tecnologia de les comunicacions, on els avenços en la transmissió de senyals per guies òptiques de diferent geometria han proporcionat materials i uns conceptes innovadors en la construcció de microsensors. En definitiva, microenginyeries com les acabades d'esmentar són capaces de fabricar microsensors químics, amb l'avantatge addicional que el tractament del senyal pot ser també integrat en el mateix xip sensor.

La *microfabricació* s'estén actualment cap a la construcció de microactuadors, com vàlvules, rotors, bombes, etc., i de microestructures, com conduccions, columnes cromatogràfiques, guies òptiques, etc, amb la qual cosa la microinstrumentació analítica amb un alt grau d'integració permet, per exemple, confinar en un espai de pocs mil·límetres quadrats un procés analític convencional de tipus cromatogràfic (transport de

¹⁵ S. Alegret. *Sobre senyals, sensors i altres aspectes de l'anàlisi química*. Discurs de la sessió inaugural del curs 1992/93. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona (1992).

¹⁶ M. Hartnett, D. Diamond, P.G. Barker, *Analyst*, **118** (1993): 347.

¹⁷ K. Persaud, G.H. Dodd, *Nature*, **229** (1982): 352

¹⁸ J.W. Gardner, P.N. Bartlett, *Sens. Actuators B*, **18-19** (1994): 211.

¹⁹ G. Monkman, *Sensor Review*, **16** (1996): 40.

²⁰ Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, *Sens. Actuators B*, **44** (1997): 532.

²¹ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y.G. Vlasov, C. Di Natale, E. Mazzone, A. D'Amico, *Electroanal.*, **11** (1999): 814.

²² K. Hayashi, K. Toko, M. Yamanaka, H. Yoshihara, K. Yamafuji, H. Ikezaki, R. Toukubo, K. Sato, *Sens. Actuators B*, **23** (1995): 55.

la mostra + separació cromatogràfica + detecció + tractament de dades). Les possibilitats analítiques que es deriven de la integració de les etapes de preparació de la mostra, separació i detecció en una senzilla unitat miniaturitzada, ha conduït al concepte dels μ TAS (*micro-total analysis systems*), mòduls dissenyats com a microdispositius que no requereixen d'assistència externa (programari, bombes o controls), excepte una font d'energia. Aquesta és una àrea de la química analítica amb importants perspectives de creixement.²³

1.1.2 ELÈCTRODES SELECTIUS D'IONS, ESI

Els elèctrodes selectius d'ions són sensors químics que es basen en un principi de transducció potenciomètric a on l'element de reconeixement manté un equilibri dinàmic i reversible amb l'ió d'*interès* a la superfície de la membrana. Els ions es difonen degut a la diferència de potencial químic, fet pel qual es produeix una separació de càrregues en la interfície membrana/solució, el qual rep el nom de **potencial de membrana**.²⁴ Aquest, dependrà de l'activitat de l'ió en ambdues bandes i es mesurarà en front d'un potencial constant de referència, obtingut a partir d'un segon elèctrode, (l'elèctrode de referència).²⁵

A l'apartat 1.1.2.3 es descriuen les metodologies d'avaluació dels ESIs, així com la llei de Nernst i la seva generalització, la llei de Nikolskii-Eisenman, que permeten, respectivament, determinar el potencial amb absència i presència d'ions interferents.

1.1.2.1 Classificació

Els elèctrodes selectius d'ions, i d'acord amb les recomanacions de la IUPAC,²⁶ es classifiquen en funció de la membrana emprada (taula 1.2). Es divideixen entre els ESIs primaris que poden ser cristal·lins o no cristal·lins, els ESI multicapa tant de gasos com de substrat enzimàtic i els ESI de contacte intern sòlid.

²³ A. Isildak, K. Covington, *Electroanal.*, **5** (1993): 815.

²⁴ E. Pungor, *Talanta*, **44** (1997): 1505.

²⁵ A. Skoog, D.M. West, *Análisis Instrumental*, México: McGraw-Hills/Iberoamérica (1990), pàg. 562.

²⁶ I.U.P.A.C *Compendium of Analytical Nomenclature, Definitive Rules*, 1997. Oxford Pergamon Press.

Taula 1.2. Classificació dels ESI en funció del tipus de membrana emprada.

ESI primaris

Cristal·lins (membranes sòlides, bescanviadors iònics fixos).

- **Membrana homogènia.** Basades en sals inorgàniques conductores poc solubles a temperatura ambient com p. ex: LaF_3 , Ag_2S i CuS . Es mantenen processos de bescanvi iònic a la superfície sòlid/ H_2O que provoquen l'aparició de potencials interfacials
- **Membrana heterogènia.** Són el resultat de combinar dos o més materials diferents de manera que cadascun manté les seves propietats individuals, però alhora el material resultant té unes característiques físiques, químiques i mecàniques noves. S'utilitzen les mateixes sals que les membranes homogènies i bescanviadors iònics, aglutinat amb algun polímer.

No cristal·lins

- **Bescanviadors iònics fixos.** Cal destacar les membranes de vidre, estructures basades en SiO_2 , Na_2O i Al_2O_3 que mitjançant el grups silanols terminals i, a causa de la conductivitat proporcionada per la mobilitat que hi té el sodi, pot mantenir equilibris reversibles amb H^+ , Na^+ , Li^+ , K^+ , Ag^+ i NH_4^+ . És àmpliament coneguda l'aplicació de l'elèctrode de pH.
- **Membranes amb bescanviador iònic mòbil.** Estan basades en la incorporació d'espècies que poden interaccionar amb l'analít i formar compostos solubles en una fase orgànica
 - Cations hidrofòbics carregats positivament. p ex., sals d'amoni quaternari, complexos de metalls de transició, etc.
 - Anions hidrofòbics carregats negativament. p ex., tetra-p-clorofenilborats, sulfonat de dinonilnaftalè, etc.
 - Bescanviadors neutres. p. ex., antibiòtics, compostos macrocíclics, etc.
 - Parells iònics hidrofòbics. p. ex., espècies catióniques de tetrafenilborat, espècies aniòniques de tetraalquilamoni.

ESIs multicapa

- **Sensible a gasos.** És un ESI compost o modificat que utilitza dues membranes, una de selectiva, i una l'altra de permeable a gasos. Aquests dispositius responen a espècies que presentin una forma gasosa, i per tant, es pugui difondre per la membrana permeable, on és detectat de manera indirecta per l'elèctrode intern. P. ex., elèctrodes de CO_2 , SO_2 , NH_3 , H_2S , HCN , etc.
 - **De substrat enzimàtic.** S'adapta un enzim específic sobre l'ESI primari. Cal que el producte de la reacció enzimàtica o algun cofactor sigui mesurable per l'ESI primari ja que així la mesura potenciomètrica ve condicionada per la reacció. p. ex. elèctrodes de glucosa, urea, penicil·lina, amigdalina, L-arginina, etc.
-

En els ESIs, la membrana és responsable tant del reconeixement selectiu com de transduir el potencial de membrana generat com a senyal elèctric. És a dir, el transductor i el receptor formen part d'un mateix element que seria la membrana de l'elèctrode. La

selectivitat de la membrana ve determinada per la seva estructura, per la classe, i la mobilitat iònica.

1.1.2.2 ESI de portador iònic mòbil

Dins dels elèctrodes selectius d'ions, hi ha els elèctrodes selectius d'ions de membrana polimèrica. Una membrana sensora d'aquest tipus consta, essencialment, de tres components: el material electroactiu o ionòfor, el solvent mediador o plastificant i una matriu polimèrica encarregada de proporcionar el suport físic. En alguns casos és necessari introduir l'element que coneixem com a additiu (sals lipofíliques).

Aquestes membranes han de ser immiscibles en aigua, els seus components han de presentar baixa volatilitat, i han de presentar un grau mínim de conductivitat.

L'ionòfor és el component responsable de l'extracció i reconeixement químic de l'ió al qual és selectiu, conegut com a ió principal. Idealment, forma un complex relativament fort i de forma reversible amb l'analit i no complexa amb altres ions. Es classifiquen, principalment, en dues famílies, els ionòfors carregats i els neutres.

Els ionòfors carregats presenten un mecanisme de resposta semblant a les resines iòniques²⁷ formant parells iònics que en aquest cas es mantenen dissolts en la fase orgànica (solvent mediador). Les membranes selectives a anions basades en aquests ionòfors segueixen, pel que fa a la selectivitat, la sèrie de Hofmeister, on es mostra una preferència pels anions més lipofílics: anions orgànics > ClO_4^- > SCN^- > I^- > NO_3^- > Br^- > Cl^- > > HCO_3^- > CH_3COO^- > SO_4^{2-} > HPO_4^- > F^- .

L'ionòfor es troba dissolt en un *solvent mediador* que, a més, plastifica la matriu polimèrica i influeix en nombrosos paràmetres que caracteritzen la resposta de l'elèctrode.²⁸ Es caracteritza per la seva lipofília i inèrcia química i, en la preparació de les membranes, cal que presenti suficient poder solubilitzant de l'ionòfor (i dels additius). El caràcter hidrofòbic que el caracteritza afavoreix la retenció dels components en la membrana i assegura, a priori, un major temps de vida del dispositiu.

El polímer és el responsable de formar una matriu que proporcioni un suport sòlid i estructurat per a la resta de components de la membrana, consistència mecànica, adhesió, biocompatibilitat, etc. A més, no presenta cap funció electroactiva en si mateixa. La matriu

²⁷ M. Antonisse, D. Reinhout, *Electroanal.*, **11** (1999): 1035.

²⁸ T. Sakaki, T. Harada, Y. Kawahara, Y. *Journal of Inclusion Phenomena and Molecular Recognition in Chemistry*, **17** (1994): 377.

polimèrica més emprada és el policlorur de vinil (PVC).^{29,30} Es selecciona en base a la seva inèrcia química i baixa resistència elèctrica. Un dels requeriments del material per ser utilitzat en la construcció de membranes d'ESIs, és que la seva temperatura de transició vítria estigui per sota la temperatura ambient. Si més no, en combinar el PVC i el solvent mediador, s'aconsegueixi rebaixar la temperatura per esdevenir un material viscos que faciliti la mobilitat dels components dissolts. S'ha demostrat que el PVC presenta impureses aniòniques inherents que generen permselectivitat a cations en membranes que no contenen cap tipus d'ionòfor i a més afavoreixen la resposta del sensor ja que disminueixen la resistència elèctrica de la membrana.^{31,32} En general, aquest fet millora la resposta dels elèctrodes desenvolupats i pot arribar a ser fonamental. El contingut de PVC acostuma a ser aproximadament el 30 % en massa de la membrana.

Els additius són compostos lipofílics (per ex. tetrafenilborat) que s'addicionen al còctel sensor amb l'objectiu de reduir la interferència de contraions presents a la mostra,³³ reduir el temps de resposta de l'elèctrode³⁴ i incrementar la sensibilitat quan l'ionòfor té poca capacitat extractant.

1.1.2.3 Fonaments de la tècnica potenciomètrica

És imprescindible fer una descripció, tot i que no sigui exhaustiva, de la tècnica potenciomètrica, així com de la metodologia de càlcul emprada per al tractament de les dades obtingudes.

La potenciometria requereix d'una instrumentació bàsica formada per l'elèctrode indicador o de treball, l'elèctrode de referència, la solució problema i el potenciòmetre. Es mesura la diferència de potencial elèctric que es genera entre l'elèctrode indicador i l'elèctrode de referència a intensitat de corrent nul·la. Per aconseguir comparar mesures de l'elèctrode indicador, l'elèctrode de referència^{35,36} ha de subministrar un senyal estable i reproducible. Per això ha de contenir una solució que no interfereixi amb la mesura de l'analit i ha de permetre un flux de càrregues constant i lliure des de la solució de reblliment a la mostra per assegurar una bona conductivitat de tot el sistema electroquímico.

²⁹ E. Lindner, Z. Niegiesz, K. Toth, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **259** (1989): 67.

³⁰ J.D.R. Thomas, *Anal. Chim. Acta*, **180** (1986): 289

³¹ A. Hodinar, A. Jyo, *Anal. Chem.*, **61** (1989): 1169.

³² A. Vandenberg, P.D. Vanderwal, M. Skowronskaptasinska, *Anal. Chem.*, **59** (1987): 2826.

³³ W. Morg, G. Kahr, W. Simon, *Anal. Lett.*, **7** (1974): 9.

³⁴ E. Lindner, E. Gráf, Z. Niegiesz, E. Pungor, *Anal. Chem.*, **60** (1988): 295.

³⁵ Orion. *Handbook of electrodes technology*, Orion Research Massachusetts (2002).

³⁶ T. Sokalki, M. Maj-Zurawska, A. Hulaicki, A. Lewerstam, *Electroanal.*, **11** (1999): 632.

➤ **Fonaments teòrics, equació de Nernst**

La base teòrica d'aquesta tècnica és l'equació de Nernst (I-1). Aquesta equació es pot emprar directament per relacionar quantitativament el potencial de l'elèctrode amb l'activitat de les espècies químiques, o, indirectament, per calcular el canvi de potencial d'aquest elèctrode. Per al cas d'un elèctrode selectiu de cations, aquesta equació pren la forma:

$$E = E^o + \frac{RT}{z_i F} \cdot \ln a_i^{z_i^+} \quad (\text{I-1})$$

on E és el potencial de l'elèctrode, E^o és el potencial estàndard de l'elèctrode; z_i és la càrrega de l'ió principal i a_i és l'activitat de l'ió principal; R , la constant de gasos (8.314 J/K·mol); T , la temperatura absoluta; i F , la constant de Faraday (96487 C·mol⁻¹). Les tres darreres variables formen el terme (RT/F) que a 25 °C i fent la conversió del logaritme neperià a decimal adquireix un valor de -59,16 mV. Cal dir que si l'ió principal és un anió, el terme logarítmic té signe negatiu. Reescrivint l'expressió anterior s'obté l'equació I-2.

$$E = E^o + s \cdot \log(a_i) \quad (\text{I-2})$$

On s és el pendent o sensibilitat expressada en mV/dècada d'activitat i depèn de la càrrega de l'ió principal.

Tal com es descriu a l'equació de Nernst, els canvis de potencial mesurat es deuen a variacions en l'activitat de l'ió d'interès i no a la concentració. L'activitat s'entén com la concentració efectiva de l'espècie que mesurem en la solució i que es relaciona amb la concentració per mitjà de l'equació (I-3).

$$a_i = \gamma_i \cdot [X] \quad (\text{I-3})$$

on $[X]$ correspon a la concentració de l'ió d'interès i, γ_i és el coeficient d'activitat. Aquest coeficient depèn de la força iònica del medi de manera que com més elevada sigui aquesta més s'allunya de la unitat i, per tant, més diferència hi ha entre els valors de concentració i d'activitat.

La força iònica es defineix com:

$$I = \frac{1}{2} \cdot \sum_{n=1}^i Z_i^2 \cdot [C]_i \quad (\text{I-4})$$

on Z_i és la càrrega de cada un dels ions que hi ha a la solució n, i $[C]_i$, és la concentració corresponent. Aquest sumatori correspon a totes les espècies iòniques presents en solució; per tant, la força iònica, i de manera simplificada, es pot entendre com una mesura de la concentració salina del medi.

Una de les equacions més utilitzades per relacionar la força iònica amb el coeficient d'activitat és la de Debye-Hückel. Aquesta permet determinar el coeficient d'activitat mitjà (γ_{\pm}) en un ampli interval de forces iòniques (equació I-5).

$$\log \gamma_{\pm} = \frac{A \cdot |Z_+ \cdot Z_-| \cdot \sqrt{I}}{1 + B' \cdot \sqrt{I}} \quad (\text{I-5})$$

Aquesta expressió consta de diferents paràmetres empírics, on A és proporcional a la temperatura ($T^{(-3/2)}$) i pren un valor de 0,507 a 20 °C en medi aquós, Z_+ i Z_- són la càrrega del catió i de l'anió de l'electròlit, I , la força iònica del medi, i B' és un paràmetre directament dependent de l'electròlit de fons i pren un valor de 0.329 a 20 °C en medi aquós. Aquesta equació és vàlida per forces iòniques inferiors a 0.1M

➤ Equació de Nikolskii-Eisenman

El model teòric predit per l'equació de Nernst no té en compte la resposta a ions similars al principal (ions interferents o interferències). En cas de donar-se aquesta situació cal emprar una generalització de l'equació de Nernst que rep el nom d'equació de Nikolskii-Eisenman, (I-6) on s'introdueix una correcció que inclou l'efecte interferent dels esmentats ions, amb la qual cosa s'obté el potencial global de l'ió principal i de les interferències existents en el medi de treball.³⁷

$$E = E^o + s \cdot \log \left(a_x + \sum K_{x,y}^{pot} a_y^{z_x/z_y} \right) \quad (\text{I-6})^*$$

*Cal destacar que s'agrupa i es du a terme el mateix procés de conversió que en el cas de l'equació I-1

on E és el potencial de l'elèctrode; E^o , el potencial estàndard del sistema; s és el pendent o sensibilitat expressada en mV/dècada d'activitat; a_x l'activitat de l'ió principal; $K_{x,y}^{pot}$, el coeficient de selectivitat potenciomètric de l'espècie principal x respecte l'espècie o les espècies interferents y ; a_y és l'activitat de l'ió o ions interferents y ; Z_x i Z_y són la càrrega de l'ió principal i de l'espècie o espècies interferents respectivament.

³⁷ G. Horvai, K. Tóth, E. Pungor, *Anal. Chim. Acta*, **216** (1989): 163.

➤ Caracterització dels ESI

A continuació, i seguint les recomanacions de la IUPAC,³⁸ es descriuen conceptes generals dels ESIs que en permeten la seva caracterització sistemàtica. Paràmetres com la sensibilitat, la selectivitat, el límit inferior de resposta lineal, etc., són essencials alhora de descriure tant el comportament com les possibles aplicacions posteriors.

❖ Corba de calibratge

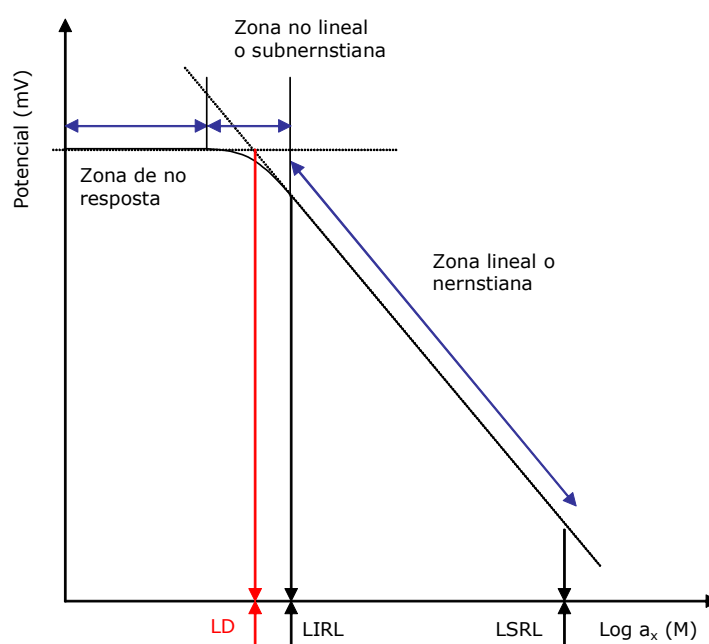


Figura 1.2. Corba de calibratge i paràmetres clau en la caracterització d'un ESI d'anions. Per a un ESI de cations el pendent seria positiu

L'obtenció d'una corba de calibratge és un requisit bàsic en el procés de caracterització i avaluació de la resposta potenciomètrica. A la figura 1.2 es representa una típica corba de calibratge per a anions on es distingeixen tres zones (color blau). En primer lloc la zona de no resposta on l'activitat de l'ió d'interès està per sota del límit de detecció. A continuació la zona no lineal o subnernstiana que va des de la mínima resposta potenciomètrica que es distingeix del soroll instrumental, fins al límit inferior de resposta lineal, **LIRL**. Després hi ha la zona lineal o nernstiana, a on les diferents mesures experimentals segueixen el que estableix la llei de Nernst

³⁸ D. Burns, K. Danzer, A. Townshend, *I.U.P.A.C Recommendations for the use of the term recovery in analytical procedures* (2001).

❖ Tractaments matemàtics emprats: ajust lineal i ajust no lineal

Una part fonamental en el procés analític és el tractament de les dades obtingudes que consisteix, bàsicament, a ajustar una funció matemàtica amb els resultats experimentals recolzant-se en un model teòric. L'ajust lineal i l'ajust no lineal³⁹ són els dos models matemàtics utilitzats a l'hora de correlacionar les variables.

La zona lineal es descriu mitjançant l'equació de Nernst (equació I-1) descrita anteriorment. s correspon a la sensibilitat del dispositiu el qual pren un valor teòric de $\pm 59,16$ mV/dècada per a espècies monovalents (a 25 °C de temperatura) i de $\pm 29,58$ mV/dècada per a espècies divalents en les mateixes condicions de temperatura. Així, valors de sensibilitat experimental propers al teòric permeten, a priori, assumir un correcte funcionament del sistema sensor estudiat.

L'interval lineal està delimitat pel límit inferior de resposta lineal i el límit superior de resposta lineal. Aquests límits corresponen als dos últims valors experimentals lineals (zona de baixa activitat iònica, LIRL i zona d'alta activitat iònica, LSRL) que segueixen la linealitat per un criteri r preestablert (normalment $r \geq 0,996$). Hara *et al.*⁴⁰ va descriure en els seus estudis la metodologia emprada en l'ajust lineal. Aquesta metodologia consisteix en un procés d'eliminació progressiu de punts de la zona subnernstiana fins a aconseguir un ajust a la zona lineal que compleixi el criteri r definit.

Una mancança important del primer ajust és el fet de menysprear la zona subnernstiana tot i tenir una resposta potenciomètrica apreciable. Amb la finalitat de descriure tota la corba de calibratge es fa servir un ajust no lineal en què s'utilitza l'expressió de Nikolskii-Eisenman descrita en l'equació (I-6) a fi d'ajustar les dades experimentals.

Cal, però, des d'un punt de vista teòric, introduir a l'equació I-7 un terme c i que permet fer l'ajust no lineal tant en absència d'interferències (si fos possible) com en presència d'aquestes.

$$E = E^o + s \cdot \log(a_x + c) \qquad c = LD_{ap} + \sum K_{x,y}^{pot} \cdot (a_y)^{\frac{n_x}{n_y}} \qquad (I-7)$$

El paràmetre c introduït en l'equació correspon al punt de curvatura de la corba de calibratge. Aquest es descriu mitjançant l'equació I-7 i es desglossa en dos termes, el límit de detecció aparent (LD_{ap}) i els termes corresponents als efectes interferents (amb els coeficients de selectivitat). El límit de detecció aparent correspon a quan no hi ha

³⁹ P. Kane, D. Diamond, *Talanta*, **44** (1997): 1847

⁴⁰ H. Hara, K. Takahashi, H. Ohkubo, *Anal Chim. Acta*, **290** (1994): 329.

interferències en el medi i és una constant empírica (no coincideix amb el límit de detecció descrit per la IUPAC), i els termes corresponents als efectes interferents a quan en el medi hi ha interferències que afecten la resposta de l'elèctrode vers l'ió principal.

En presència d'un fons iònic potencialment interferent es pot simplificar l'expressió I-7, ja que es fa el supòsit de $LD_{ap} \leq \sum K_{x,y}^{pot} \cdot (a_y)^{\frac{n_x}{n_y}}$. Aquest fet, permet treballar amb l'equació de Nikolskii-Eisenman on es menysprea el límit de detecció aparent a l'hora de fer l'ajust no lineal en el càlcul de les interferències. En absència d'un fons interferent, el terme c dóna idea sobre el límit de detecció inherent al dispositiu.

❖ Límit de detecció

El límit de detecció es defineix des d'un punt de vista pràctic com l'activitat corresponent al punt d'intersecció entre dues rectes. La primera recta s'obté de l'extrapolació de l'interval lineal de la corba de calibratge i la segona és l'extrapolació de la recta horitzontal, que s'obté en la zona de no resposta en la qual el potencial és independent de l'activitat de l'analit.⁴¹

❖ Coeficient de selectivitat potenciomètrica

Un paràmetre clau en la caracterització dels sensors potenciomètrics és el coeficient de selectivitat, $K_{x,y}^{pot}$, que, com ja s'ha comentat anteriorment, permet determinar la influència dels diferents ions interferents en la resposta potenciomètrica. Els valors trobats permeten predir la viabilitat i l'aplicació final dels dispositius.

En la literatura s'observen valors de coeficients de selectivitat discrepants per al mateix sistema potenciomètric. En variar les condicions experimentals, tant pel que fa a l'activitat de l'ió principal com de l'interferent, o a les metodologies de càlcul emprades,^{42,43,44} s'obtenen valors diferents del coeficient de selectivitat potenciomètrica. Aquest fet suggereix que el coeficient de selectivitat és influït per molts factors difícils de controlar ja que el seu valor depèn de les condicions de treball en què es determina.

⁴¹ IUPAC., *Compendium of analytical Nomenclature, Definitive Rules*, 1997. Oxford, Pergamon Press.

⁴² Y. Umezawa, K. Umezawa, H. Sato, *Pure. Appl. Chem.*, **67** (1995): 507.

⁴³ E. Bakker, *Electroanal.*, **9** (1997): 7.

⁴⁴ E. Bakker, R. Meruva, E. Prestsch, M. Meyerhoff, *Anal. Chem.*, **66** (1994): 3021.

Seguint les especificacions de la IUPAC existeixen dues metodologies, clarament diferenciades, per determinar el coeficient de selectivitat potenciomètrica: els mètodes de les solucions mesclades i els mètodes de les solucions separades.⁴⁵

Mètodes de les solucions mesclades

En aquest grup s'engloben els mètodes recomanats, ja que permeten reproduir amb força més exactitud les condicions d'un entorn real. La metodologia emprada en aquesta tesi és la que es descriu a continuació:

- *Mètode de la interferència fixa (FIM)*

L'experiència es du a terme com si fos un calibratge normal (afegint quantitats conegudes d'ió principal a una solució base), però en aquest cas la solució inicial ha de contenir l'ió interferent a una concentració constant al llarg de tota l'experiència. Així s'obtenen parelles de resultats (a_x, E) en un medi a_y , a on a_x i a_y són les activitats de l'ió principal i interferent respectivament. Els valors de potencial mesurats es representen vers el logaritme de l'activitat de l'ió principal. La intersecció entre les dues rectes extrapolades, anàlogament al càlcul del límit de detecció, permet obtenir l'activitat de a_x , i que, juntament amb l'equació I-10 permet extreure el valor del coeficient de selectivitat.

$$K_{x,y}^{pot} = a_x / (a_y)^{\frac{z_x}{z_y}}, \quad (I-10)^*$$

*On les càrregues z_x i z_y tenen el mateix signe, positiu o negatiu.

❖ Temps de resposta

Un paràmetre que adquireix especial rellevància en funció de l'aplicació final del dispositiu és el temps de resposta. Estrictament parlant, el temps de resposta hauria de ser el temps necessari per assolir una mesura de potencial estable de l'elèctrode. No obstant això, aquest interval de temps és freqüentment llarg i difícil de jutjar. De manera anàloga al cas del límit de detecció es proposen diferents definicions pràctiques, la més comuna i acceptada per la IUPAC⁴⁶ és "l'interval de temps des del moment en què l'ESI, en conjunció amb l'elèctrode de referència, entra en contacte amb una solució estàndard, o el moment en què es produeix un canvi sobtat en la concentració, fins al moment on el

⁴⁵ Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, *Pure. Appl. Chem.*, **72** (2000): 1851.

⁴⁶ E. Lindler, K. Tóth, E. Pungor, *Pure. Appl. Chem.*, **58** (1986): 469.

potencial de mesura li falta 1 mV per arribar al valor definitiu". Cal destacar, però, un inconvenient important en aquesta aproximació, ja que l'error relatiu causat per l'increment d'un mil·livolt és diferent per als intervals d'activitats dispers. Així, Fleet i Ryan⁴⁷ suggereixen que el temps de resposta és l'interval de temps necessari per assolir el 95 % del potencial estable.

Ateses les diferències existents tant en els mètodes utilitzats com en les condicions experimentals emprades és difícil comparar les dades disponibles pertanyents al temps de resposta dels ESI. En els treballs experimentals, quan es subministra el temps de resposta, s'han d'especificar condicions operacionals com la velocitat d'agitació, la temperatura, la composició de la solució abans i després de la mesura, el pretractament de l'elèctrode, etc. L'ESI, junt amb l'elèctrode de referència, es submergeix a la solució test i s'enregistra la relació potencial vers temps fins a obtenir un potencial estable. Llavors, es varia l'activitat de l'ió principal i el canvi de potencial de l'elèctrode segueix fins a obtenir un nou potencial estable. Amb aquest mètode es poden determinar els temps de resposta recomanat per la IUPAC o el corresponent al 95 % dels temps de resposta.

❖ Temps de vida

També és important el temps de vida del dispositiu. Aquest, generalment, es defineix com el temps que transcorre perquè el valor de sensibilitat⁴⁸ es redueixi a més del 20 % del seu valor inicial. Cal però, fer alguns comentaris respecte d'aquesta definició. El fet d'aquesta reducció en la sensibilitat (cas dels ESI de membrana polimèrica) es deu, principalment, a la pèrdua progressiva dels elements de reconeixement de la membrana, ja que lixivien cap al medi aquós en què estan en contacte. Aquesta reducció de la sensibilitat i, per tant, la reducció del temps de vida augmenta en condicions dràstiques de matriu, en l'ús perllongat del dispositiu, en funció de les condicions de conservació del elèctrodes.

1.1.3 EVOLUCIÓ HISTÒRICA DELS ESIS FINS L'ACTUALITAT

L'any 1897, Nerst fou el primer en emprar la potenciometria per mesurar l'acidesa d'una solució mitjançant un elèctrode d'hidrogen.⁴⁹ No obstant això, degut a la poca robustesa del sensor, en els darrers anys del segle XIX es van assajar altres mètodes per a determinar el pH.⁵⁰ Com a resultat d'aquests primers estudis⁵¹ es va presentar, l'any 1909, l'elèctrode

⁴⁷ B. Fleet, T. Ryan, M. Brand, *Anal. Chem.*, **46** (1974): 12.

⁴⁸ D. Amman, *Ion-Selective Microelectrodes*, Estats Units d'Amèrica: Springer-Verlag, 1986. Capítol III.

⁴⁹ W. Nerst. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **30** (1897): 1547.

⁵⁰ J. Ruzicka, *J. Chem. Edu.*, **74** (1997): 167.

⁵¹ M. Cremer, *Z. Biol.*, **47** (1906): 562.

selectiu d'ions hidrogen amb membrana de vidre.⁵² Aquest fou el primer elèctrode selectiu d'ions desenvolupat i curiosament és, encara en els nostres dies, el que presenta millors característiques de resposta i el més àmpliament utilitzat. A partir d'aquí, les investigacions s'encaminaren a aconseguir membranes més primes i models que expliquessin els seus mecanismes de resposta.^{53,54} Nikolskii i Tolmacheva⁵⁵ van desenvolupar la teoria del bescanvi d'ions en l'elèctrode de vidre que va permetre explicar la interferència deguda a l'ió sodi, especialment en membranes de vidre de certes composicions.⁵⁶ Després de molts intents i amb la finalitat d'obtenir elèctrodes de membrana basats en diferents materials cristal·lins, Pungor i Hallós-Rokosinyi⁵⁷ van construir l'any 1961 el primer elèctrode selectiu d'ions amb membrana heterogènia que contenia un precipitat d'halur de plata.

Les membranes líquides amb bescanviadors d'ions (ionòfors) dissolts van ser utilitzats per primera vegada per Sollner i Shean.⁵⁸ Però no va ser fins el 1967 que Ross⁵⁹ va inventar un nou concepte de membranes per elèctrodes, les *membranes líquides* aplicades a un elèctrode selectiu de calci. Aquest fou el primer elèctrode selectiu d'ions de configuració similar als d'avui en dia. Posteriors col·laboracions amb Frant⁶⁰ per construir un elèctrode de fluorur van ser seguits de nombrosos treballs de diferents autors per desenvolupar altres elèctrodes, així com despertar l'interès de la indústria i del camp clínic per a àmplies possibilitats d'aplicacions. Cap als anys 70 va començar la competència entre noves companyies (Corning, Beckman, Radiometer, Philips), que comportà nombroses patents.⁵⁰

Els treballs posteriors de Simon i Stefanec⁶¹ i Moore i Pressman⁶² van donar lloc al desenvolupament d'un nou grup de lligands electroactius anomenats portadors neutres. Aquests estan basats en compostos ionofòrics (antibiòtics com la nonactina i la valinomicina) (figura 1.3), dels quals es sabia que facilitaven el transport d'ions alcalins a través de membranes cel·lulars lipídiques. L'elèctrode de potassi basat en la valinomicina⁶³ és àmpliament emprat en analitzadors clínics.

⁵² F. Haber, Z. Klemensiewicz, *Phys. Chem.*, **67** (1909): 385.

⁵³ E. Bauer, S. Kronman, *Phys. Chem.*, **92** (1917): 819.

⁵⁴ R. Beutner, *Elektrochemie*, **24** (1918): 94.

⁵⁵ B.P. Nikolskii, T.A. Tolmacheva, *Zh. Fiz. Khim.*, **10** (1937): 504.

⁵⁶ B. Lengyel, E. Blum, *Trans. Faraday Soc.*, **30** (1934): 461

⁵⁷ E. Pungor, E. Hallós-Rokosinyi, *Anal. Chim. Hung.*, **27** (1961): 63.

⁵⁸ K. Sollner, G.M. Shean, *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964): 1901.

⁵⁹ J. Ross, *Science*, **156** (1967): 1378.

⁶⁰ M. Frant, J.W. Ross, *Science*, **154** (1965): 1553.

⁶¹ Z. Stefanec, W. Simon, *Microchem.*, **12** (1967): 125.

⁶² D. Ammann. *Ion-Selective Microelectrodes*, Springer-Verlag, Berlin (1986). Cap. 3.

⁶³ M.S. Frant, J.W. Ross, *Science*, **167** (1970): 987.

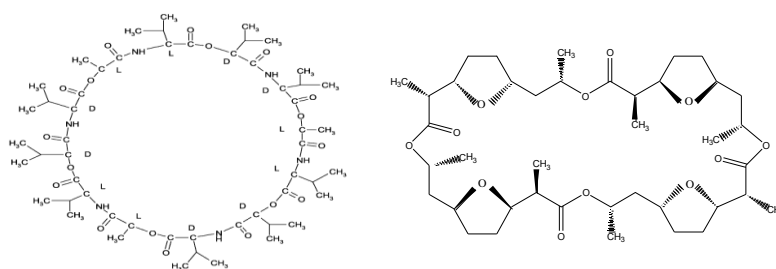


Figura 1.3. Estructures de dos dels antibiòtics més emprats com a ionòfors en els ESIs. D'esquerra a dreta, la valinomicina i la nonactina, per als ESIs selectius de K^+ i NH_4^+ respectivament.

Amb la finalitat de desenvolupar elèctrodes de configuracions més robustes, es van fer elèctrodes amb contacte intern sòlid (*all-solid-state*) amb el que es dota de major robustesa i estabilitat mecànica al dispositiu. El 1971, Cattrall i Freiser⁶⁴ van construir un ESI basat en un fil de platí que, recobert amb una membrana de PVC (*coated-wire electrodes*), substituïa la solució de referència interna líquida. El sòlid conductor actua com a suport físic i contacte intern, mentre que el recobriment de PVC, que conté l'ionòfor, realitza la funció de membrana polimèrica que genera un senyal selectiu. Malgrat la versatilitat, i el baix nivell de manteniment d'aquests elèctrodes, existeixen alguns problemes com són les derives del senyal, possibles desadsorcions de la membrana i la necessitat de calibratges periòdics.

Cap a principis dels anys 80, Lima i Machado⁶⁵ utilitzaren una resina conductora d'epoxi i plata com a suport físic i conductor elèctric de la membrana sensora. És a partir d'una col·laboració amb aquests autors, que neix en el Grup de Sensors i Biosensors, el primer treball de desenvolupament d'ESIs amb referència interna sòlida constituïda per una resina epoxi-grafit,⁶⁶ la versatilitat de construcció de la qual permet treballar amb una configuració tubular en sistemes dinàmics de flux continu.

El desenvolupament de membranes selectives d'ions amb configuracions especials va ser molt important per al desenvolupament d'altres tipus de sensors. Així l'any 1969 Guibault proposà un nou elèctrode selectiu enzimàtic fet que va inspirar tota una futura generació de biosensors enzimàtics. Thomas⁶⁷ presenta una interessant revisió sobre aquests sensors.

Un altre avenç en el camp dels ESIs fou resultat de la recerca encaminada al desenvolupament de dispositius miniaturitzats, que permetessin una producció massiva mitjançant tècniques de microfabricació i presentessin una alta compatibilitat per mesures *in vivo*. Amb aquesta finalitat apareixen els transistors d'efecte de camp sensibles a ions

⁶⁴ R.W. Cattrall, H. Freiser, *Anal. Chem.*, **43** (1971): 1905.

⁶⁵ J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado. *IV Reuniao Nacional de Electroquimica*. Braga (Portugal) (1983) C30.4.

⁶⁶ S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, *Anal. Chim. Acta*, **164** (1984): 147.

⁶⁷ J.D.R. Thomas, *Analyst*, **119** (1994): 203.

(ISFETs).⁶⁸ Un important avantatge és la seva mida reduïda (de l'ordre de mm) que resulta idoni per a aplicacions en volums petits de mostra (anàlisi clínica o biomedicina) i per aplicacions *in situ* (indústria de l'automòbil, domòtica o control ambiental).^{69,70,71} La seva fabricació massiva permet abaratir els costos i per tant, pensar en la filosofia de sensor d'un sol ús, aspecte important en camps com la biomedicina. L'inconvenient d'aquests sensors, però, és l'alt cost inicial de la infraestructura requerida per la seva fabricació.^{72,73,74,75}

En la dècada dels anys 70 i 80, es va produir una allau de resultats degut al gran nombre de grups de recerca⁷⁶ que treballaven en aquest camp. Però, a principis dels anys 90, la potenciometria havia arribat a un punt mort, els científics s'estancaren, tal i com es pot veure reflectit en la figura 1.4 en el nombre de publicacions, ja que semblava impossible continuar avançant en el camp dels ESIs. En retrospectiva, és evident que existien algunes inconsistències que no s'havien resolt, i que només gràcies a la seva investigació minuciosa, ha fet possible uns avenços inesperats durant la darrera dècada. La millora extraordinària dels límits de detecció i dels coeficients de selectivitat dels ESIs ha esdevingut una autèntica revolució en el món de la potenciometria. Aquestes millores tan significatives s'han produït gràcies al control dels fluxos d'ions de la membrana.^{77,78} Fa tan sols 10 anys era impensable emprar un elèctrode per mesurar concentracions inferiors a 10^{-6} M i els coeficients de selectivitat eren de l'ordre de 10^{-4} - 10^{-5} . Actualment, ja trobem ESIs amb LD en el rang de 10^{-8} - 10^{-11} per alguns ions, i coeficients de selectivitat per sota de 10^{-10} .⁷⁹ La capacitat de mesurar a nivell de traça, obre una porta a l'aplicació dels ESIs en camps on fins ara els havia estat negada.⁸⁰

⁶⁸ S.D. Moss, J. Janata, C.C. Johnson, *Anal. Chem.*, **47** (1975): 2238.

⁶⁹ P. Bergveld, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-**17** (1970): 70.

⁷⁰ P. Bergveld. *Sens. Actuators B*, **1** (1981): 17.

⁷¹ S. Alegret, J. Bartrolí, C. Jiménez, M. Valle, C. Domínguez, E. Cabruja, A. Merlos. *Electroanal.*, **3** (1991): 355.

⁷² J. Janata, R.J. Ruber. *Solid State Chemical Sensors*, Academic Press, Orlando, 1985.

⁷³ R.P. Buck, E. Hackleman. *Anal. Chem.*, **49** (1977): 2315.

⁷⁴ S.D. Moss, J. Janata, C.C. Johnson. *Anal. Chem.*, **47** (1975): 2238.

⁷⁵ T. Matsuo, K.D. Wise. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* BME-**21** (1974): 485.

⁷⁶ E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.*, **97** (1997): 3083.

⁷⁷ T. Sokalski, T. Zwickl, E. Bakker, E. Pretsch, *Anal. Chem.*, **71** (1999): 1204.

⁷⁸ W.E. Morf, M. Badertscher, T. Zwickl, N.F. de Rooij, E. Pretsch, *J. Phys. Chem. B*, **103** (1999): 11346.

⁷⁹ E. Bakker, E. Pretsch, *Trends Anal. Chem.*, **24** (2005): 199.

⁸⁰ A. Ceresa, E. Bakker, B. Hattendorf, D. Günter, E. Pretsch, *Anal. Chem.*, **72** (2001): 343.

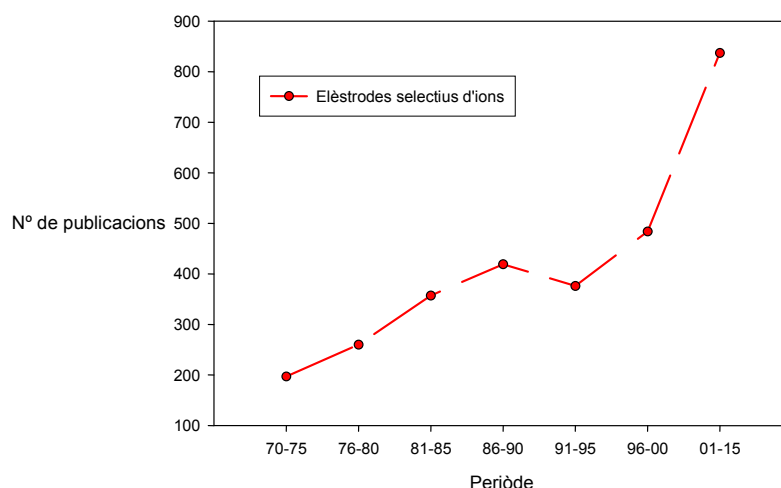







Figura 1.4. Evolució del nombre de publicacions sobre ESIs entre el 1970 i l'actualitat

Avui en dia, existeixen ESIs comercials selectius a més de 50 ions diferents,⁸¹ i els microelèctrodes són pioners en les mesures *in vivo*. L'impacte comercial dels ESIs també ha estat espectacular, al ser la potenciometria la tècnica estàndard per a l'anàlisi clínica d'ions com el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , i Cl^- . Hi ha més de 10 empreses en el món dedicades a la venda exclusiva d'analitzadors d'ions en sang amb detectors potenciomètrics. Alguns exemples els podem veure a la taula 1.3.

Taula 1.3. Analitzadors d'ions comercials

| Beckman Elise 3 | Bayer/Ciba-Corning 614 | Medica Easylyte CL/Li | AVL 984 | Radiometer EML 105 |
|--|---|---|--|---|
| Na^+ , K^+ , Cl^- , tCO_2 , Ca^{2+} , Li^+ | Na^+ , K^+ | Na^+ , K^+ , Cl^- , Li^+ | Na^+ , K^+ , Ca^{2+} | K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Glu, Lac |
|  |  |  |  |  |

⁸¹ P. Bühlmann, E. Pretsch, E. Bakker, *Chem. Rev.*, **98** (1998): 1593.

1.2 POLÍMERS

Fa més de setanta-cinc anys que els químics treballen intensament en la Química dels polímers, però ja fa més de cinc segles algunes tribus indígenes ja empraven els polímers naturals sense saber-ho. S'untaven els peus amb la resina del cautxú, la deixaven polimeritzar i els servia de protecció per a la planta del peu. Així, al llarg de la història, els polímers naturals com la llana, la seda, la cel·lulosa s'han emprat extensament i han tingut molta importància. No obstant això, fins a finals del segle XIX no van aparèixer els primers polímers sintètics obtinguts a través de transformacions de polímers naturals. El primer polímer totalment sintètic es va obtenir al 1909, quan el químic belga Hendrik Baekeland fabricà la baquelita a partir de formaldehid i fenol.

Al 1922, el químic alemany Hermann Staudinger començà a estudiar els polímers i no va ser fins al 1926 on exposà la seva hipòtesi, on els defineix com a llargues cadenes d'unitats petites unides per enllaços covalents, proposant les fórmules estructurals del poliestirè i del polioximetilè, tal i com les coneixem actualment. Un altre químic que va contribuir al desenvolupament de la química de polímers va ser Wallace Carothers, treballador de l'empresa DuPont des del 1928, que va sintetitzar un gran nombre de nous polímers: polièsters, poliamides, neoprè, etc. Però no ha estat fins a la segona meitat del segle XX que hi ha hagut una autèntica revolució en el desenvolupament de nous mètodes d'obtenció de polímers i de llurs aplicacions.

Els polímers es defineixen com a substàncies macromoleculares (10.000-100.000 dalton) constituïdes per més de 1.000 unitats monomèriques a on la polimerització dels monòmers es produeix gràcies a una substància iniciadora o a un canvi provocat per algun paràmetre físic (llum, pressió, temperatura). Hi ha diferents classificacions de polímers (en funció de l'origen del monòmer, de la composició química, del procés de polimerització, del seu comportament davant les temperatures elevades, etc.) tal i com podem veure a la taula 1.4. Les propietats dels materials polimèrics depenen fonamentalment de la seva estructura química, pes molecular i conformació macromolecular.

Taula 1.4. Classificació dels polímers

| | | |
|-------------------|----------------|--|
| Segons l'origen | Naturals | Són les macromolècules polimèriques que formen els éssers vius són: proteïnes, àcids nucleics, i polisacàrids com la cel·lulosa, el cautxú i la lignina. |
| | Semi sintètics | S'obtenen per transformació dels polímers naturals. Ex: la nitrocel·lulosa i el cautxú vulcanitzat. |
| | Sintètics | Obtinguts industrialment a partir de monòmers. Ex: el niló, el poliestirè, el polietilè, el policlorur de vinil, etc. |
| Segons el monòmer | Homopolímers | La polimerització s'ha produït a partir d'un sol tipus de monòmer. Ex: el poliestirè que prové només del monòmer estirè. |

| | | |
|--|----------------------|--|
| | Copolímers | Si la polimerització s'ha produït a partir de més d'un monòmer. |
| Segons els mecanismes de polimerització | de condensació | La reacció de polimerització implica que a cada pas es formi una molècula de baix pes molecular, per exemple aigua. |
| | d'addició | La polimerització no implica l'alliberació de cap compost de baix pes molecular. |
| Segons la composició química | Orgànics Vínilics | La cadena principal està formada per monòmers d'àtoms de carboni amb un doble enllaç: <ul style="list-style-type: none"> • Poliolefines, formades mitjançant la polimerització d'olefines. Ex: polietilè i polipropilè. • Polímers estirènics, formats a partir del monòmer estirè. Ex: poliestirè. • Polímers vínlics halogenats, que inclouen àtoms d'halògens (clor, fluor...) en la seva composició. Ex: policlorur de vinil. • Polímers acrílics. Ex: PMMA, Polimetilmetacrilat |
| | Inorgànics | Basats en òxids com el SiO ₂ , el ZrO ₂ , els polifosfats, els poliborats. No contenen àtoms de carboni en la seva estructura. |
| | Híbrids | Basats en una combinació de polímers orgànics i inorgànics. Per ex: les silicones |
| | | |
| Segons les aplicacions | Elastòmers | Són materials amb molt baix mòdul d'elasticitat i alta extensibilitat; és a dir, es deformen molt al sotmetre'ls a un esforç però recuperen la seva forma inicial a l'eliminar l'esforç. En cada cicle d'extensió i contracció els elastòmers absorbeixen energia. |
| | Plàstics | Són aquells polímers que, davant un esforç suficientment intens, es deformen irreversiblement, no podent tornar a la seva forma original. Cal ressaltar que el terme plàstic s'aplica a vegades incorrectament per a referir-se a la totalitat dels polímers. |
| | Fibres | Presenten alt mòdul d'elasticitat i baixa extensibilitat, el que permet confeccionar teixits les dimensions dels quals romanen estables. |
| | Recobriments | Són substàncies, normalment líquides, que s'adhereixen a la superfície d'altres materials per a donar-los propietats com resistència a l'abradió. |
| | Adhesius | Són substàncies que combinen una alta adhesió i una alta cohesió, el que els permet unir dues o més cossos per contacte superficial. |
| Segons el comportament davant la temperatura | Termoplàstics | Flueixen (passen a estat líquid) a l'escalfar-se i es tornen a endurir (tornen a l'estat sòlid) en refredar-se. La seva estructura molecular presenta pocs o cap entrecreuament. Ex: polietilè, polipropilè, policlorur de vinil (PVC). |
| | Termoestables | No flueixen, i en l'escalfar-se enlloc de fluir es descomponen químicament. Aquest comportament és degut a una estructura amb molts entrecreuaments, que impedeixen els desplaçaments relatius de les molècules. |

1.2.1 POLÍMERS I SENSORS QUÍMICS

El món de la química dels polímers és molt complex ja que no existeix una relació directa entre la composició del polímer i les seves propietats físico-químiques. Per exemple, el cautxú i la gutaperxa són dos polímers amb la mateixa estructura química i pes molecular, cadenes de moltes unitats d'un hidrocarbur elàstic, l'isoprè (C_5H_8). A diferència del cautxú, que és un isòmer *Cis*, la gutaperxa és molt menys elàstica degut a la seva isomeria *trans*.

La constitució dels polímers, formats per unitats químiques de molt diversa naturalesa i connectades entre si donant lloc a espècies macromoleculares simples o complexes, genera una infinitat de variacions en la seva estructura química i, és per tant, el que permet la preparació de materials amb una àmplia gamma de propietats físiques, químiques i mecàniques. L'estudi de la síntesi i propietats de nous i sofisticats materials està en plena expansió, encara que els polímers convencionals continuen éssent objecte d'investigacions molt concretes dirigides fonamentalment a la millora de les seves propietats, així com a modificacions que permetin l'ampliació del seu camp d'aplicacions.

Actualment els polímers tenen un ampli rang d'aplicació en tot tipus de mercats, que abarquen des del camp mèdic, la mecànica, la construcció, la indústria tèxtil, les pintures, joguines, etc. A més en els darrers 20 anys, s'ha desenvolupat una gran varietat de sensors químics i biosensors basats en tota mena de polímers. Una revisió bibliogràfica demostra que especialment en els darrers 15 anys hi ha hagut un avenç gegantí en l'aplicació de polímers en el món dels sensors químics. Això és degut a què les seves propietats físiques i químiques, es poden adaptar a les necessitats concretes de cada aplicació. A la figura 1.5, podem veure l'evolució de l'ús de polímers en els sensors (en funció del tipus de dispositiu) i el salt espectacular a partir de l'any 2001.

Una característica fonamental dels polímers és la temperatura de transició vítria (*glass transition temperature*, T_g), que es defineix com la temperatura a partir de la qual un polímer amorf passa de l'estat vítri a l'estat elàstic, aconseguint-se membranes més flexibles.⁸²

Atesa la simplicitat de preparació, i les propietats que mostren les membranes polimèriques, són la línia principal d'investigació de molts grups de recerca. És important ressaltar la importància de les membranes per a sensors de membrana líquida construïdes amb polímers basats en PVC.

⁸² M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer A.P., (1991)

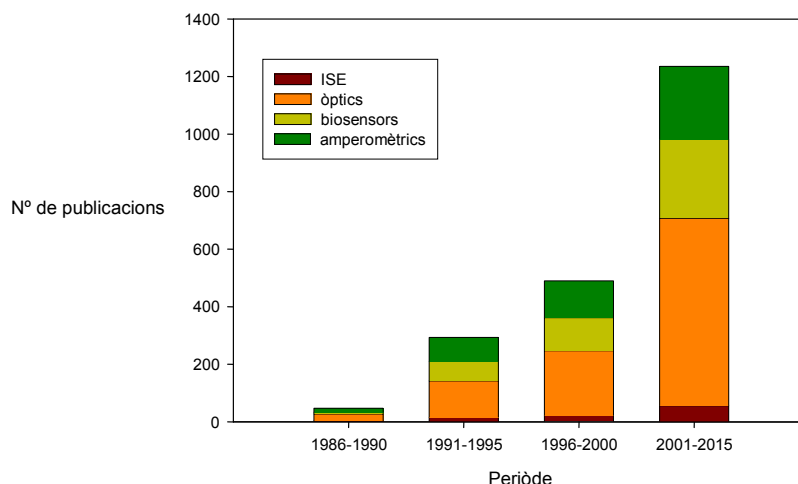


Figura 1.5. Evolució del nombre de publicacions de l'ús dels polímers en els sensors químics des de la dècada dels 80 fins a l'actualitat.

1.2.1.1 El PVC

El policlorur de vinil (PVC) ha estat àmpliament utilitzat des dels primers treballs del grup de *Moody et al.*, com a matriu suport de membranes líquides en elèctrodes selectius d'ions (ESIs). La simplicitat que presenta la mescla de PVC en pols i un plastificant amb l'ajut d'un solvent orgànic (p.ex. THF), afegida a la poca instrumentació requerida per a la posterior deposició de la membrana, representa una metodologia assumible per a la majoria de laboratoris. No obstant això, la utilització d'aquest tipus de polímers no permet ajustar les propietats del material final per tal de millorar l'adherència i la hidrofilitat de la membrana. A més, l'adherència de la membrana sobre el transductor és només física, i ateses les característiques inerts del PVC, es fa difícil la seva funcionalització per tal d'aconseguir una fixació química sobre el transductor. Un altre fenomen limitant d'aquest polímer, és el llarg temps d'evaporació del dissolvent per a la coagulació de la membrana que requereix, entre 2 i 3 hores. Però, una de les principals limitacions d'aquest polímer és que la incorporació de material biològic no es fàcil degut a l'ús de dissolvents orgànics (normalment tetrahidrofurà), en els quals les proteïnes (enzimes, anticossos) no es dissolen bé i s'alteren les seves propietats, fet que impossibilita l'ús del PVC per a la construcció de biosensors potenciomètrics.

A més, degut a la seva elevada temperatura de transició vítria (T_g 80°C), és imprescindible l'addició d'un solvent mediador i alhora plastificant que a més de proporcionar unes òptimes propietats físiques i químiques a la membrana, assegura la solubilitat i mobilitat dels components electroactius dins d'aquesta. Precisament, una de les limitacions associades a l'ús del PVC és l'exudació del plastificant juntament amb altres components

de la membrana. Aquest inconvenient provoca una disminució del temps de vida del sensor, respostes inestables, i contaminació de la mostra.^{83,84} Per altra banda, la reducció del percentatge de plastificant en la membrana pot disminuir la solubilitat de l'ionòfor dins d'aquesta, provocant una disminució de la sensibilitat i la selectivitat.⁸⁴ En mesures *in-vivo* on la biocompatibilitat és essencial, la lixiviació del plastificant pot induir a una resposta de rebuig.⁸⁵ Evidentment tots aquests efectes són encara més negatius, en el camp dels sensors miniaturitzats.^{86,87}

Al llarg dels darrers 25 anys, s'han avaluat un important nombre de polímers com a potencials matrius polimèriques per a ESIs.⁸⁴ Molts d'aquests polímers son inadequats per la incompatibilitat amb alguns solvents mediadors que han estat emprats com a plastificants en les membranes de PVC.^{88,89} Per tant, atesos els inconvenients produïts per la presència del plastificant, hi ha hagut un interès en el camp dels sensors químics per desenvolupar noves matrius de polímers que no el necessitin (membranes *self plasticizer*). És el cas dels poliuretans,^{90,91,92,93} els polisiloxans,^{84,94} la goma de silicona,^{95,96,97} els politiofens,⁹⁸ els poliacrils,⁸³ els epoxiacrils,⁹⁹ i els copolímers de metacril-acrilat.^{100,101,102,103} A la taula 1.5, podem veure alguns d'aquests polímers amb les seves estructures químiques.

⁸³ S. Peper, I. Tsagakatakis, E. Bakker, *Anal. Chim. Acta*, **442** (2001): 25.

⁸⁴ D.N. Reinhoud, J.F.J. Engebensen, Z. Brzozka, *Anal. Chem.*, **66** (1994): 3618.

⁸⁵ E. Lindner, V.V. Cosofrer, S. Ufer, T.A. Johnson, R.B. Ash, H.T. Nagle, M.R. Neuman, R.P. Buck, *Fres. J. Anal. Chem.*, **346** (1993): 584.

⁸⁶ I. Tsagakatakis, S. Peper, E. Bakker, *Anal. Chem.*, **73** (2001): 315.

⁸⁷ M. Brasuel, R. Kopelman, T.J. Miller, R. Tjalkens, M.A. Gilbert, *Anal. Chem.*, **73** (2001): 2221.

⁸⁸ Plasticizer Technology (Ed.:P. F. Bruins), Reinhold Publishing Corp., New York 1965.

⁸⁹ S.R. Sandler, W. Karo, *Polymer Síntesis*. Academic Press, San Diego, CA 1992.

⁹⁰ S.Y. Yun, Y.K. Hong, B.K. Oh, G.S. Cha, H. Nam, S.B. Lee, J.I. Jin, *Anal. Chem.*, **69** (1997): 868.

⁹¹ U. Fiedler, J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta*, **67** (1973): 179.

⁹² D. Liu, M.E. Meyerhoff, *Anal. Chim. Acta*, **274** (1993): 37.

⁹³ A. Bratov, N. Abramova, J. Muñoz, C. Domínguez, S. Alegret, J. Bartolí, *Anal. Chem.*, **67** (1995): 3589.

⁹⁴ G. Högg, O. Lutze, K. Cammann, *Anal. Chim. Acta*, **335** (1996): 103.

⁹⁵ M.E. Poplawski, R.B. Brown, K.L. Rho, S.Y. Yun, H.J. Lee, G.S. Cha, K.J. Phaeng, *Anal. Chim. Acta*, **355** (1997): 249.

⁹⁶ P. D. Van der Wal, M. Skowronska-Ptasinska, A. Van den Berg, P. Bergveld, E.J.R. Sudhölter, D.N. Reinhoudt, *Anal. Chim. Acta*, **231** (1990): 41.

⁹⁷ J. H. Shin, D.S. Sakong, H. Nam, G.S. Cha, *Anal. Chem.*, **68** (1996): 221.

⁹⁸ J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstan, *Anal. Chim. Acta*, **385** (1999): 195.

⁹⁹ T. Dimitrakopoulos, J.R. Farrell, P.J. Iles, *Electroanal.*, **8** (1996): 391.

¹⁰⁰ L.Y. Heng, E.A.H. Hall, *Anal. Chim. Acta*, **403** (2000): 77.

¹⁰¹ L.Y. Heng, E.A.H. Hall, *Anal. Chem.*, **72** (2000): 42.

¹⁰² L.Y. Heng, E.A.H. Hall, *Electroanal.*, **12** (2000): 187.

¹⁰³ E. Malinowska, L. Gawart, P. Parzuchowski, G. Rokicki, Z. Brzozka, *Anal. Chim. Acta*, **421** (2000): 93.

Taula 1.5. Estructures dels polímers emprats com a matrius polimèrics en ESIs.

| Nom | Fórmula |
|---------------------------|--|
| Policlorur de vinil (PVC) | $\left[\text{CH}_2 - \overset{\text{Cl}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right]_n$ |
| Poliuretà | $\left[\left(\text{CH}_2 \right)_3 \text{HN} - \overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}} - \text{O} \right]_n$ |
| Poliacrilat de metil | $\left[\text{CH}_2 - \overset{\text{O}-\text{CH}_3}{\underset{\text{C}=\text{O}}{\mid}}{\text{CH}} \right]_n$ |
| Polimetacrilat de metil | $\left[\text{CH}_2 - \overset{\text{O}-\text{CH}_3}{\underset{\text{C}=\text{O}}{\mid}}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}} \right]_n$ |
| Polisiloxà | $\begin{array}{c} \text{R} \quad \text{R} \quad \text{R} \\ \quad \quad \\ \text{---Si---O---Si---O---Si---O---} \\ \quad \quad \\ \text{R} \quad \text{R} \quad \text{R} \end{array}$ |
| Goma de silicona | $\left[\overset{\text{CH}_3}{\mid} \text{Si} - \text{O} \right]_n$ $\quad \quad \quad \mid \\ \quad \quad \quad \text{CH}_3$ |

1.2.1.2 La polisulfona

La polisulfona és un polímer que s'ha emprat habitualment com a material per a membranes de microfiltració, ultrafiltració i processos d'osmosi inversa. El desenvolupament d'aquestes membranes va aparèixer per primer cop a la dècada dels anys 60, amb l'objectiu d'oferir una alternativa a les membranes de cel·lulosa, atès que

presenten un cert caràcter selectiu que depèn directament de l'estratègia de preparació emprada. Els avantatges aportats per les membranes de polisulfona en relació a d'altres tipus de membranes es fonamenten en la seva resistència enfront de valors de pH extrems i en la seva estabilitat tèrmica. La polisulfona és soluble en dissolvents com el cloroform i la dimetilformamida i, un cop en solució, les membranes es poden aplicar fàcilment sobre diferents suports mitjançant processos convencionals d'inversió de fase. L'estabilitat química i tèrmica que presenta la polisulfona, juntament amb l'excel·lent capacitat per formar membranes, mostren aquest polímer com una bona matriu per ésser emprada en el desenvolupament de sensors i biosensors. A la figura 1.6 es mostra la fórmula d'aquest polímer.

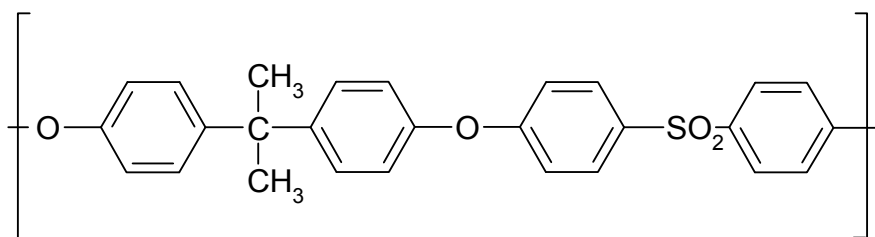


Figura 1.6. Estructura química de la polisulfona

La polisulfona ens permet dissenyar membranes “*a mida*” degut a la seva alta compatibilitat amb un gran nombre d'ionòfors, compostos orgànics i material biològic.^{104,105} Així és factible la incorporació d'enzims i proteïnes a l'interior de membranes de polisulfona, cosa que no és possible amb el PVC, ja que cal dissoldre la mescla en dissolvents com el THF, el qual provoca l'alteració de molts compostos biològics. Així, el gran avantatge de la polisulfona respecte el PVC és la seva capacitat per integrar material d'origen biològic des d'una fase aquosa, fet que ens permetrà construir biosensors compactes.

Un factor molt important a considerar és l'estratègia d'incorporació d'aquestes proteïnes dins la matriu de la membrana sensora. Aquest és un punt crític per al bon funcionament del sensor, atès que l'activitat de les espècies immobilitzades, i de forma molt important la seva possible pèrdua per dissolució, depenen fortament de la metodologia d'immobilització escollida, i del caràcter hidròfil de la matriu emprada per a la immobilització. Com a resultat de totes les característiques pròpies d'aquest polímer, la polisulfona es presenta com un material molt atractiu per a ésser emprat en el desenvolupament de nous sensors i biosensors potenciomètrics.

¹⁰⁴ B. Prieto-Simon, E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2006): 131.

¹⁰⁵ S. Sanchez, E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007): 965.

Tal i com s'ha esmentat anteriorment, la polisulfona es troba inicialment en solució (habitualment de dimetilformamida), estat en què es diposita sobre el transductor. La precipitació (coagulació de la membrana) pot tenir lloc mitjançant dos processos: l'evaporació del dissolvent o un procés d'inversió de fase. Aquesta segona opció consisteix en submergir la solució de la polisulfona en la fase orgànica, en aigua (no solvent). A continuació l'aigua penetra a l'interior de la futura membrana i desplaça la fase orgànica, però com que la polisulfona és insoluble en fase aquosa precipita (coagula).⁸² En el cas dels sensors s'adhereix a la superfície del transductor. Un dels avantatges més destacables de l'ús de polisulfona en membranes sensores és que el material de reconeixement pot estar dissolt a la fase aquosa, penetrant conjuntament amb l'aigua en el moment en què la membrana coagula. En succeir això, les macromolècules d'origen biològic queden atrapades sense perdre la seva activitat, ja que la polisulfona es manté en un entorn aquós. En funció del procediment d'inversió de fase emprat, les membranes obtingudes presentaran unes determinades característiques físiques, ja que la transferència de massa i la velocitat de separació de fases determinaran les seves propietats. En general, transferències de massa i separacions de fase lentes donen lloc a membranes denses, amb més simetria que quan aquests fenòmens tenen lloc a més velocitat. En el darrer cas, s'obtenen membranes poroses i asimètriques, i fins i tot presenten els anomenats *macrovoids*, que són espais microscòpics buits, tal i com es pot veure a la figura 1.7.

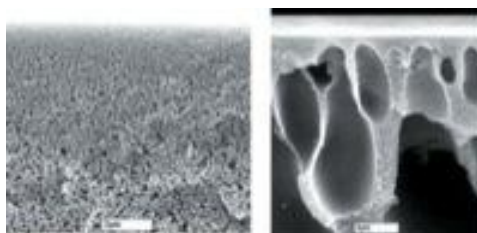


Figura 1.7. Aspecte dels macrovoids a les membranes de polisulfona

A la bibliografia, hi ha poques referències sobre les aplicacions de la polisulfona en el món dels sensors químics. Dues d'aquestes presenten un sensor òptic de fluorescència d'oxigen¹⁰⁶ on la mesura de la pèrdua de fluorescència d'una molècula (fluoròfor) immobilitzada dins la membrana es relaciona amb la concentració d'oxigen a la mostra. L'alta permeabilitat a l'oxigen, la gran resistència tèrmica i les condicions d'humitat extrema, són característiques essencials de la polisulfona que la fan ideal per treballar en processos on les condicions són extremes (per exemple en l'autoclau).¹⁰⁷ També trobem alguna referència sobre l'ús de la PS com a material sensor per mesures del percentatge d'humitat relativa¹⁰⁸ en sensors de capacítància.

¹⁰⁶ M. Florescu, A. Katerkamp, *Sens. Actuators B*, **97** (2004): 39.

¹⁰⁷ H.S. Voraberger, H. Kreimaier, K. Biebrnik, W. Kern, *Sens. Actuators B*, **74** (2001): 179

¹⁰⁸ T. Kuroiwa, T. Miyagishi, A. Ito, M. Matsuguchi, Y. Sadaoka, Y. Sakai, *Sens. Actuators B*, **24-25** (1995): 692.

Per altra banda, la demanda de membranes compactes que simplifiquen la preparació i eliminin la necessitat de capes successives genera la necessitat de buscar noves estratègies d'immobilització. Això ha portat a l'estudi de nous materials que permetin la integració simultània dels diferents components de la membrana. En el nostre grup de recerca, la polisulfona s'ha emprat amb gran èxit per la incorporació de mediadors d'oxidació-reducció, enzims, anticossos, grafit en pols, nanotubs de carboni,^{104,109,110,105,111,112} per a la construcció de biosensors amperomètrics en membranes compactes; és a dir, en una sola membrana hi ha tot el material necessari per a la transducció del senyal i el reconeixement selectiu sense necessitat de sobreposar diferents capes. Això s'ha aconseguit incorporant les espècies hidròfobes i els materials més resistents a la fase orgànica, mentre que el material biològic s'incorpora durant el procés d'inversió de fase. Aquesta tècnica ofereix una sèrie d'avantatges com el manteniment gairebé continu del material biològic, en medi aquós i a pH controlat, a més de l'estalvi d'enzim o proteïna aconseguit.

Finalment, s'ha de remarcar que l'ús de la polisulfona en elèctrodes selectius d'ions és completament nou, i per tant aquest treball marca un precedent en l'aplicació d'aquest polímer en el camp de la potenciometria, tant per a la construcció d'ESIs, com de biosensors potenciomètrics.

1.2.1.3 Polímers funcionalitzats (o carregats)

El continu desenvolupament de la indústria dels polímers, i la conseqüent aparició de nous monòmers va donar lloc a l'aplicació del concepte de funcionalització de polímers, és a dir, el procés químic mitjançant el qual s'incorporen grups funcionals reactius a una cadena polimèrica. Aquests grups funcionals confereixen reactivitats concretes enfront a diferents agents i a més introdueixen noves propietats o potencien propietats ja presents en els polímers. Des d'un punt de vista químic, un polímer funcionalitzat es pot definir, com una macromolècula a la qual s'hi enllacen grups químics funcionals ionitzables que són permeables a electròlits en fase aquosa. Les seves propietats depenen tant del grup funcional, com de la naturalesa del polímer. Els avantatges oferts pels materials funcionalitzats són múltiples, i les seves aplicacions s'han fet extensives a diverses àrees. Això fa que alguns materials inerts puguin ser funcionalitzats adequadament i ser utilitzats com a adhesius, materials biocompatibles, catalitzadors, i fins i tot, ser reciclats. A més, la introducció de grups funcionals pot servir com a punt d'ancoratge de diferents molècules orgàniques, en una varietat d'aplicacions tant d'interès biològic com en altres àrees.

¹⁰⁹ B. Prieto-Simon, E. Fàbregas, A. Hart, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007): 2663

¹¹⁰ B. Prieto-Simón, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, *Talanta*, **71** (2007): 2102

¹¹¹ S. Sanchez, M. Pumera, E. Cabruja, E. Fàbregas, *Analyst*, **132** (2007): 142

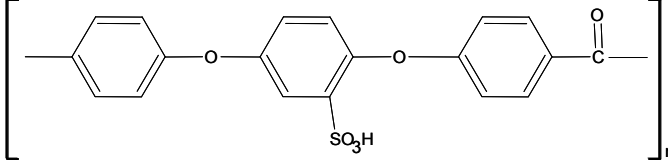
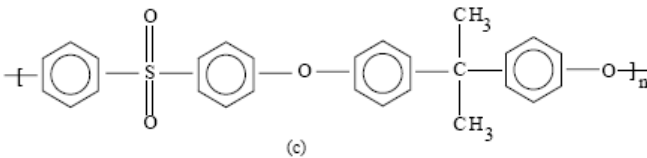
¹¹² S. Sanchez, M. Pumera, E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, **23** (2007): 332.

Alguns exemples dels polímers carregats més comuns són els perfluorosulfonats com el Nafion i polímers sulfonats d'estructura aromàtica (p.ex, polièterètercetona sulfonada, SPEEK). Amb aquests polímers es preparen les membranes d'intercanvi de protons (PEM) i les de bescanvi iònic (*ion-exchange membranes*, IEM)¹¹³, les quals són especialment atractives en la indústria química perquè el seu ús permet l'eliminació, addició, substitució o concentració d'ions en efluent industrials i aigües de procés.

Fins ara el polímer més comunament emprat en les PEM era el Nafion (producte fabricat per Dupont) però degut al seu elevat cost, s'han fet molts esforços per desenvolupar materials alternatius més barats, menys contaminats i més sostenibles.¹¹⁴ Amb aquest objectiu s'han funcionalitzat un gran nombre de materials polimèrics^{115,116} com a electròlits de membrana per a piles de combustible, com la polisulfona sulfonada (SPSF), la polietersulfona sulfonada (SPES), i el poli(èterètercetona) sulfonada (SPEEK). Les estructures químiques d'aquests polímers es mostren a la taula 1.6.

Aquest últim prové de la sulfonació de la poli(èterètercetona) (PEEK), un material termoplàstic parcialment cristal·lí, que té una combinació especial de propietats mecàniques, resistència a la temperatura i excel·lent resistència química. Ateses les seves característiques, és un material adequat per a aplicacions on es requereixen altes prestacions mecàniques sota condicions extremes de temperatura, agressivitat química i alta energia radiant. Com a conseqüència d'això és emprat en la indústria i més especialment en el sector de l'alta tecnologia com la indústria aeroespacial, nuclear, química, elèctrica i alimentària.

Taula 1.6. Estructures químiques de dos polímers sulfonats

| Nom | Fórmula |
|--|--|
| Poli(èterètercetona) sulfonada (SPEEK) |  |
| Polietersulfona sulfonada (SPES) |  |

¹¹³ T. Xu, *J. Membrane. Sci.*, **263** (2005): 1.

¹¹⁴ K.D. Kreuer, *J. Membrane. Sci.*, **185** (2001): 29.

¹¹⁵ M. Rikukawa, K. Sanui, *Prog. Polym. Sci.*, **25** (2000): 1463.

¹¹⁶ M. Kawahara, M. Rikukawa, K. Sanui, N. Ogata, *Solid State Ionics*, **136** (2000): 1193.

Alguns polímers funcionalitzats semblen molt atractius per ser emprats com a membranes potenciomètriques ja que els grups carregats enllaçats a la membrana poden modificar les seves propietats superficials elèctriques. A més, la bona estabilitat, la fàcil preparació i el baix cost d'aquests polímers, són motius per considerar atractiva aquesta família de polímers en el camp dels sensors potenciomètrics. Fins al moment, l'ús de polímers funcionalitzats en aplicacions per a sensors químics és limitada a sensors d'humitat^{117,118} i també a biosensors de glucosa.¹¹⁹

1.3 METAL·LOTIONEÏNES

1.3.1 DEFINICIÓ

L'any 1957, Margoshes i Vallee van descriure per primera vegada una proteïna de ronyó de cavall que s'enllaçava a l'ió cadmi. Aquesta proteïna va ser posteriorment caracteritzada bioquímicament per Kägi i Vallee, i degut al seu elevat contingut en sofre i ions metàl·lics la van anomenar metal·lotioneïna (MT).¹²⁰ Des d'aquest descobriment, el nombre de treballs dedicats a aquestes proteïnes ha crescut exponencialment, de tal manera que avui en dia es poden trobar a la literatura prop de 17.000 articles científics que descriuen els resultats obtinguts, tant pel que fa referència als seus aspectes químics, biològics i bioquímics com a d'altres de caire mediambiental, toxicològic, patològic o nutricional.^{121,122,123,124}

Les MTs són unes metal·loproteïnes presents a la majoria d'organismes vius, que es caracteritzen pel seu baix pes molecular (3-10 kDa) i el seu alt contingut en residus de cisteïna (30 % dels seus aminoàcids). Aquest elevat contingut en cisteïna (Cys) els confereix una elevada capacitat per enllaçar ions metàl·lics, així com una elevada reactivitat. Les seves característiques estructurals provenen de la formació d'agregats metall-Cys, ja que quan es troben en forma desmetal·lada (apoMT) presenten una estructura desordenada. Les MTs natives enllacen metalls essencials, bàsicament Zn (II), i/o Cu (I), però també poden coordinar metalls com el Cd (II), Hg (II), Ag (I), o Pb (II).

¹¹⁷ A. Yamanaka, T. Kodera, K. Fujikawa, H. Kita, *Denki Kagaku* **56** (1988): 200.

¹¹⁸ Y. Xin, S. Wang, *Sens. Actuators A*, **40** (1994): 147.

¹¹⁹ T. Matsumoto, A. Ohashi, N. Ito, H. Fujiwara, T. Matsumoto, *Biosens. Bioelectron.*, **16** (2001): 271.

¹²⁰ M. Margoshes, B. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, **79** (1957): 4813.

¹²¹ K.T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura (Eds.), *Metallothionein III., Biological Roles and Medical Implications*, Birkhäuser, Basel, 1993.

¹²² M. Sato, K.T. Suzuki, *Biomed. Res. Trace Elements*, **6** (1995):13.

¹²³ G. Bordin (Ed.), *Metallothionein, Cell. Mol. Biol.*, **46** (2000): 377.

¹²⁴ M.J. Stillman, *Metallothioneins, Coord. Chem. Rev.*, **144** (1995):461.

1.3.2 MÈTODES D'OBTENCIÓ

El procediment tradicional d'obtenció de MTs es basa en la inducció de la seva síntesi en éssers vius i el seu posterior aïllament i purificació a partir dels òrgans on més es sintetitza la proteïna. La producció de MTs pot ser induïda per un gran nombre de factors, com per exemple la presència de metalls, agents radicals oxidants, exposició a radiació UV, determinades hormones, etc. Aquest mètode però, presenta diversos inconvenients, ja que implica un procediment de purificació llarg i difícil que sovint dona lloc a proteïnes de baixa concentració i puresa limitada.¹²⁵ A més a més, no és aplicable a tots els organismes i la composició metàl·lica de les proteïnes que se'n recuperen depèn del mètode d'inducció emprat.

Una alternativa molt més actual, i àmpliament utilitzada avui en dia, consisteix en la biosíntesi de MTs mitjançant la tècnica de l'ADN recombinant. Aquesta es basa en la utilització de cultius de bacteris o llevats que sintetitzen productes heteròlegs, és a dir, propis d'una altra espècie. Així l'aprofitament dels mecanismes cel·lulars de síntesi de proteïnes en bacteris o llevats permet obtenir quantitats elevades de productes que normalment no es sintetitzen en aquestes cèl·lules ja que són propis d'altres organismes. D'aquesta manera es poden obtenir MTs d'una gran puresa en elevades concentracions. Entre d'altres, el grup de recerca de la Universitat de Barcelona actualment dirigit per la Dra. Sílvia Atrian va posar a punt, cap a l'inici de la dècada dels 90,¹²⁶ un mètode d'expressió de metal·lotioneïnes en *E. coli*. Des d'aleshores s'han desenvolupat metodologies per sintetitzar MTs d'una àmplia varietat d'organismes.¹²⁷

1.3.3 CLASSIFICACIÓ

Normalment les proteïnes es classifiquen d'acord amb la seva funcionalitat, però aquest no és el cas de les MT, ja que encara no és coneguda. Per aquest motiu hi ha hagut diverses propostes per a la seva classificació. Tradicionalment les MT s'han classificat en 3 classes en base a la seva homologia seqüencial amb la MT de ronyó de cavall:¹²⁸

Classe I: MTs amb una elevada homologia amb la MT1 de cavall, la primera que es va obtenir. S'han aïllat de vertebrats i alguns invertebrats i estan constituïdes per dos dominis.

¹²⁵ J.F. Riordan, B.L. Vallee, eds. *Methods Enzymol.*, 205, Academia press, San Diego, (1991).

¹²⁶ M. Capdevila, N. Cols, N. Romero-Isart, R. González-Duarte, S. Atrian, P. González-Duarte, *Cell. Mol. Life. Sci.*, **53** (1997): 681.

¹²⁷ M. Capdevila, J. Domènech, A. Pagani, L. Tío, L. Villarreal, S. Atrian, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44** (2005): 4618.

¹²⁸ B.A. Fowler, C.E. Hilderbrand, Y. Kojima, M. Webb. *Nomenclature of Metallothionein. A: Metallothionein II*. J.H.R. Kägi, Y. Kojima, Eds., Birkhäuser Verlag, Basel, **52** (1987): 19.

Classe II: MTs que presenten una gran heterogeneïtat de seqüències, totes elles no alineables amb la MT1 de cavall, i freqüentment aïllades de plantes, fongs, invertebrats i alguns bacteris. En els casos en què s'ha pogut determinar la seva estructura tridimensional, aquesta presenta un únic domini.

Classe III: també anomenades fitoquelatines o cadistines, són pèptids habituals en plantes, algues i alguns fongs, i són d'origen enzimàtic.

L'any 1997 va sorgir del congrés internacional sobre MTs "Metallothionein IV" una nova proposta de classificació¹²⁹ que es basa en criteris seqüencials i relacions filogenètiques entre les diverses MTs.

Una tercera proposta de classificació, complementària a les dues anteriors, es basa en la preferència de les MTs *in vivo*, pels metalls essencials Zn i Cu¹³⁰. Atès que els ions metàl·lics coordinats a una MT són els que en determinen l'estructura, sembla lògic pensar que el Zn (II) i el Cu (I), amb característiques coordinants pròpies, donin lloc a estructures metall-MT diferents. En conseqüència, en base a les relacions estructura/funció, cal esperar que estructures diferents també determinin funcions diferents per a aquestes metal·loproteïnes. En funció del metall coordinat *in vivo*, les MTs es classifiquen com a Zn-tioneïnes o com a Cu-tioneïnes.

1.3.4 ESTRUCTURA

La majoria de MTs presenten un baix grau d'estructura secundària i manca d'estructura terciària,^{131,132} de manera que en absència de metall (forma apoMT) presenten una estructura desordenada "*random coil*".¹³³ Així, actualment és ben conegut que l'estructura tridimensional de les MTs ve determinada pel nombre i naturalesa dels ions metàl·lics que formen enllaços covalents coordinats, els quals donen lloc a complexos metall-tiolat polinuclears. Per tant, són les cisteïnes de la cadena polipeptídica de les MTs les que coordinen els ions metàl·lics i és aquesta coordinació la que determina el replegament de la proteïna. No obstant això, la formació de complexos metall-MT estables només pot ser aconseguida si la cadena polipeptídica es plega, de manera que els àtoms de sofre de la cisteïna (S_{cys}) quedin disposats en una situació espacial acceptable per satisfer les geometries de coordinació específiques dels ions metàl·lics sense produir tensions excessives en la conformació de la proteïna.¹³⁴ Afortunadament, la gran plasticitat de l'estructura primària d'aquestes proteïnes els confereix la sorprenent propietat d'adaptar-se a metalls que difereixen força en el seu radi atòmic i preferències coordinatives sense

¹²⁹ P.A. Binz, J.H.R. Kägi, in: Metallothionein IV, Birkhäuser Verlag, Basel, 1999, 7.

¹³⁰ M. Valls, R. Bofill, R. González-Duarte, P. González-Duarte, M. Capdevila, S. Atrian, *J. Biol. Chem.*, **276** (2001): 32835.

¹³¹ P.A. Cobine, R.T. McKay, K. Zangger, C.T. Dameron, I.M. Armitage, *Eur. J. Biochem.* **271** (2004): 4213.

¹³² J. Domènech, A. Tinti, M. Capdevila, S. Atrian, A. Torreggiani, *Biopolymers*, **86** (2007): 240.

¹³³ N. Romero-Isart, M. Vasák, *J. Inorg. Biochem.*, **88** (2002): 388.

¹³⁴ M.J. Stillman, *Coordination Chemistry Reviews*, **144** (1995): 461.

provocar distorsions importants en la geometria de coordinació d'aquests ni en la conformació global de la proteïna. A la figura 1.8 es mostra l'estructura d'una proteïna de mamífer on la cadena polipeptídica es replega donant lloc a dos dominis globulars, d'aproximadament la mateixa grandària.

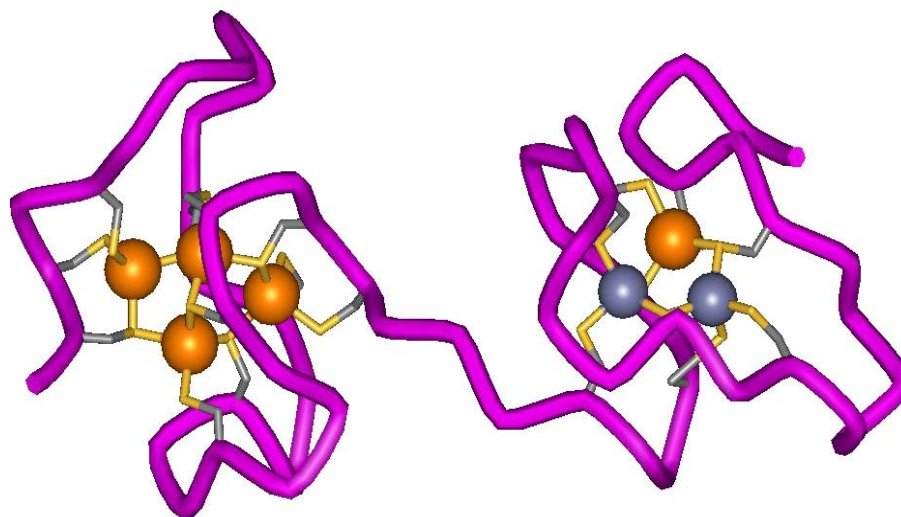


Figura 1.8. Estructura de la Cd₅Zn₂-MT2 de fetge de rata i dels seus fragments α i β .

1.3.5 FUNCIO BIOLÒGICA

La diversitat de metalls que poden coordinar les MTs, la ubiqüitat d'aquestes proteïnes i l'elevat grau de conservació que presenten les seves seqüències aminoacídiques (especialment en la posició dels seus residus de Cys) en organismes diferents del mateix ordre fa creure que les MTs són proteïnes d'una gran importància biològica. Tanmateix, 60 anys després del seu descobriment, la funció o funcions fisiològiques de les MTs resten encara per determinar, de manera que bona part dels treballs actuals apunten cap a l'estudi d'aquests darrer aspecte.

Una de les característiques més rellevants de les MTs, que estableix una clara diferenciació amb la resta de proteïnes, és la seva capacitat per formar complexos metàl·lics d'elevada nuclearitat. Aquests presenten una gran estabilitat termodinàmica, però l'elevada plasticitat i flexibilitat de l'estructura proteica provoca que presentin alhora una elevada labilitat cinètica, fet que facilita, tant *in vivo* com *in vitro*, el bescanvi relativament ràpid dels ions metàl·lics que contenen quan les condicions del medi ho afavoreixen. Així mateix, el fet que la síntesi de moltes MTs es vegi induïda per metalls suggereix que aquestes proteïnes tenen un paper important en la regulació i destoxicació de metalls en els éssers vius.¹³⁵

¹³⁵ D.H. Hamer, *Ann. Rev. Biochem.*, **55** (1986): 913.

Així, se'ls han atribuït diverses funcions estretament relacionades les unes amb les altres com a conseqüència de les característiques fisicoquímiques dels seus agregats metàl·lics. Aquestes funcions s'han relacionat el segrest de metalls tòxics com el cadmi (II) i el mercuri (II).^{136,137}

1.3.6 QUANTIFICACIÓ

La identificació i caracterització estructural de MTs de diferent origen i localització són objectius importants per contribuir a la determinació de les funcions específiques que aquestes metal·loproteïnes desenvolupen en els organismes. Concretament, els estudis actuals estan enfocats a la identificació i quantificació de les diferents isoformes que coexisteixen en una mostra, les seves estructures, i el paper que juguen en relació a factors externs com la presència de metalls pesants. Cal esmentar que la quantificació de MTs ha estat un repte que ha portat al desenvolupament d'un gran nombre de mètodes analítics. Fins al moment s'han desenvolupat tècniques electroanalítiques, espectrofotomètriques UV-Vis, assajos de saturació metàl·lica i mètodes immunològics per a la quantificació total de MTs.¹³⁸ La taula 1.7 recull la majoria de les metodologies emprades fins al moment per la quantificació de les MTs.

Taula 1.7. Diferents tècniques de determinació de les MTs

| Tècnica | LD (ng/100□l) | Determinació | Mostra | Ref. |
|----------------------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|------|
| GFC-FPLC-ETAAS | | Total MT (indirecte) | Insecte <i>O. cincta</i> | 139 |
| IEC-ETAAS | 2 ng/mg proteïna | MT isoformes (indirecte) | Fetge de peix | 140 |
| IE-HPLC-FAAS | 46 (MT-1) 31 (MT-2) | MT isoformes (indirecte) | Fetge de rata | 141 |
| SPE CAC-TDI gels-AAS | 0.9 | Total MT (indirecte) | Llet materna humana (Cd-MT) | 142 |

¹³⁶ C.D. Klaasen, S. Choudhuri, *Pure Appl. Chem.*, **72** (2000): 1023.

¹³⁷ G.F. Nordberg, T. Jin, P. Leffer, M. Svensson, T. Zhou, M. Nordberg, *Analisis*, **28** (2000): 396.

¹³⁸ M. Sato, K.T. Suzuki, *Biomed. Res. Trace Elements*, **6** (1995): 13.

¹³⁹ P.J. Hensbergen, J.M. van Velzen Martin, R.A. Nugroho, M.H. Donker, N.M. van Straalen, *Comp. Biochem. Physiol. C*, **125** (2000): 17

¹⁴⁰ M. Lacorn, A. Lahrssen, N. Rotzoi, T.J. Simat, H. Steinhart, *Environ. Toxicol. Chem.*, **20** (2001): 140.

¹⁴¹ K. Nöstelbacher, M. Kirchgessner, G.I. Stange, *J. Chromatogr. B*, **744** (2000): 273.

¹⁴² A.K. Kabzinski, *Biomed. Chromatogr.*, **12** (1998): 217.

| | | | | |
|--------------------------|---------|---------------------------|--------------------------------------|-----|
| SPE CAC-TDI gels-AAS | 0.7-0.9 | Total MT (indirecte) | Fluids biològics (Zn-MT) | 143 |
| HPLC, detecció per UV | 400 | Total MT (directe) | Teixit de fetge de rata | 144 |
| HPLC, detecció per UV | 3.1 | MT isoformes (directe) | Cultiu de cèl·lules de fetge humà | 145 |
| DPP | 62 | Total MT (directe) | Mostres comercials (Cd, ZnMT) | 146 |
| ELISA | 0.2 | Total MT (directe) | Orina de rata i humana | 147 |
| ELISA | 0.8 | Total MT (directe) | Orina de rata | 148 |

GFC-FPLC-ETAAS: cromatografia de filtració per gel; cromatografia líquida per a separació ràpida de proteïnes; espectrometria d'absorció atòmica electrotermica; IEC-ETAAS: cromatografia de bescanvi iònic; espectrometria d'absorció atòmica electrotermica; IE-HPLC-FAAS: cromatografia líquida d'alta resolució de bescanvi iònic; espectrometria d'absorció atòmica de flama; SPE-CAC-TDI gels-AAS: Extracció en fase sòlida per a cromatografia d'afinitat covalent amb intercanvi tiol-disulfur; gels-espectrometria d'absorció atòmica; HPLC: cromatografia líquida d'alta resolució, DPP: Polarografia de polsos diferencials; ELISA: Assajos immunosorbents lligats a enzims.

Hi ha dos tipus de mètodes analítics per la quantificació de MTs: els mètodes indirectes i els mètodes directes. Els indirectes, són mètodes electroanalítics i d'espectrometria basats en la mesura dels metalls (normalment Ag (I), Cd (II), Hg (II)) enllaçats a les MTs, després de la seva saturació. Per altra banda, els mètodes directes per la quantificació de MTs es basen en tècniques de immunoassaig i ELISA. Tots ells, presenten limitacions que dificulten la quantificació d'aquestes proteïnes.

Cal fer palès que la facilitat d'oxidació que presenten les Cys de les MTs, el seu polimorfisme i l'heterogeneïtat de les mostres provinents de teixits, fluids biològics o cultius cel·lulars introdueixen tota una colla d'inconvenients per als mètodes esmentats a la taula 1 que converteixen la quantificació de MTs en una tasca incòmoda i poc àgil.

Els complexos metall-MT provinents de mostres biològiques s'obtenen després de processos d'aïllament i purificació. Tant si la proteïna està totalment saturada de metall com si no ho està, l'elevada presència de grups tiol pot portar, en condicions aeròbiques, a

¹⁴³ A.K. Kabzinski, *Biomed. Chromatogr.*, **12** (1998): 281.

¹⁴⁴ N. Aït-Oukhatar, F. Bureau, M. Boudey, C. Placé, P. Jauzac, M.A. Drosdowsky, P. Arhan, D. Bouglé, *Ann. Biol. Clin.*, **54** (1996): 87.

¹⁴⁵ R. Studer, P.E. Hunziker, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, **20** (1997): 617.

¹⁴⁶ A. Muñoz, A.R. Rodríguez, *Analyst*, **120** (1995): 529.

¹⁴⁷ W. Tang, T. Kido, W.A. Gross, K. Nogawa, E. Sabbioni, A. Shaikh, *J. Anal. Toxicol.*, **23** (1999): 153.

¹⁴⁸ T. Hirauchi, M. Okabe, T. Nagashima, T. Niioka, *Trace Elem. Electrolytes*, **16** (1999): 177.

l'oxidació d'aquests i consegüentment de la proteïna per la formació d'enllaços disulfur intra- o intermoleculars durant el procés d'aïllament o durant la manipulació de la mostra. Per a evitar la formació d'enllaços disulfur es recomana treballar en una atmosfera sense oxigen.

En relació amb els problemes derivats del polimorfisme de les MTs, el gran nombre de isoformes i subisoformes d'aquestes proteïnes, fa que l'aplicació de les tècniques basades en immunoassaig en mostres biològiques sigui difícil. L'especificitat dels anticossos és molt important per tal d'augmentar la sensibilitat i la selectivitats d'aquests mètodes. Per altra part, l'absència de mostres patró de MT, fa difícil la comparació de resultats entre diferents laboratoris, ja que cadascú té el seu propi mètode d'aïllament.

1.3.7 BIOMARCADORS DE CONTAMINACIÓ

Els estudis mediambientals sobre metal·lotioneïnes ressalten la importància de la quantificació d'aquestes en diferents medis. Atesa l'afinitat de les MTs pels metalls pesants (especialment zinc (II), cadmi (II), mercuri (II) i coure (II)), és coneguda la seva capacitat de bioacumulació en organismes aquàtics invertebrats, sobretot marítims. El fet addicional que les MTs són presents a la gran majoria d'espècies i que la quantitat de MT que contenen depèn de la seva exposició als metalls esmentats les fa possibles candidats per a ser emprades com a biomarcadors de contaminació metàl·lica. Per tant, la Comissió Europea i altres organismes científics internacionals han proposat incloure aquestes proteïnes en programes de monitorització ambiental com a biomarcadors per avaluar la contaminació metàl·lica en medis aquàtics. Conseqüentment, la millora dels mètodes de quantificació de MTs en aquests organismes ha esdevingut un objectiu clau dels estudis mediambientals atès que encara no s'ha descrit cap mètode suficientment sensible, ràpid i prou robust per dur a terme les mesures de MT.

1.4 ESIs, POLÍMERS I METAL·LOTIONEÏNES

La combinació de diferents disciplines com són la potenciometria i els ESIs, els polímers i les metal·lotioneïnes actuant com a ionòfors, obre un gran ventall de possibilitats per a la construcció de nous dispositius inexistents fins al moment.

Des de la dècada dels 70 fins l'actualitat, la preparació de les membranes potenciomètriques dels ESIs basats en membranes de bescanviador iònic mòbil s'ha dut a terme emprant el PVC com a matriu polimèrica. Malgrat conèixer-ne algunes limitacions, ha continuat essent el polímer més emprat perquè reuneix una sèrie de característiques ja esmentades anteriorment que el fan molt adequat com a matriu polimèrica d'aquests ESIs.

Els ionòfors, han estat normalment cations, anions, parells iònics i bescanviadors neutres, tot ells hidrofòbics. La figura del solvent mediador, ha estat sempre necessària ja que, per una banda actua com a medi hidrofòbic que ajuda a la solubilitat del compost ionòfor-ió dins la membrana i alhora plastifica el PVC per estovar-lo i redueix la seva temperatura de transició vítria.

Gràcies a l'ús de nous material diferents al PVC per a la construcció de membranes, més concretament, de la polisulfona i del procés d'inversió de fase, s'ha aconseguit emprar material d'origen biològic (metal·lotioneïnes) com a ionòfor, i poder incorporar-lo a aquestes membranes sense malmetre el seu estat. Aquestes membranes són relativament simples. Per una banda, no necessiten un solvent mediador hidrofòbic ja que les metal·lotioneïnes es troben atrapades dins la membrana de polisulfona, i per altra, la polisulfona no necessita cap plastificant, ja que és un material tou i permeable per si sol.

Així doncs, la combinació d'aquests elements, ens permet presentar un nou tipus de biosensors potenciomètrics basats en macromolècules carregades d'origen biològic atrapades en una matriu de polisulfona, ja que aquesta permet incorporar-les sense afectar-ne les propietats.

Capítol 2

OBJECTIUS

2. Objectius

El polímer més emprat fins al moment per a la construcció d'elèctrodes selectius d'ions de membrana de portador mòbil és el PVC, que barrejat amb un solvent mediador que gairebé sempre fa també la funció de plastificant, li proporciona bones característiques com a matriu polimèrica. Però justament una de les grans limitacions d'aquest polímer és la poca compatibilitat amb el material biològic, fet que limita el PVC només al camp dels quimiosensors. Així doncs, davant d'aquest escenari, es planteja l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral:

L'ús de nous materials com a matrius polimèriques alternatives al PVC per a la construcció de membranes potenciomètriques de portador mòbil compatibles amb biomaterials. Això permetrà desenvolupar tant quimiosensors com biosensors potenciomètrics. Els materials escollits per a aquest estudi seran la polisulfona (PS) i el SPEEK, ambdós polímers sulfonats.

Com a models per al desenvolupament de les membranes sensores en quimiosensors, s'escolliran analít coneguts (amoni, per a cations, nitrat per a anions, i també, degut a un requeriment d'una empresa química per a una aplicació industrial es desenvoluparà un ESI de dial·lil dimetil amoni (DADMAC)).

Per al desenvolupament de biosensors potenciomètrics, s'emprarà només la polisulfona com a matriu polimèrica ja que permet una fàcil incorporació de material biològic dins la membrana a través del procés de inversió de fase. Aprofitant la col·laboració amb un grup de recerca de química inorgànica expert en metal·lotioneïnes, les emprarem com a ionòfors per als nostres biosensors, aprofitant també la capacitat d'aquestes per complexar metalls pesants.

Així doncs els objectius del present treball són:

1. Estudiar la viabilitat de la polisulfona com a matriu polimèrica alternativa al PVC per a la construcció de quimiosensors potenciomètrics (ESIs), tant en anions com en cations. Més específicament:
 - ✓ Estudiar les propietats químiques del material i preveure com poden afectar a la resposta dels sensors.
 - ✓ Triar el millor solvent mediador en cada membrana sensora.
 - ✓ Definir les proporcions dels components de la membrana que donen millors característiques de resposta.
 - ✓ Estudiar la influència del pH i de les interferències per tal de determinar la selectivitat del sensor.
 - ✓ Determinar el temps de vida dels sensors.

2. Desenvolupar un elèctrode selectiu d'ions per a la monitorització del DADMAC en control de processos industrials. Els sensors hauran de ser suficientment selectius per poder determinar l'analit en matrius complexes i dins el rang de concentracions adequat.
 - ✓ Construir i avaluar les membranes de reconeixent tant amb matriu polimèrica de polisulfona com amb PVC. S'escollirà la més robusta.
 - ✓ Avaluar el sensor en condicions experimentals reals, en planta pilot.
 - ✓ Adaptar els sensors a sistemes automatitzats d'anàlisi que s'incorporaran a reactors industrials.
 - ✓ Comparar els resultats del sensor amb el mètode clàssic utilitzat en la indústria, el HPLC.

3. Estudiar la viabilitat del SPEEK com a matriu polimèrica alternativa al PVC per a la construcció de quimiosensors potenciomètrics (ESIs) per a anions i cations.
 - ✓ Estudiar les propietats químiques del material i preveure com poden afectar a la resposta dels sensors.
 - ✓ Triar el millor solvent mediador en cada membrana sensora.
 - ✓ Definir les proporcions dels components de la membrana que donen millors característiques de resposta.
 - ✓ Estudiar la influència del pH i de les interferències per tal de determinar la selectivitat del sensor.
 - ✓ Determinar el temps de vida dels sensors.
 - ✓ Demostrar que degut a les càrregues negatives que té el propi polímer, hi haurà una millora en la selectivitat dels elèctrodes selectius d'anions, respecte als ESIs de PVC.

4. Estudiar la viabilitat de la polisulfona com a matriu polimèrica per a la construcció de biosensors potenciomètrics, i demostrar que es poden utilitzar proteïnes hidrosolubles, en aquest cas metal·lotioneïnes, com a ionòfors dins d'aquesta matriu polimèrica.
 - ✓ Definir la concentració de solució de metal·lotioneïna dins la membrana sensora.
 - ✓ Estudiar les condicions de conservació dels elèctrodes.
 - ✓ Mesurar les característiques de resposta dels ESIs (sensibilitat, rang lineal de resposta i límit de detecció).
 - ✓ Estudiar l'efecte del pH i de les possibles interferències per conèixer la selectivitat de l'elèctrode.
 - ✓ Estudiar el mecanisme de resposta del biosensor, tenint en compte el tipus d'ionòfor (metal·lotioneïnes amb gran capacitat per complexar metalls).

Capítol 3

MATERIALS I MÈTODES

3. Materials i mètodes

En aquest capítol es descriuen els reactius utilitzats i la instrumentació emprada en el desenvolupament i l'avaluació dels elèctrodes estudiats, especificant la metodologia de construcció dels dispositius i les diferents tècniques de preparació i deposició de les membranes sensores en funció del material polimèric emprat.

Excepte en el cas de l'aplicació industrial, en tots els treballs inclosos en aquesta tesi doctoral s'avalua la resposta dels elèctrodes preparats emprant reactius i solvents de puresa elevada. En aquest primer cas esmentat s'utilitzen reactius que subministra la pròpia empresa, dels quals, en alguns casos, es desconeix la concentració i naturalesa de les impureses presents.

3.1 REACTIUS I SOLUCIONS

En la preparació de les diferents solucions s'utilitzà aigua bidestil·lada i reactius de qualitat “per anàlisi” o superior recollits a la taula 3.1.

Taula 3.1. Reactius emprats per a la preparació de les dissolucions.

| Producte | Marca | Producte | Marca |
|----------------------------------|-------|-----------------------------------|---------|
| NaCl | Merck | HCl | Panreac |
| NaF | Merck | NaOH | Panreac |
| NH ₄ Cl | Merck | AgNO ₃ | Merck |
| KCl | Merck | NaNO ₃ | Merck |
| Na ₂ HPO ₄ | Merck | Pb(NO ₃) ₂ | Merck |
| NaHCO ₃ | Merck | Zn(NO ₃) ₂ | Merck |
| Na ₂ SO ₄ | Merck | Cd(NO ₃) ₂ | Merck |
| LiCl | Fluka | Cu(NO ₃) ₂ | Merck |
| CaCl ₂ | Merck | Hg(NO ₃) ₂ | Merck |

Es van preparar membranes de PVC selectives de dial·lil dimetil amoni (DADMA⁺), de polisulfona (PS) selectives de DADMA⁺, nitrat (NO₃⁻), plata (Ag⁺) i la metal·lotioneïna MT1 de mamífer, i finalment membranes de SPEEK selectives d'amoni (NH₄⁺) i nitrat (NO₃⁻). A la taula 3.2 hi ha recollits els ionòfors, els solvents mediadors i els polímers emprats en la preparació de les membranes sensores i els reactius emprats per preparar el contacte intern sòlid dels ESIs.

Taula 3.2. Reactius emprats per a la preparació dels elèctrodes.

| Acrònim | Producte | Marca |
|---------------------------|--|---------|
| Material Polimèric | | |
| PVC | Policlorur de vinil (HMW) | Fluka |
| PS | Polisulfona 3010 natur | BASF |
| SPEEK | Poli(èterètercetona) sulfonada | Síntesi |
| Solvent mediador | | |
| NPOE | Nitrofenil octil èter | Fluka |
| DBP | Ftalat de dibutil | Fluka |
| DOP | Ftalat de bis(2-etilhexil) | Fluka |
| TEHP | Fosfat de tris (2-etilhexil) | Fluka |
| BBPA | Adipat de bis(1-butilpentil) | Fluka |
| Ionòfor | | |
| TOAN (T8) | Nitrat de tetraoctilamoni (CH ₃ (CH ₂) ₇) ₄ N ⁺ NO ₃ ⁻ | Síntesi |
| - | Nonactina | Fluka |
| Zn ₇ -MT1 | | |
| Zn ₇ -SpMTA | | |

| Dissolvent | | |
|------------------------------|------------------------|------------|
| DMF | N,N-dimethylformamida | Panreac |
| THF | Tetrahidrofurà | Fluka |
| Contacte intern sòlid | | |
| | Grafit en pols | Merck |
| | Resina epoxi Araldit M | Ciba-Geigy |
| | Enduridor HR | Ciba-Geigy |

3.2 CONSTRUCCIÓ DELS ELÈCTRODES

La preparació dels elèctrodes selectius d'ions al llarg d'aquesta tesi s'han dut a terme emprant un disseny de fabricació convencional. Per això, es van dipositar membranes de naturalesa diferent (basades en PVC, polisulfona i el polímer sulfonat SPEEK com a matrius polimèriques) a l'extrem de cossos d'elèctrodes que contenen una resina conductora (suports cilíndrics conductors). En els següents apartats es descriu el procés de fabricació d'aquests sensors potenciomètrics.

3.2.1 CONSTRUCCIÓ DELS SUPORTS CILÍNDRICS CONDUCTORS

En l'estudi inicial de caracterització de les diferents membranes, es van construir elèctrodes de configuració convencional^{1,2} segons el mètode habitual en el nostre grup de recerca. Aquest disseny ofereix importants avantatges com són la facilitat de construcció, estabilitat elèctrica i mecànica, i versatilitat d'ús. A més dels avantatges pràctics, aquest tipus de configuració destaca per la substitució de la solució de referència interna líquida per un contacte intern sòlid que genera un potencial de referència intern a través del parell redox O_2/H_2O .^{3,4}

Per a la construcció del cos del transductor dels elèctrodes selectius d'ions es van emprar la configuració convencional amb dos dissenys, un de més curt per a l'avaluació dels ESIs al laboratori i un altre més llarg per a l'aplicació industrial. L'elèctrode que es construeix consta de diferents parts bàsiques: el cos de l'elèctrode, la part elèctrica conductora i la membrana sensora.

En el cas de la configuració convencional curta (figura. 3.1), en un cos cilíndric de PVC de 20 mm de llargada i 6 mm de diàmetre intern (c) se li acobla una connexió femella a la

¹ E. Martínez-Fábregas, S. Alegret, *J. Chem. Educ.*, **71** (1994): A67.

² J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, *Analyst*, **111** (1986): 799.

³ J. Bobacka, M. McCarrick, A. Lewenstam, A. Ivaska, *Analyst*, **119** (1994): 185.

⁴ S. Alegret, A. Florido, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, *Quím.Anal.*, **5** (1986): 36.

qual se li ha soldat perpendicularment una placa de coure (a,b). La femella metàl·lica que porta enroscada la connexió permet que aquesta quedi ben fixada a l'interior del tub de PVC. Seguidament, es rebleix l'espai que queda entre la placa de coure i el final del tub amb la pasta de resina conductora epoxi-grafit (d) i es deixa assecar a l'estufa a 40 °C durant 24 hores. Posteriorment, es poleix la superfície produint una depressió de 0,3 mm on es dipositarà el còctel sensor (e).

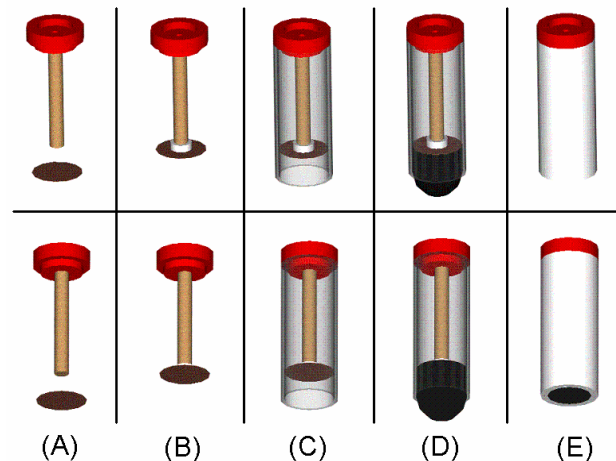


Figura 3.1. Construcció del cos dels ESIs de configuració convencional curta: (A) connector i placa de coure (2,5 mm de radi); (B) soldadura perpendicular de la placa de coure al connector de 2 mm; (C) inserció del connector dins del tub de PVC (6 mm diàmetre intern); (D) rebliment amb resina conductora ; (E) esquema final de l'elèctrode construït.

En la figura 3.2 es mostra l'esquema del procés de construcció dels elèctrodes de configuració convencional allargada. Es parteix d'un cos de PVC de 20 cm de llargada i 8 mm de diàmetre intern en què s'introdueixen dos trossos petits de tub flexible de PVC a 5 mm de distància dels extrems (a). Per un dels extrems s'insereix un cable elèctric coaxial el qual se li ha soldat, prèviament, una placa de coure (b) que es centra i es recolza sobre el tub de PVC flexible. per això es tensa el cable fins que la placa queda recolzada sobre el suport del tub de PVC i s'encola el cable al tub per l'extrem oposat, per tal de fixar-lo (c).

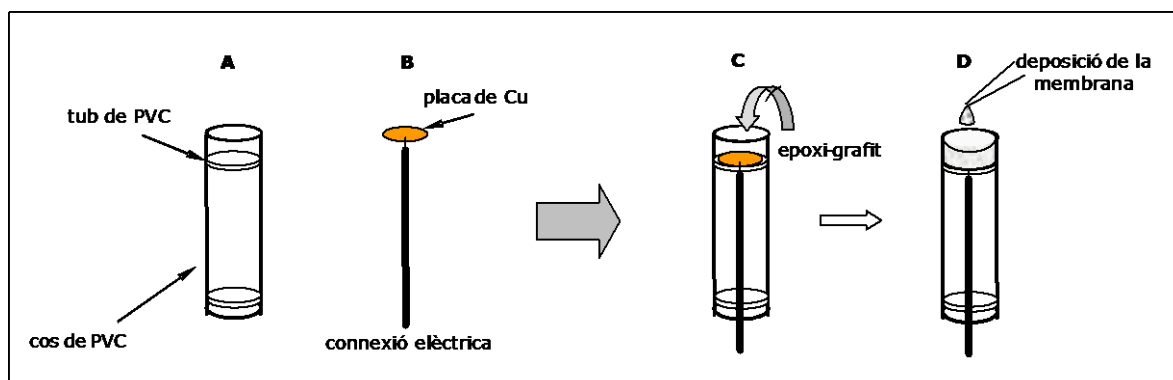


Figura 3.2. Procés de construcció d'un elèctrode de configuració convencional allargada d'estat sòlid.

Per ambdues configuracions, la cavitat que queda al descobert entre la placa i el cos de l'elèctrode, s'omple de pasta conductora epoxi-grafit (1:1) (epoxy: Araldit M- enduridor HR (1:0,4)).⁵ Posteriorment es cura en una estufa a 40 °C durant 24 hores. A continuació es poleix aquesta superfície fins aconseguir una profunditat de 0,3 mm on s'hi dipositarà la membrana sensora (d).

3.2.2 PREPARACIÓ DE LES MEMBRANES SELECTIVES DE PORTADOR MÒBIL

Degut a la gran diversitat d'ions i materials emprats, s'ha hagut de recórrer a diferents tipus de membranes per poder fer una comparativa de les característiques de resposta dels sensors potenciomètrics emprats. Tal i com s'ha comentat anteriorment, es va treballar amb tres tipus diferents de membranes: les de PVC, les de PS i les de SPEEK.

3.2.2.1 Membranes de PVC

Al ser el PVC el component que fa la funció de matriu i de suport físic, el tipus de membrana preparada es cataloga com a membrana polimèrica. Davant la inexistència de ESIs selectius de DADMA⁺ descrits a la bibliografia ens hem basat en elèctrodes de sals d'amoni quaternàries^{6,7,8} per començar a fer un estudi dels possibles ionòfors que servien per a la determinació de l'analit d'interès.

De forma general, totes les membranes polimèriques preparades, tant en l'estudi preliminar com en la caracterització posterior presenten la següent composició (% en pes):

-60-80 % de solvent mediador (plastificant), ftalat de bis(2-etilhexil)(DOP)

-20-30 % de PVC

-0-10 % d'ionòfor, el fosfat de tris(2-etilhexil) (TEHP)

La composició final de la membrana sensora de DADMA⁺ conté un 5 % TEHP, un 65 % DOP i un 30 % de PVC. Per tal de millorar l'homogeneïtat de la membrana, els components es dissolen en tetrahidrofurà (5 ml de THF per cada 100,0 mg de PVC). La mescla s'homogeneïtza amb l'ajut d'un agitador (5-15 minuts). La membrana es diposita gota a gota a l'interior de la cavitat preparada a l'extrem del suport cilíndric conductor, tot i esperant uns minuts entre les addicions perquè s'evapori el tetrahidrofurà (vegeu la figura

⁵ S. Alegret, A. Florido, *Analyst*, **116** (1991): 473.

⁶ M. Martin, H. Freiser, *Anal. Chem.*, **52** (1980): 562.

⁷ T. Higudi, G.R. Illiana, J.L. Tossoumian, *Anal. Chem.*, **42** (1970): 1674.

⁸ K. Shiba, Y. Umezawa, T. Watanabe, S. Osawa, S. Fugiwawa, *Anal. Chem.*, **52** (1980): 1610.

3.3). Cal aconseguir una distribució homogènia de la membrana i és igualment necessari evitar la formació de bombolles que afectarien principalment al temps de resposta i incrementaria el nivell soroll del dispositiu. Un cop s'ha evaporat totalment el THF, es condicionen els elèctrodes en una solució de clorur de DADMA⁺ 1,0 M durant 24 hores. Es construeixen un total de tres elèctrodes per membrana per obtenir més informació i comprovar que no existeixen diferències significatives entre unitats preparades de la mateixa manera.



Figura 3.3. (A) Deposició de la membrana de PVC gota a gota; (B) Gota de còctel sensor dipositada que es deixa evaporar fins a l'evaporació del THF.

3.2.2.2 Membranes de polisulfona

A la present tesi doctoral, s'han preparat membranes poroses de polisulfona per la tècnica d'inversió de fase (IF) ja explicada a la introducció d'aquest treball. El procés pràctic consisteix en submergir la solució de DMF (que conté la polisulfona) en un medi aquós, de manera que l'aigua desplaça la fase orgànica i la polisulfona precipita. Els parells solvent/no solvent que s'han utilitzat són per una banda la dimetilformamida (DMF) amb aigua i per l'altra, el parell DMF/solució de metal·lotioneïna. Les membranes preparades en aquest treball són de configuració planar i estan constituïdes per una capa de polímer (obtinguda per precipitació per immersió, com ja s'ha indicat), dipositada sobre la superfícies de l'elèctrode. A la taula 3.3 hi ha un recull de totes les membranes preparades amb aquest material:

Taula 3.3. Recull de les membranes preparades amb polisulfona.

| Elèctrodes amb matriu de PS | ESI selectiu de | Ionòfor | Tipus de sensor | Tècnica de deposició/no solvent |
|-----------------------------|------------------------------|--|-----------------|---------------------------------|
| 1 | NO ₃ ⁻ | TOAN | ESI | IF/aigua |
| 2 | DADMA ⁺ | TEHP | ESI | IF/aigua |
| 3 | Ag ⁺ | Zn ₇ -MT1 Zn ₇ -SpMTA | Biosensor | IF/ solució proteica |
| 4 | MT1 | Zn ₇ -MT1 | Biosensor | IF/ solució proteica |

TOAN: Nitrat de tetraoctilamoni; TEHP: fosfat de tris (2-etilhexil), IF: inversió de fase

✓ Elèctrodes selectius de NO_3^- i DADMA^+

Els treballs de recerca realitzats pel Grup de Sensors i Biosensors en membranes selectives de nitrat^{9,10} han permès, dins d'un ampli ventall de possibilitats, la selecció d'un ionòfor i dos tipus de solvent mediador per aquest estudi. L'ionòfor escollit és el nitrat de tetraoctilamoni (TOAN), una sal d'amoni quaternari ja sintetitzada en el Grup de Sensors i Biosensors que forma un parell iònic amb el nitrat, essent molt soluble en els solvents habitualment emprats com a plastificants. El plastificant, que en aquest cas actua també com a solvent mediador és un component necessari per solubilitzar i dispersar l'ionòfor en la matriu plàstica, conferint al polímer final prou porositat (permeabilitat) i actuant com a fase orgànica permetent la difusió i mobilitat dels ions al seu si.

L'experiència acumulada sobre diferents plastificants porta a escollir dos possibles candidats: l'ftalat de dibutil (DBP) i el nitrofenil octil èter (NPOE).^{11,12} Per tal de realitzar un estudi comparatiu de tots dos components i de la seva influència sobre la resposta del sensor de nitrat, es preparen elèctrodes amb els diferents solvents mediadors.

La preparació del còctel sensor es prepara de la següent manera: es dissolen 100 mg de polisulfona sòlida en 1 ml de dimetilformamida en un vial. En un altre vial, es pesen el solvent mediador i l'ionòfor en una proporció de 13:1 en pes respectivament. Tot seguit, es mesclen ambdós solucions a fi d'obtenir una proporció de 30 % de PS i un 70 % de solució de solvent mediador i ionòfor. Finalment es diposita una gota d'aquesta mescla final sobre la superfície de l'elèctrode, i immediatament es submergeix l'elèctrode en el no solvent (aigua). Mitjançant la tècnica d'inversió de fase, la membrana es forma per precipitació. (figura 3.4).

El procediment de preparació de les membranes de polisulfona selectives de DADMA^+ és el mateix que el descrit anteriorment per la membrana de nitrat. En aquest cas s'han utilitzat el DOP com a solvent mediador (plastificant) i el TEHP com a ionòfor. Per una banda es prepara la solució de PS en DMF (100 mg/ml) i en un altre vial es pesen el solvent mediador i l'ionòfor (14:1 en pes). Es mesclen ambdues solucions per tal d'obtenir un 25 % de PS i un 75 % de solució solvent mediador i ionòfor. Igual que en el cas anterior, es diposita una gota d'aquesta mescla final sobre la superfície de l'elèctrode, i immediatament es submergeix l'elèctrode en el no solvent (aigua).

⁹ J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, A. Florido, S. Alegret, J.M Paulís, *Quím.Anal.*, **4** (1985): 145.

¹⁰ J. Alonso, J. Bartrolí, S. Jun, J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, *Analyst*, **118** (1993): 1527.

¹¹ A.M.Y. Jaber, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, *Analyst*, **101** (1976): 179.

¹² R. Eugster, T. Rosatzin, B. Rusterholz, B. Aebersold, U. Pedrazza, D. Rüegg, A. Schmid, U.E. Spichiger, W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, **289** (1994): 1.

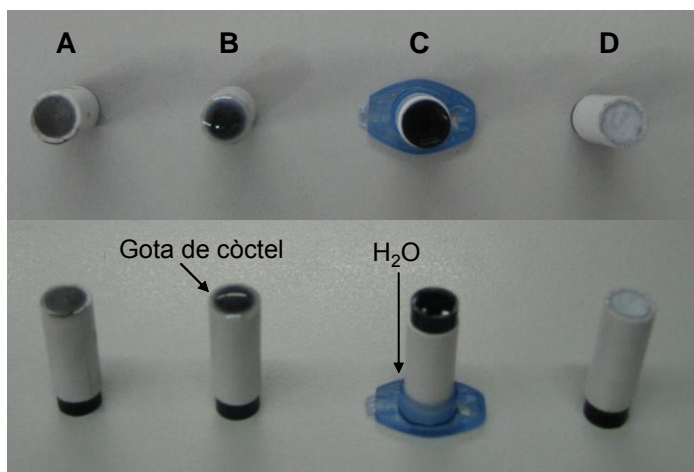


Figura 3.4. Procediment de deposició de les membranes de PS dels ESIs de NO_3^- i DADMA^+ . (A) Cos de l'elèctrode amb la superfície polida. (B) Deposició del còctel sensor (C) Immersió de l'elèctrode en el no solvent (H_2O) (D) membrana de PS depositada sobre la superfície.

✓ Biosensors selectius de Ag^+ i de la metal·lotioneïna MT1 de mamífer

La metodologia de deposició de les membranes selectives de Ag^+ i de la metal·lotioneïna MT1 és exactament la mateixa, emprant per a cada cas l'ionòfor corresponent. El procediment de deposició és semblant a l'explicat anteriorment per a les membranes de NO_3^- i DADMA^+ , però difereix amb una particularitat molt important: en aquest cas l'ionòfor (una metal·lotioneïna) no s'incorpora a la solució de PS/DMF sinó que amb la tècnica d'inversió de fase aconseguim incorporar el material biològic dins la membrana sense manipular-lo, submergint directament l'elèctrode dins la solució proteica. Això té lloc per arrossegament de la proteïna per l'aigua quan aquest solvent penetra a la membrana de polisulfona durant l' inversió de fase.

Per una banda, es prepara una solució de PS en DMF (100 mg/ml). Per una altra, preparem una solució proteica a una concentració de $5 \cdot 10^{-5}$ M. No mesquem ambdós còctels, sinó que dipositem una gota de solució de PS/DMF sobre la superfície de l'elèctrode que precipita immediatament quan submergim l'elèctrode a la solució de proteïna gràcies a la inversió de fase (figura 3.5). A la taula 3.4, podem veure les membranes preparades mitjançant la tècnica d'inversió de fase i la composició final de cada una d'elles.

Taula 3.4. Composició de les membranes dels biosensors de Ag^+ i de MT1 de mamífer.

| ESI | ESI- Ag^+ | | ESI-MT1 |
|--------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Ionòfor | $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ | $\text{Zn}_7\text{-SpMTA}$ | $\text{Zn}_7\text{-MT1}$ |
| Concentració | $5.0 \cdot 10^{-5}$ | $5.0 \cdot 10^{-5}$ | $5.0 \cdot 10^{-5}$ |
| mg PS/ml DMF | 100 mg/ml | 100 mg/ml | 100 mg/ml |

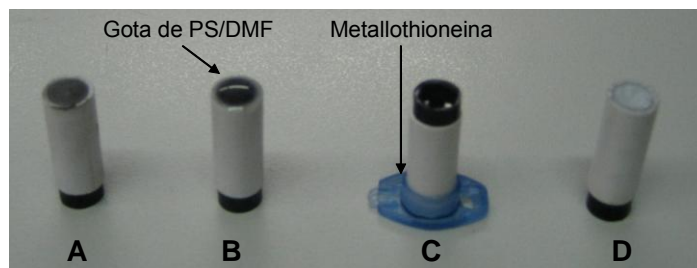


Figura 3.5. Procediment de deposició de les membranes de PS dels ESIs de Ag^+ i $\text{Zn}_7\text{-MT1}$. (A) Cos de l'elèctrode amb la superfície polida. (B) Deposició de la solució de PS/DMF (C) Immersió de l'elèctrode en la solució proteica (D) membrana de PS depositada sobre la superfície.

En el cas dels ESIs de Ag^+ , després de preparar els elèctrodes cal condicionar-los en una solució de Ag^+ per substituir el Zn^{2+} per la Ag^+ .

3.2.2.3 Membranes de SPEEK

S'han preparat membranes amb poli(èterètercetona) sulfonada (SPEEK) selectives d'ions amoni i nitrat, emprant el mateix procediment per ambdues. Ens hem basat en l'experiència del grup de recerca,¹³ i en la pròpia per escollir els ionòfors i solvents mediadors escaients. En el cas de l'elèctrode d'amoni, empram la nonactina com a ionòfor i dos solvents mediadors: el BBPA (adipat de bis(1-butilpentil)) i el TEHP (fosfat de tris(2-etilexil)).¹⁴ Per a l'elèctrode de nitrat, hem reproduït la composició del sensor amb membrana de PS, utilitzant l'SPEEK com a material polimèric.

✓ Sulfonació de la poli(èterètercetona)

Per a sintetitzar aquesta membrana partim de la poli(èterètercetona) (PEEK) que és un polímer comercial que es pot sulfonar amb diferents agents sulfonants. En aquest treball es va utilitzar àcid sulfúric concentrat, degut a la simplicitat del procediment. Prèviament, la PEEK va ser assecada en una estufa a 70 °C durant tota la nit. Després d'això, es van dissoldre 20 g de polímer en 1 l d'àcid sulfúric concentrat i la mescla es va mantenir en agitació durant 100 hores a temperatura de reacció. Sota agitació continua, la mescla va ser precipitada lentament sobre 10 l d'aigua destil·lada amb gel. Després d'haver deixar reposar la mescla tota la nit, es van formar dues fases, una rica i l'altra pobre en polímer. Es va procedir a separar les fases i tot seguit es van afegir 10 l d'aigua destil·lada sobre la fase rica en polímer. La mescla es va mantenir en agitació durant 1 hora, i es va deixar 1

¹³ E. Martínez-Fàbregas "Sensors potenciomètrics "all-solid-state" d'amoni i la seva conversió en biosensor d'urea. Construcció, avaluació i aplicació", Tesi Doctoral, UAB, Bellaterra (1989).

¹⁴ S. Alegret, J. Alonso, J. Bartrolí, E. Martínez-Fàbregas, *Analyst*, **114** (1989): 1443.

hora més en repòs per tal de que tingués lloc de nou la separació entre la fase rica i la fase pobre en polímer. Aquest pas de rentat va ser repetit fins que la fase pobre en polímer va assolir un pH neutre. Finalment, la fase rica en polímer va ser filtrada amb succió. Tot seguit, el polímer es va neutralitzar amb una solució de NaOH 3M i es va tornar a filtrar amb un embut de Büchner. Finalment, el polímer de SPEEK es deixà assecar una nit en una estufa a 80 °C i ja fou apte per a ser utilitzat (vegeu-ne l'aspecte a la figura 3.6). Amb aquesta síntesi s'obté un polímer amb un grau de sulfonació del 60 %.



Figura 3.6. Làmina de SPEEK.

✓ Elèctrode selectiu d'amoni i de nitrat

Inicialment, es prepara una solució de SPEEK en DMF (95 mg/ml), i una altra de solvent mediador i ionòfor (en una proporció de 21:1 en pes, per a l'elèctrode d'amoni i 15:1 per al de nitrat). Tot seguit, es mesclen les solucions anteriors a fi d'obtenir la proporció desitjada de cada un dels components. Finalment dipositem una gota d'aquesta mescla final sobre la superfície de l'elèctrode i deixem evaporar la DMF, repetint aquesta última operació 5 vegades. A la taula 3.5, podem veure les composicions finals per ambdós sensors.

Taula 3.5. Composició de les membranes de NH_4^+ i NO_3^- preparades amb SPEEK.

| | ESI- NH_4^+ | | ESI- NO_3^- |
|----------------------|----------------------|---------------|----------------------|
| Ionòfor (%) | 4 (nonactina) | 3 (nonactina) | 5 (T8) |
| Solvent mediador (%) | 63 (BBPA) | 65 (TEHP) | 65 (NPOE) |
| SPEEK (%) | 33 | 32 | 30 |

En tots els casos, els elèctrodes es van condicionar en una solució 0,1 M (de la sal de l'ió a què respon l'elèctrode) durant 1 hora i amb una solució de 10^{-3} M de la mateixa sal durant 6 – 12 hores.

3.3 INSTRUMENTACIÓ

En aquest treball s'ha emprat instrumentació diferent en funció del lloc on s'han realitzat les mesures (en laboratori o bé en la indústria).

3.3.1 MESURES DISCRETES (BATCH) EN EL LABORATORI

Per al desenvolupament i caracterització de les diferents membranes emprant nous materials com a matrius polimèriques s'han realitzat mesures discretes. Per això es mesura la diferència de potencial entre l'elèctrode indicador i el de referència utilitzant un potenciòmetre Crison 2002 ($\pm 0,1$ mV). Com a elèctrode de referència s'ha utilitzat un dispositiu basat en un fil de plata recobert de clorur de plata (Ag/AgCl) de doble unió líquida (Orion 90-02-00). El compartiment intern d'aquest elèctrode conté una solució de clorur de potassi saturada de clorur de plata subministrada pel mateix fabricant (Orion 900002) i l'extern, amb la mateixa solució també utilitzada en els calibratges. A fi d'agilitar el procés de caracterització dels dispositius, s'ha dissenyat un commutador digital que permet efectuar simultàniament mesures de 16 elèctrodes. Aquest està controlat per un ordinador, que també s'encarrega d'obtenir el senyal del potenciòmetre digital mitjançant un cable de comunicació RS-232C. L'ordinador tracta i representa les dades obtingudes facilitant i agilitant el procés de calibratge. El sistema de mesura es mostra a la figura 3.7. El commutador té 16 canals d'entrada i 1 de sortida. L'instrument es connecta a través d'un cable blindat BNC-BNC al potenciòmetre i per un altre cable SubD_9H-SubD_9M al PC (port RS232C) a l'ordinador. El software d'adquisició TMI 6017-conm16¹⁵ permet un control manual del canal visualitzat al potenciòmetre, configurar automàticament el nombre de canals per treballar, el temps entre lectures i l'escala de la gràfica a on es representà la corba de calibratge. Tot i treballar amb un protocol de comunicacions d'alta velocitat, el potenciòmetre utilitzat només permet una mesura cada dos segons, però això no representa cap limitació per al tipus de mesures que s'han dut a terme ja que són mesures discretes. Les connexions s'han dut a terme mitjançant cable coaxial (tipus TV) per als sensors i "banana" de 4 mm per a l'elèctrode de referència.

¹⁵ <http://www.tmi-sl.com>. Accés 23/07/2005.

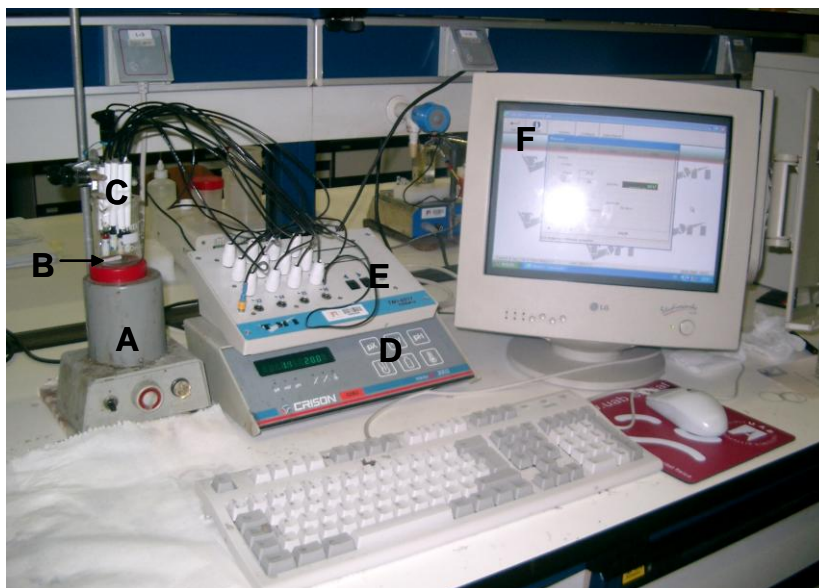


Figura 3.7. Sistema de mesura potenciomètrica dels elèctrodes de configuració convencional; (A) agitador magnètic, (B) elèctrodes, (C) connexions elèctriques, (D) potenciòmetre Crison MicropH 2002, (E) commutador de 16 canals, (F) ordinador.

El software d'adquisició TMI 6017-conm16¹⁵ permet tant un control manual dels 16 canals de lectura de l'instrument, com també configurar automàticament el nombre de canals per treballar, el temps entre lectures i l'escala de la gràfica que representa un cop acabat el calibratge. Tot i treballar amb un protocol de comunicacions d'alta velocitat només permet una mesura cada dos segons, aquest fet no s'atribueix al propi instrument sinó, com ja s'ha indicat anteriorment, al potenciòmetre utilitzat.

3.3.2 MESURES EN PLANTA PILOT

Un cop desenvolupat i caracteritzat l'elèctrode de DADMA⁺ amb membrana de PVC es procedeix a l'automatització del procediment analític en planta pilot amb l'objectiu de simular un procediment de mesura *in-line*. L'experiment es realitzà en un tanc pilot de vidre amb una capacitat d'1 Kg. En aquest recipient hi havia una entrada de nitrogen i un termòmetre per controlar la temperatura de la reacció. Les mesures potenciomètriques del sistema, es realitzaren mitjançant un potenciòmetre digital model Crison 2002 connectat a un registrador E586 Labograph Metrohm, el qual anava enregistrant el senyal potenciomètric durant tot l'experiment. Els elèctrodes indicador eren de configuració convencional, i els elèctrodes de referència els ja esmentats de Ag/AgCl amb doble unió líquida (Orion 90-02-00).

3.3.3 MESURES EN PLANTA INDUSTRIAL

Per tal de realitzar les mesures en un reactor industrial es va dissenyar un dispositiu que facilités la inserció dels sensors, els protegís i evités efectes indesitjables d'obturament i embrutiment de la membrana. Tot i que els sensors emprats són en si força robustos, la membrana dipositada sobre el cos de l'elèctrode és més delicada i es pot veure afectada per aquesta acció. El disseny d'aquest dispositiu està format per dues parts: una que es deixa fixa en el reactor i una mòbil que pot ser extreta amb facilitat. La figura 3.8 mostra una fotografia de les peces desenvolupades així com el detall de les parts que la formen.

La part mòbil està formada per dos cilindres (un per cada elèctrode) d'acer inoxidable de 20 cm de llargada i 1 cm de diàmetre, amb una rosca petita al final (a). A l'interior d'aquest cilindre hi ha l'elèctrode, d'on només sobresurt la part on hi ha la membrana (b). Aquest cilindre encaixa amb un altra peça del mateix material, de 10 cm de llargada i foradat per ambdós costats amb una gran rosca central (c). La part fixa està formada dos peces cilíndriques de plàstic amb una petita rosca interior que encaixa amb la del cilindre de 1 cm de diàmetre descrit anteriorment (d). La rosca central encaixa amb el forat del reactor i permet la fixació i estanqueïtat del sistema (e). De les peces cilíndriques en surten els cables, que degut a les fortes mesures de seguretat són protegits per un cilindre de plàstic blanc fins a arribar al panell de control (figura 3.9) on hi ha el potenciòmetre A METTLER TOLEDO pH 2100/2XH, CRISON (Alella, Spain) (figura 3.9) amb una comunicació (RS232C) connectat a un Pentium 1.

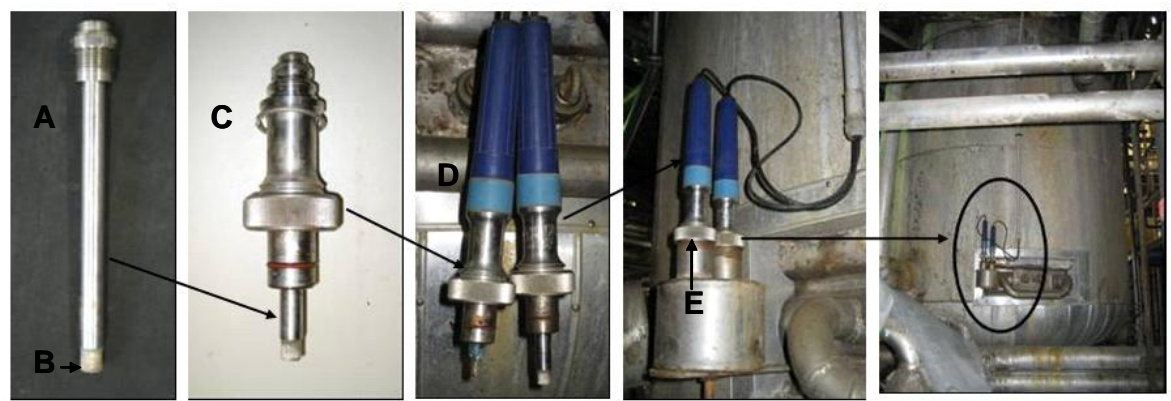


Figura 3.8. Instrumentació requerida per la integració dels elèctrodes dins el reactor industrial. (A) cilindre d'acer inoxidable; (B) Punta de l'elèctrode que sobresurt del tub; (C) Peça d'acer inoxidable amb rosca central; (D) Cilindres de plàstic blau fixes; (E) Rosca central encaixada al reactor per assegurar l'estanqueïtat.



Figura 3.9. Panell de control amb diferents dispositius que controlen tots les paràmetres físics i químics de la reacció.

Per tal d'obtenir els resultats de forma totalment automatitzada es va desenvolupar un programa de recollida de dades en entorn LabView. El programa permetia escollir l'interval de mesura, així com l'interval d'integració de les dades. A més, permetia seguir en temps real, la concentració d'analit a l'interior del reactor. A la figura 3.10 es pot veure l'esquema del programa desenvolupat especialment per al monitoratge de la reacció.

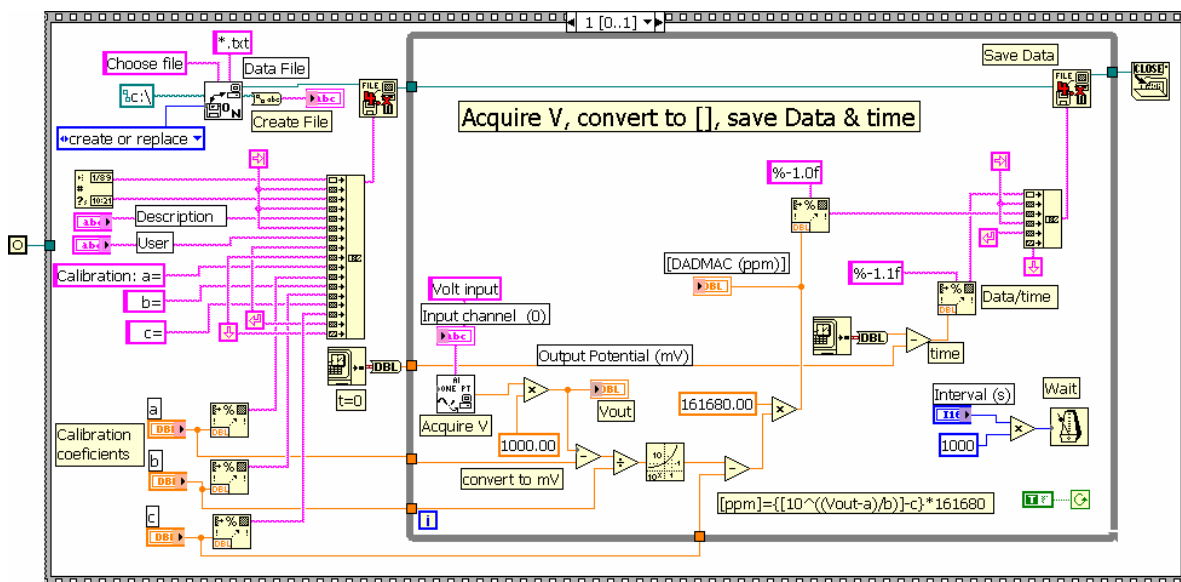


Figura 3.10. Esquema del programa desenvolupat en Labview que permet l'adquisició de dades, i el seguiment en temps real del potencial i concentració de l'analit dins el reactor.

Capítol 4

RESULTATS I DISCUSSIÓ

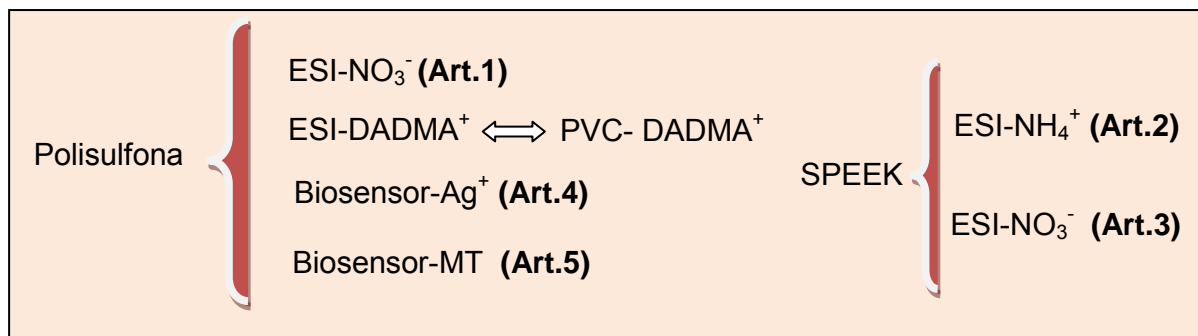
4. Resultats i discussió

L'ús de sensors químics ha experimentat un augment important en el control de processos industrials, en l'anàlisi clínica o en el camp mediambiental, degut principalment a alguns avantatges que aquests dispositius ofereixen respecte a les tècniques estàndard d'anàlisi. En termes generals, i dins dels sensors potenciomètrics, els elèctrodes selectius de membrana polimèrica obren un ampli ventall de possibilitats en el disseny de nous sensors. Això és degut a que el reconeixement selectiu ve determinat per la presència d'un ionòfor que pot ser reemplaçat d'una forma relativament "senzilla" i millorar o desenvolupar un nou sensor. Per altra banda, l'estructura polimèrica de la membrana ofereix una gran versatilitat pel que fa a la construcció dels dispositius, ja que aquesta pot ser dipositada sobre suports conductors de diferent mida i forma. Aquests fets simplifiquen tant els processos de fabricació com de manipulació dels sensors, i a més a més faciliten la seva integració en sistemes automatitzats.

La present Tesi Doctoral, planteja l'ús de nous materials com a matrius polimèriques alternatives al PVC per a la construcció de membranes sensores potenciomètriques i la incorporació de metal·lotioneïnes (MTs) dins d'aquestes membranes.

Els resultats es mostren en funció del polímer emprat i de l'ió estudiat, agrupats en els diferents articles. La figura 4.1 mostra un esquema de les línies generals dels treballs així com el fil conductor que hi ha entre ells.

Figura 4.1. Esquema de les línies de treball i discussió dels resultats del capítol 4. Art.1, Art.2, Art.3, Art.4 i Art.5 corresponen a la nomenclatura dels articles referenciats en l'Annex d'aquesta memòria.



Les publicacions que s'inclouen en l'annex d'aquesta Tesi Doctoral són:

-
- Polysulfone as an alternative material to PVC in the design of Ion-Selective Electrodes
 Art.1 Sens. Actuators B, 115 (2006) 691-696
 A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas
-
- Sulfonated poly(ether ether ketone as an alternative charged material to polyvinyl chloride in the design of Ion-Selective Electrodes
 Art.2 Analytica Chimica Acta 577 (2006) 85-90
 A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas
-
- Sulfonated poly(ether ether ketone), an ion conducting polymer, as alternative polymeric membrane for the construction of anion-selective electrodes
 Art.3 Sens. Actuators B, 125 (2007) 100-105
 A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas
-
- Novel potentiometric sensors based on polysulfone immobilized metallothioneins as metal-ionophores
 Art.4 Talanta, 77 (2009) 1528-1533
 Anna González-Bellavista, Silvia Atrian, Maria Muñoz, Mercè Capdevila, Esteve Fàbregas
-
- The first isoform –selective protein biosensor; a metallothionein potentiometric electrode. Chem. Commun., 46 (2010) 2040-2042
 Art.5 Mercè Capdevila, Anna González-Bellavista, Maria Muñoz, Silvia Atrian, Esteve Fàbregas
-

La discussió global dels resultats es divideix en els següents apartats:

I. *Desenvolupament de quimiosensors potenciomètrics emprant la polisulfona (PS) com a matriu polimèrica.*

En aquest apartat es presenta el desenvolupament i l'optimització de dues membranes sensores utilitzant la PS com a matriu polimèrica. Inicialment es presentarà un estudi sobre l'optimització de les membranes preparades amb aquest material, i posteriorment es descriuran les característiques dels sensors, tant pel que fa a elèctrodes selectius d'anions com de cations (ió nitrat i ió dial·lil dimetil amoni (DADMA⁺)). L'estudi de l'ESI de nitrat va donar lloc a la primera publicació d'aquesta tesi (Art.1), mentre que l'estudi de l'ESI del catió DADMA⁺ no es va publicar, però va servir d'eina per comparar-lo amb l'ESI de PVC.

II. *Aplicació industrial del sensor de DADMA⁺ amb matriu de PVC.*

Un elèctrode selectiu de DADMA⁺ amb matriu polimèrica de PVC ens servirà de model per comparar els resultats amb l'elèctrode de polisulfona selectiu al mateix catió. Degut a la major robustesa del dispositiu i a l'interès industrial, es descriurà l'aplicació d'aquest elèctrode *in-line* en una planta pilot i en una planta industrial.

III. *Desenvolupament de sensors potenciomètrics emprant la poli(èterètercetona) sulfonada (SPEEK) com a matriu polimèrica.*

Es descriuen l'optimització i desenvolupament de dues membranes sensores utilitzant el SPEEK com a matriu polimèrica. Primerament, es presentarà l'estudi sobre l'optimització del material i posteriorment s'avaluaran les característiques del sensor en elèctrodes selectius d'anions i de cations, essent l'ió nitrat i l'ió amoni els dos models escollits. Aquest estudi, va donar lloc a la publicació dels articles Art.3 i Art.2 respectivament.

IV. *Desenvolupament de biosensors amb metal·lotioneïnes emprant la polisulfona (PS) com a matriu polimèrica.*

En aquest apartat es descriuen tres biosensors amb matriu polimèrica de PS que incorporen dins la membrana una metal·lotioneïna, que fa la funció d'ionòfor. Els dos primers són selectius de l'ió plata, donant lloc a la publicació Art.4, i el segon és selectiu de la metal·lotioneïna de mamífer MT1 (Art.5).

4.1 QUIMIOSENSORS POTENCIOMÈTRICS EMPRANT LA POLISULFONA (PS) COM A MATRIU POLIMÈRICA

Com ja s'ha comentat a la introducció general, la polisulfona ofereix un ampli ventall de possibilitats per a la construcció de membranes potenciomètriques. Això és degut a la seva compatibilitat amb molts solvents orgànics i ionòfors però especialment a la seva capacitat d'incorporar material biològic directament a la membrana des d'una fase aquosa. Això permet treballar amb solucions de pH regulat (durant el procés d'inversió de fase) provocant-li la mínima alteració possible (això és una diferència important respecte al PVC).

En aquest apartat ens centrarem en l'estudi de la viabilitat de la polisulfona com a matriu polimèrica en elèctrodes selectius d'ions, presentant els resultats obtinguts per a dues membranes sensores diferents. Per una banda, el nitrat serà l'ió triat per a l'estudi dels elèctrodes selectius d'anions, i per l'altra el DADMA⁺ ho serà per als sensors de cations.

La raó per la qual s'han escollit aquests dos ions com a models per a l'estudi de la PS és, en el cas del nitrat, que en el nostre grup de recerca s'han construït anteriorment ESIs de nitrat amb matriu de PVC,^{1,2} fet que ens permetrà comparar els resultats obtinguts entre ambdós ESIs. En el cas del DADMA⁺, l'explicació és pràctica. És degut a l'interès industrial d'una empresa química de polímers, amb la qual es va signar un conveni de col·laboració pel desenvolupament d'un elèctrode selectiu al monòmer DADMA⁺ present en la majoria dels seus productes.

4.1.1 ELÈCTRODE SELECTIU DE NITRAT (ESI-NO₃⁻)

Degut a la inexistència d'elèctrodes potenciomètrics que utilitzin la PS com a matriu polimèrica es fa inicialment un estudi de la concentració del polímer en DMF que cal, per a la preparació de la membrana sensora.

En primer lloc, per tal d'obtenir solucions de diferents concentracions de polisulfona, es pesen separatament en 3 vials 80, 100 i 160 mg de PS i es dissolen en un mil·lilitre de DMF. Per a cada una d'aquestes 3 solucions de PS en DMF, es preparen 9 membranes diferents.

La proporció polisulfona/solvent mediador (nitrofenil octil èter) és diferent en cada una d'elles, amb l'objectiu d'aconseguir-ne una àmplia varietat. Es preparen les següents proporcions de polisulfona/NPOE (10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 80:20

¹ J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, A. Florido, S. Alegret, J.M Paulís, *Quím.Anal.*, **4** (1985): 145.

² Alonso, J. Bartrolí, S. Jun, J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, *Analyst*, **118** (1993): 1527.

i 90:10) per cada una de les 3 solucions de polímer preparades inicialment (un total de 27 membranes sensores tal i com es pot veure a la figura 4.2).

En aquest primer estudi, la relació solvent mediador/ionòfor es manté constant en totes les membranes. Com a estudi preliminar de la qualitat de les membranes, es fa una primera deposició a sobre la superfície de l'elèctrode per veure'n l'aspecte. A la figura 4.2 podem veure una fotografia de totes elles; les marcades en vermell són les escollides per a l'estudi posterior.

Es van preparar i depositar (§3.2.2.2) membranes de diversa composició per tal d'avaluar la influència del tipus de solvent mediador, així com de les proporcions relatives de polímer, solvent mediador i ionòfor en la membrana. En tots els casos, es van preparar tres sensors amb cada un dels còctels sensors. Com a ionòfor es va emprar el nitrat de tetraoctilamoni (T8), un ionòfor àmpliament utilitzat pel desenvolupament de sensors per aquest ió.¹

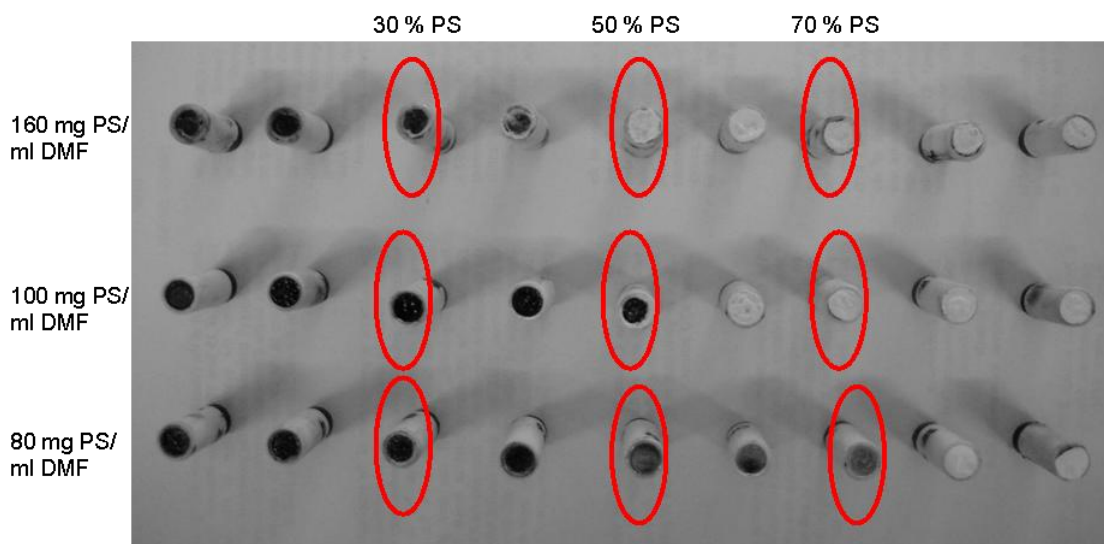


Figura 4.2. Aspecte de totes les membranes depositades.

4.1.1.1 Elecció del solvent mediador i estudi de la resposta vers la relació polímer/solvent/ ionòfor

Atès l'elevat percentatge de solvent mediador (plastificant) de la membrana i la seva influència en les seves propietats físiques i químiques, és aconsellable verificar la compatibilitat d'aquest amb el polímer emprat, així com amb l'ionòfor. Per a cada tipus de proporció seleccionada es van assajar dos dels solvents mediadors descrits en la literatura

pel desenvolupament de membranes de nitrat amb matriu de PVC: el ftalat de dibutil (DBP) i el nitrofenil octil èter (NPOE).^{3,4}

Totes les membranes desenvolupades, independentment del solvent mediador emprat presentaven un aspecte homogeni i sense problemes d'adherència al suport conductor, excepte les membranes amb un 80 % i 90 % de polisulfona que presentaven un aspecte completament blanquinós i poc adherent. Poques hores després de condicionar aquests sensors, les membranes es van desenganxar del suport conductor, impossibilitant-ne el seu ús.

La resta de les membranes van precipitar sense cap problema. S'estudià també la sensibilitat i el rang lineal dels sensors durant tres setmanes per tal de decidir quina de les composicions presentava millor estabilitat al llarg del temps. (Taula 4.1).

Taula 4.1. Sensibilitat (mV/dec) i Rang Lineal (M), de tots els elèctrodes estudiats per ambdós solvents mediadors.

| mg PS / ml DMF | PS (%) | Solvent:Ionòfor (%) | Sensibilitat (NPOE) | Sensibilitat (DBP) | Rang Lineal (NPOE) | Rang Lineal (DBP) |
|----------------|--------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| 80 | 30 | 70 | -51.5 | -37.9 | $1.8 \cdot 10^{-4}$ -0.03 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 80 | 50 | 50 | -47.8 | -32.4 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ -0.03 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 80 | 70 | 30 | -30.1 | -26.1 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 | $5.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 100 | 30 | 70 | -58.6 | -36.8 | $5.2 \cdot 10^{-4}$ -0.03 | $5.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 100 | 50 | 50 | -50.3 | -30.1 | $3.0 \cdot 10^{-4}$ -0.03 | $5.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 100 | 70 | 30 | -29.2 | -19.8 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 160 | 30 | 70 | -47.1 | -32.1 | $7.0 \cdot 10^{-5}$ -0.03 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 160 | 50 | 50 | -41.1 | -33.8 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ -0.03 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |
| 160 | 70 | 30 | -26 | -11.9 | $1.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 | $5.0 \cdot 10^{-3}$ -0.03 |

En primer lloc, es va poder observar com les membranes amb NPOE, en igualtat de proporcions, presentaven millors sensibilitats i LIRL (Límit inferior de resposta lineal) que les membranes amb DBP. Seguidament, es va observar que la concentració inicial de polisulfona en dimetilformamida (mg PS/ml DMF) no afectava a la resposta de l'elèctrode ja que independentment d'aquesta, i a igualtat de proporcions, no hi ha diferències importants en els paràmetres mesurats.

³ A.M.Y. Jaber, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, *Analyst*, **101** (1976): 179.

⁴ R. Eugster, T. Rosatzin, B. Rusterholz, B. Aebersold, U. Pedrazza, D. Rüegg, A. Schmid, U.E. Spichiger, W. Simon, *Anal. Chim. Acta*, **289** (1994): 1.

La variable que influeix realment en la resposta és la proporció polisulfona/solvent mediador. Les membranes amb un 70 % de PS tenen una sensibilitat molt baixa. S'ha atribuït això a la poca quantitat de solvent (un 30 %). Les membranes amb un 50% de PS milloren la resposta però, la que presenta una sensibilitat millor i un rang de treball lineal més ampli és la membrana de 100 mg PS/ ml DMF amb una composició de 30 % de polisulfona i 70 % de (solvent mediador/ionòfor). La figura 4.3 mostra els resultats obtinguts amb les membranes de concentració 100 mg PS/ ml DMF per a ambdós solvents mediadors.

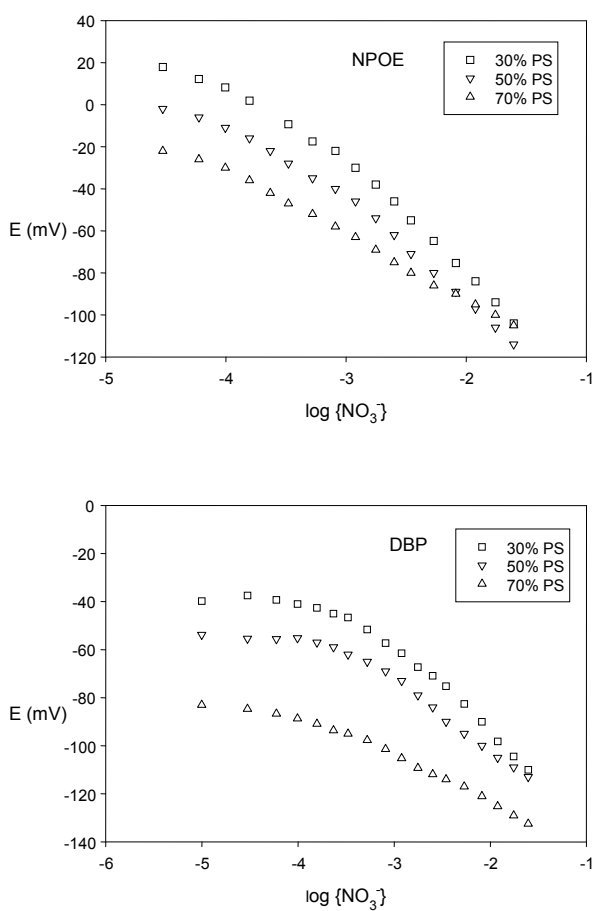


Figura 4.3. Calibratges a diferents proporcions de PS/solvent mediador per als dos solvents estudiats.

Un cop seleccionats els components i la composició òptima de la membrana, es va estudiar la proporció solvent mediador/ionòfor. Es van estudiar les característiques de resposta de sensors preparats amb membranes que contenien 3 proporcions diferents de solvent/ionòfor (taula 4.2). Es va observar que les membranes amb un contingut d'ionòfor al voltant de 5 % (en pes) presentaven una millor sensibilitat i un rang lineal més ampli que les membranes amb un contingut d'ionòfor del 1 % i del 2,5 % (en pes).

Taula 4.2. Sensibilitat (mV/dec) i Rang Lineal (M) dels elèctrodes amb un 30 % de PS, variant la proporció solvent mediador/ionòfor.

| PS (%) | Solvent mediador (%) | Ionòfor (%) | Sensibilitat | Rang Lineal |
|--------|----------------------|-------------|--------------|---------------------------|
| 30 | 65.0 | 5.0 | -56.7 | $5.0 \cdot 10^{-5}$ -0.03 |
| 30 | 67.5 | 2.5 | -53 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ -0.03 |
| 30 | 69.0 | 1.0 | -50 | $1.1 \cdot 10^{-4}$ -0.03 |

Així, en aquest estudi preliminar les millors característiques de resposta corresponen a la membrana amb un 30 % de PS, un 65 % de solvent mediador i un 5 % d'ionòfor (en pes). Amb aquesta membrana escollida, es va fer un estudi més exhaustiu d'aquests elèctrodes avaluant l'efecte del pH, la influència d'algunes interferències i el temps de vida dels dispositius.

4.1.1.2 Influència del pH

La determinació del marge útil de pH en el qual es pot treballar amb les membranes és una característica important, atès que sovint les mostres a analitzar poden tenir pHs força diferents. L'estabilitat de la resposta enfront del pH s'avalua mitjançant els diagrames potencial/pH anomenats de Reilley. En aquest cas, la membrana escollida presentava una estabilitat de mesura raonable respecte del pH. En tots els casos, les oscil·lacions del potencial en l'interval de pH comprés entre 2.5 i 12 no variaven en més de 2-4 mV al voltant del valor mig, tal i com es pot veure a la Figura 4.4. Per a concentracions elevades de H^+ o de OH^- apareix una alteració del senyal del sensor provocada tant per l'efecte interferent d'aquests ions com per la variació induïda de la força iònica de la solució i de la variació del potencial d'unió líquida.

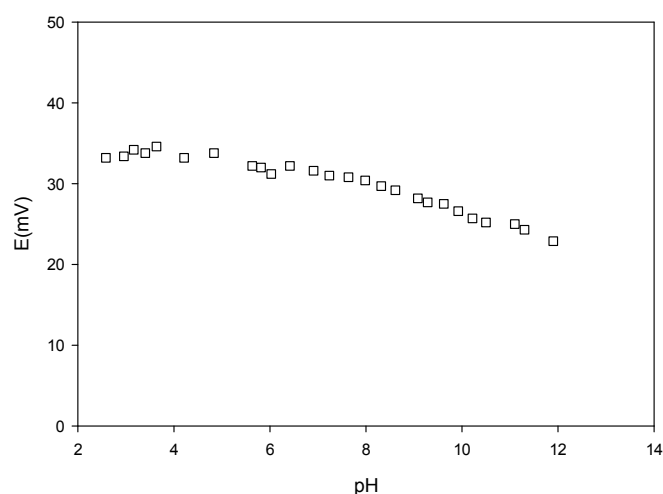
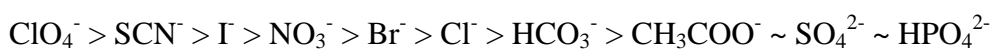


Figura 4.4. Influència del pH en el potencial de resposta del ESI de nitrat a una concentració de $1 \cdot 10^{-3}M$.

4.1.1.3 Estudi de les interferències

Pensant en aplicacions futures, és important conèixer el grau d'interferència d'altres anions en la resposta subministrada per la membrana de nitrat. La selectivitat cap a un anió en aquest tipus d'elèctrodes es descriu, de forma general, segons la sèrie liotròpica de Hofmeister:⁵



Aquesta seqüència prediu quina és la selectivitat de l'elèctrode en base a la lipofília dels diversos anions, ja que aquest paràmetre és determinant per definir la facilitat amb que el parell iònic (ionòfor-anió) s'extreu de la fase aquosa a la fase orgànica (solvent mediador de la membrana).

Es van determinar els coeficients de selectivitat per a diferents anions mitjançant el mètode de la interferència fixa (FIM), on es realitza una corba de calibratge en presència d'una concentració de fons d'espècie interferent que es manté invariable. Aquest mètode és el més semblant a les situacions reals ja que l'elèctrode té contacte simultani amb l'anàlit i les interferències. Els potencials anions interferents estudiats han estat els ions fluorur, clorur, sulfat, hidrogencarbonat i hidrogenfosfat a una concentració de 10^{-1} i 10^{-2} M.

A la taula 4.3 es poden veure els valors de sensibilitat (mV/dec) i selectivitat potenciomètrica obtinguts en aquest estudi, els quals indiquen la poca interferència dels anions divalents, i la lleugera interferència dels anions fluorur i hidrogencarbonat. El clorur és l'anió amb una K^{pot} més alta, i per tant el més interferent. Aquests valors de K^{pot} porten a concloure que els dispositius avaluats són selectius a l'anió nitrat i que responen, com a mínim, unes aproximadament 400 vegades més a l'esmentat ió que a la seva principal interferència, l'ió clorur.

Taula 4.3. Sensibilitat (mV/dec) i Coeficients de selectivitat potenciomètrica expressats com $\log K^{\text{pot}}$ de l'elèctrode de nitrat.

| Ió interferent | 0.1M | | 0.01 M | |
|--------------------------------|----------------------|--------|----------------------|--------|
| | Log K^{pot} | mV/dec | Log K^{pot} | mV/dec |
| F ⁻ | -2.11 | -41.6 | -2.62 | -50.3 |
| HPO ₄ ²⁻ | -2.82 | -44.1 | -2.95 | -52.9 |
| SO ₄ ²⁻ | -3.08 | -48.3 | -2.90 | -47.7 |
| HCO ₃ ⁻ | -1.66 | -43.3 | -2.73 | -41.5 |
| Cl ⁻ | -1.85 | | -2.14 | |

⁵ D. Wegmann, H. Weiss, D. Ammann, *Mikrochimica Acta*, **3** (1984): 1.

4.1.1.4 Estudi del temps de vida

Una característica que cal destacar, en funció del tipus d'aplicació que es pretén donar al sensor desenvolupat, és el temps de vida. Una disminució del pendent de la recta de calibratge així com un augment del límit de detecció són símptomes de deteriorament de la membrana i indiquen el final del seu temps de vida. Així doncs, els elèctrodes selectius de nitrat es van calibrar periòdicament per tal de fer un seguiment dels seus paràmetres de resposta. Es van observar caigudes apreciables en la sensibilitat de l'elèctrode a partir del primer mes. Aquesta disminució del pendent es pot relacionar amb pèrdues de l'element de reconeixement (“*leaching*”) degut a una disminució de les propietats fixadores de la matriu polimèrica.

Es demostra la viabilitat de la polisulfona com a matriu polimèrica per a la construcció de membranes sensores en elèctrodes selectius d'ions.

Tenint en compte les propietats d'aquest polímer i la seva capacitat per contenir material biològic, propietats que no té el PVC, s'obre un ventall de possibilitats enorme per la construcció de biosensors potenciomètrics, els quals es presentaran en aquesta mateixa tesi doctoral.

4.1.2 ELÈCTRODE SELECTIU DE DIAL·LIL DIMETIL AMONI (ESI-DADMA⁺)

El desenvolupament del segon elèctrode presentat en aquesta memòria s'ha dut a terme en el marc d'una col·laboració Universitat-Empresa dirigida al desenvolupament d'un elèctrode selectiu d'ió DADMA⁺ pel control del procés de fabricació de polímers carregats d'aquest monòmer. L'empresa DERYPOL S.A., del grup americà NALCO és un fabricant pioner a nivell mundial de polímers en dispersió, consolidada com una empresa competitiva en diferents sectors industrials: tèxtil, pintures, assaonament de pells, paper, cosmètica, tensioactius, tractaments d'aigües, etc. Des de l'any 1967 DERYPOL S.A treballa en el desenvolupament i fabricació de polímers en solució i dispersió aquosa i especialitats químiques per a la indústria.

4.1.2.1 Control del procés industrial

De forma general, fabricar un producte químic competitiu i de qualitat depèn de diferents factors: les condicions de reacció, la qualitat de la matèria primera i el bon funcionament dels diferents elements dels sistema (bombes, vàlvules, sistemes d'agitació, etc). El

desajustament d'un d'aquests paràmetres pot portar a l'obtenció de partides senceres defectuoses, amb la consegüent pèrdua de recursos (matèria primera, energia, augment de residus) que introdueix un increment de cost indesitjable.

L'empresa DERYPOL S.A. realitza un seguiment dels processos químics d'obtenció dels seus polímers extraient mostres del tanc i analitzant-les amb una tècnica cromatogràfica. Aquest procediment és laboriós ja que implica la presa de mostra en el tanc de reacció, trasllat, manipulació i anàlisi en el laboratori situat en la mateixa fàbrica (metodologia *at-line*). Per aquesta raó, trobar un mètode senzill, ràpid i eficient per fer un seguiment de l'estat del reactor a temps real seria un avenç per controlar el procés de fabricació d'ambdós polímers. Obtenir informació contínua del sistema milloraria l'eficiència del procés i es reduiria el temps de reacció, el cost de la producció, el consum energètic i consegüentment l'impacte mediambiental.

La gran utilitat de les tècniques electroquímiques per a dur a terme anàlisis, tant quantitatives com qualitatives, van fer pensar en la possibilitat de desenvolupar un sensor potenciomètric basat en la tecnologia dels elèctrodes selectius de membrana líquida per a la determinació de l'ió DADMA⁺.

Després d'una àmplia cerca no s'ha trobat descrit a la bibliografia cap ionòfor pel monòmer DADMA⁺, però si alguns sensors potenciomètrics capaços de determinar sals d'amoni quaternàries.^{6,7,8} Ens hem basat en aquestes membranes per començar a fer un estudi dels possibles ionòfors que podrien servir per a la determinació de DADMA⁺.

4.1.2.2 Optimització de les membranes selectives de l'ió DADMA⁺.

En la fase inicial del desenvolupament d'aquest treball es porta a terme un estudi on s'avaluen diferents membranes selectives de l'ió DADMA⁺ emprant 2 matrius polimèriques diferents. Per una banda, s'estudia la viabilitat de la polisulfona (PS) com a matriu polimèrica per a elèctrodes selectius de cations, i per l'altra es construeixen membranes amb matriu de PVC per comparar els resultats. Per optimitzar la composició de totes les membranes es va estudiar la relació TEHP/DOP (Fosfat de tris (2-etilhexil)/ Ftalat de bis(2-etilhexil) mantenint la quantitat de polímer constant, i la relació sovent mediador/ polímer.

⁶ M. Martin, H.Freiser, *Anal. Chem.*, **52** (1980): 562.

⁷ T. Higuadi, G.R. Illiana, J.L. Tossoumian, *Anal. Chem.*, **42** (1970): 1674.

⁸ K.Shiba, Y.Umezawa, T. Watamabe, S. Osawa, S. Fugiwawa, *Anal. Chem.*, **52** (1980): 1610.

A la taula 4.4 es pot veure la composició de la membrana, la sensibilitat de l'elèctrode (determinada pel pendent en la zona lineal) i l'interval de resposta lineal per a totes les membranes estudiades amb les dues matrius polimèriques.

Taula 4.4. Sensibilitat (mV/dec) i Rang Lineal (M), dels elèctrodes per totes les membranes assajades amb ambdues matrius polimèriques de PVC i Polisulfona.

| Membrana | Composició | | | Rang Lineal (M) | | Pendent (mV/dec) | |
|------------|------------|---------|-------------|---------------------------|---------------------------|------------------|------|
| | TEHP (%) | DOP (%) | Polímer (%) | PVC | PS | PVC | PS |
| M1 | 4 | 66 | 33 | $6.2 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | $1.2 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 42.2 | 31.5 |
| M2 | 12 | 0 | 88 | - | - | - | - |
| M3 | 76 | 0 | 24 | $5.7 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | - | 34.3 | - |
| M4 | 10 | 60 | 30 | $8.6 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | $4.5 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 58.6 | 34.2 |
| M5 | 5 | 65 | 30 | $1.2 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | $3.2 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 54.3 | 36.7 |
| M6 | 0 | 70 | 30 | $7.3 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | - | 50.5 | - |
| M7 | 10 | 65 | 25 | $1.0 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | $2.0 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 58.9 | 30.2 |
| M8 | 5 | 70 | 25 | $3.8 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | $2.5 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 58.4 | 28.7 |
| M9 | 0 | 75 | 25 | $3.5 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | - | 51.5 | - |
| M10 | 10 | 70 | 20 | $1.5 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | $5.5 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 41.5 | 25.1 |
| M11 | 5 | 75 | 20 | $9.8 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | $7.4 \cdot 10^{-2} - 1.0$ | 44.4 | 22.3 |
| M12 | 0 | 80 | 20 | $5.8 \cdot 10^{-3} - 1.0$ | - | 44.7 | - |

Cal remarcar que de totes les membranes estudiades, els elèctrodes amb matriu de PVC presenten unes sensibilitats i uns LIRL substancialment millors que els elèctrodes amb matriu de polisulfona. Les sensibilitats dels sensors fets amb polisulfona són gairebé la meitat que les dels sensors de PVC.

Analizant els resultats de les membranes de PVC podem veure que:

- Tant el TEHP com el DOP són necessaris en la composició de la membrana ja que les que els hi manca un dels dos components, o bé no donen resposta (M2), o bé la sensibilitat és inferior (M3).

- Si el percentatge de polímer és molt elevat no hi ha resposta (M2).
- Estudiant la proporció DOP/PVC s'observa que les membranes amb una proporció més baixa de polímer (M10, M11 i M12), presenten sensibilitats més baixes que la resta de membranes estudiades.

Així doncs, d'aquest primer estudi podem concloure que totes les membranes de polisulfona, les membranes de PVC sense un dels dos components (TEHP o DOP) (M2, M3, M6, M9 i M12) i les que tenien una proporció més baixa de polímer (M10, M11 i M12) donen respostes de menys qualitat.

De la resta de membranes (M4, M5, M7 i M8) tot i no existir diferències destacables entre les seves sensibilitats, es va observar que els elèctrodes amb més percentatge de plastificant (M7 i M8) tenien un millor límit inferior de resposta lineal. La discriminació final entre aquestes quatre es va dur a terme en funció del temps de vida dels dispositius.

4.1.2.3 Temps de vida

El control del procés requereix una contínua vigilància del sistema i per tant, cal dissenyar un sensor robust. Per això, és indispensable realitzar una avaluació de quin és el seu temps de vida. És important que les membranes desenvolupades siguin robustes i tinguin un temps de vida adequat per fer viable llur aplicació en mesures contínues durant llargs períodes de temps. El seguiment de la sensibilitat i el límit de detecció, permet obtenir informació sobre com varia l'estat de la membrana. Una disminució del pendent de la recta de calibratge, així com un augment del límit de detecció són símptomes de deteriorament de la qualitat de la resposta del sensor i limiten el seu temps de vida. Els resultats obtinguts al llarg dels més de 3 mesos que va durar l'estudi, van demostrar diferències apreciables entre les membranes. A la figura 4.5 es mostra l'evolució de la sensibilitat de les membranes amb matriu de PVC que *a priori* tenien millors característiques de resposta. Podem observar com les membranes amb un 25 % de PVC (M7 i M8) mantenen la seva sensibilitat durant 2 mesos, mentre que la resta comencen a perdre pendent tot just al cap d'un mes. Descartades les membranes M4 i M5, vam fer la discriminació final entre M7 i M8 pel únic paràmetre diferenciador entre ambdues, el límit de detecció. Així doncs, vàrem prosseguir els nostres estudis sobre la influència del pH i el de les interferències amb les membranes M8, que a més de tenir els millors paràmetres de resposta, presentaven un temps de vida més alt, ja que els requeriments industrials ho recomanen.

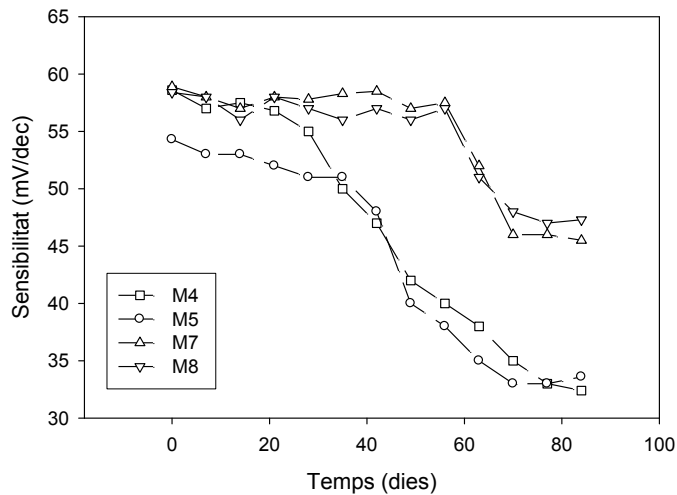


Figura 4.5. Evolució amb el temps dels pendents (mV/dec) de 4 membranes amb matriu de PVC.

4.1.2.4 Influència del pH

S'avalua quina és la resposta de la membrana en variar el pH. La metodologia d'avaluació consisteix en addicionar una base (NaOH) en una solució de DADMAC 0,01 M enregistrant la lectura de l'elèctrode indicador i la d'un elèctrode de pH.

En la figura 4.6 es pot veure el resultat de l'experiment. S'observa que el potencial es manté raonablement estable en el rang de pH de 3.0-12.0. La davallada de potencial a pH inferior a 3.0 podria ser deguda a la interferència d'ions H^+ i a l'augment del potencial d'unió líquida.

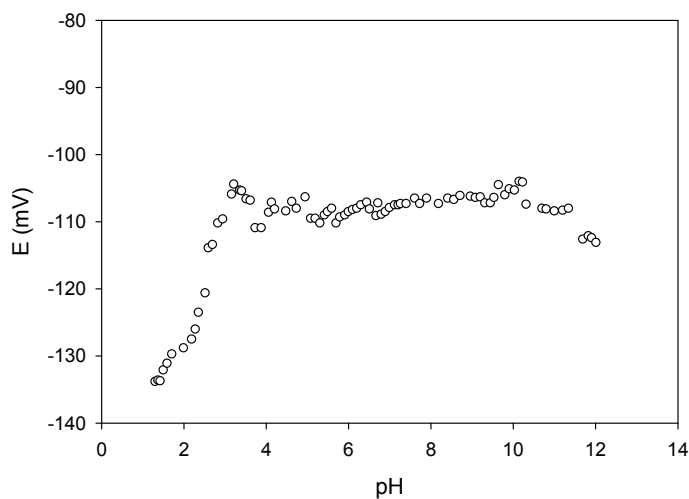


Figura 4.6. Influència del pH en el potencial de resposta del ESI de DADMA⁺.

4.1.2.5 Interferències

Es realitzà un estudi d'interferències a fi d'avaluar la resposta de l'elèctrode a espècies diferents de l'ió principal. Amb l'objectiu de desenvolupar un elèctrode capaç de monitoritzar *in-line* un procés industrial s'estudià l'efecte que provoquen els cations presents habitualment en el procés de producció, en concret els cations sodi i amoni. El seu origen és divers: l'aigua, els reactius, els residus del reactor, etc.

Els calibratges que es presenten a les figures 4.7 i 4.8 corresponen a l'estudi de la interferència de l'ió amoni i l'ió sodi a 3 concentracions diferents: 1.0 M, 0.1 M i 0.01 M. En els gràfics es representen simultàniament un calibratge sense fons interferent (blanc) a fi de comparar visualment l'efecte de la interferència. Tal i com es pot veure a la figura 4.7 l'ió sodi no és interferent per a la detecció de DADMA^+ , ja que la resposta potenciomètrica és independentment de la concentració d'aquest ió. No passa el mateix amb l'ió amoni. Tal i com es pot apreciar a la figura 4.8, aquest ió afecta lleugerament la resposta de l'elèctrode, alterant el límit de detecció de l'ió principal, és a dir, l'elèctrode comença a respondre a activitats majors de DADMA^+ en presència de la interferència.

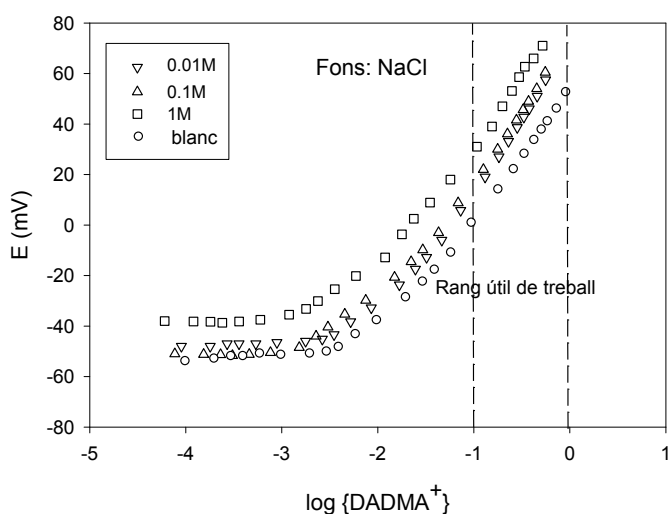


Figura 4.7. Calibratges de l'elèctrode de DADMA^+ en un fons interferent de NaCl a 3 concentracions diferents: 0.01M, 0.1M i 1M.

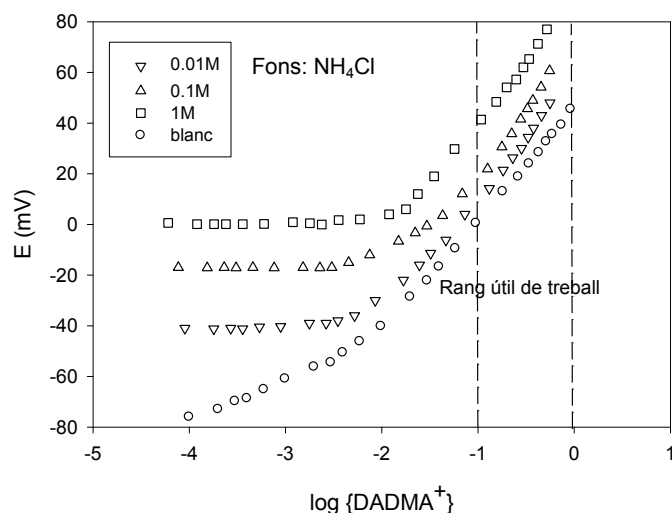


Figura 4.8. Calibratges de l'elèctrode de DADMA⁺ en un fons interferent de NH₄Cl a 3 concentracions diferents: 0.01M, 0.1M i 1M.

A la taula 4.5 es poden veure els paràmetres de resposta i els coeficients de selectivitat potenciomètrica dels elèctrodes de DADMA⁺ en dos possibles fons interferents (Na⁺ i NH₄⁺). Corroborant el que observàvem a les gràfiques, l'ió sodi no és un ió interferent, però l'ió amoni sí que ho és. Els coeficients de selectivitat per aquest ió són de l'ordre de 10⁻¹.

Taula 4.5. Sensibilitat (mV/dec), Límit de detecció (M), i coeficients de selectivitat potenciomètrica de l'elèctrode de DADMA⁺ pels ions interferents de sodi i amoni.

| Ió interferent | Concentració (M) | Sensibilitat (mV/dec) | LD | Log K ^{pot} _{DADMA⁺} |
|------------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|---|
| Na ⁺ | 10 ⁻² | 49.1 | 4.3·10 ⁻³ | - |
| Na ⁺ | 10 ⁻¹ | 47.2 | 4.9·10 ⁻³ | - |
| Na ⁺ | 1 | 50.3 | 6.9·10 ⁻³ | -2.15 |
| NH ₄ ⁺ | 10 ⁻² | 44.5 | 7.5·10 ⁻³ | -0.12 |
| NH ₄ ⁺ | 10 ⁻¹ | 47.5 | 6.0·10 ⁻² | -0.22 |
| NH ₄ ⁺ | 1 | 47.3 | 1.1·10 ⁻² | -0.33 |

Tot i la gran interferència de l'ió amoni, afortunadament aquesta limitació no afecta a les nostres necessitats, ja que en les condicions més adverses (amb una concentració d'ió amoni 1.0 M) l'elèctrode té un límit de detecció de 0.011 M, que equival a 1800 mg DADMAC/l. Els requeriments de DERYPOL exigeixen que el sensor sigui capaç de determinar la concentració de monòmer en el punt final de la reacció en dos dels seus polímers: el KD2025 i el K-240, on la concentració de DADMA⁺ oscil·la al voltant 12.000

mg/ pel KD2025 i de 20.000 mg/ pel K.240. Com es pot observar, és una concentració molt superior al límit de detecció de l'elèctrode. Per tant, podrem aplicar el sensor per la detecció de l'ió DADMA⁺ durant tota la reacció sense patir interferències.

4.2 APLICACIÓ INDUSTRIAL DEL SENSOR DE DADMA⁺ AMB MATRIU DE PVC.

De cara a l'aplicació dels elèctrodes al seguiment *in-line* pel control industrial, és necessari determinar quines són les característiques de resposta dels dispositius en l'entorn d'aplicació. En aquest cas concret, l'avaluació és complicada ja que les condicions de treball en matrius complexes i a altes temperatures poden afectar les característiques de resposta de l'elèctrode. Així, amb aquest estudi es qüestiona la viabilitat del sensor com a sistema de control dels processos d'interès.

Les primeres experiències es realitzen en un reactor pilot al laboratori de Derypol amb l'objectiu de conèixer d'antuvi la influència del medi de reacció sobre els sensors, atès que es tracta d'una suspensió especialment complexa. Es fa el seguiment d'un procés destinat a l'obtenció del producte KD2025 (on les concentracions inicial i final de DADMAC aproximades són respectivament 160.000 mg/l i 12000 mg/l (1 M i 0.08 M). Les primeres experiències són només orientatives, però ens serveixen per estudiar els següents aspectes:

- Influència de la deriva de la resposta
- Efecte de l'atmosfera de N₂ sobre el sistema electròdic
- Influència de la temperatura
- Influència del medi de treball

4.2.1.1 Estudis d'estabilització

La deriva és un dels problemes intrínsecs de tot tipus de sensor i, davant la possibilitat de realitzar mesures *in-line*, és important conèixer-ne la magnitud per tal d'introduir les correccions oportunes en els programes d'adquisició i tractament de dades.

És conegut que els ESIs presenten una deriva important durant les primeres hores de funcionament en solució però, després d'un determinat temps, aquesta disminueix i es fa constant, aproximadament 1mV/h. Per avaluar la deriva dels ESIs en el nostre procés es va mesurar el potencial dels sensors durant 8 hores en un medi similar al de la reacció (atmosfera de nitrogen, etc).

La deriva inicial de les dues primeres hores oscil·lava entre 2 i 10 mV/h aproximadament i després s'estabilitzava a valors inferiors a 2 mV/h. El temps d'estabilització de la deriva disminueix amb l'ús dels sensors, de manera que després de setmanes d'ús, el temps disminueix de 2 hores a aproximadament a 1 hora. A la taula 4.6 es mostra la resposta de quatre ESIs amb la seva corresponent deriva.

Taula 4.6. Deriva de la resposta de 4 elèctrodes selectius de DADMA⁺.

| Temps (h) | mV | | | |
|-----------|------|-----|-------|-------|
| | E1 | E2 | E3 | E4 |
| 0 | 113 | 119 | 110 | 114 |
| 1 | 103 | 129 | 115 | 113 |
| 2 | 98 | 126 | 109 | 111 |
| 6 | 98,2 | 127 | 111,5 | 109,5 |
| 8 | 97,6 | 128 | 113 | 108 |

La deriva dels sensors estudiats en el medi de producció del DADMAC és elevada, però cal considerar que una part de la variació del senyal correspon a la influència de la mescla del reactor.

Tenint en compte que la reacció dura 7 hores i que hi ha una disminució de la concentració de DADMA⁺ d'una dècada, esperariem una disminució teòrica del potencial d'uns 60 mV/dec. Així doncs assumim que en iniciar el procés hem de procurar que l'elèctrode tingui una deriva màxima de 2mV/h per considerar-lo estabilitzat. A partir d'aquest moment, ja podem iniciar la reacció i podrem relacionar la disminució del potencial amb la desaparició de DADMA⁺ amb un error assumible.

4.2.1.2 Efecte de la temperatura

La reacció de formació del polímer KD-225, té lloc a 42 °C, mentre que la reacció de formació del K-240 es du a terme a 60 °C. Amb l'objectiu de conèixer la resposta dels elèctrodes a aquestes temperatures s'han realitzat calibratges dels elèctrodes a 35 °C, 40 °C, 50 °C i 60 °C. En la figura 4.9 podem veure la representació de calibratges d'un mateix elèctrode a diferents temperatures.

La primera observació és que l'elèctrode respon a l'analit a les 4 temperatures assajades amb un comportament nernstià, observant-se un increment en el pendent de la recta, a mesura que augmentem la temperatura de treball. Per tant, podem treballar a temperatures més altes que les ambientals, ja que l'elèctrode no només respon, sinó que té més

sensibilitat com més alta és la temperatura de treball (previsible segons la llei de Nernst que controla el comportament d'aquestes membranes).

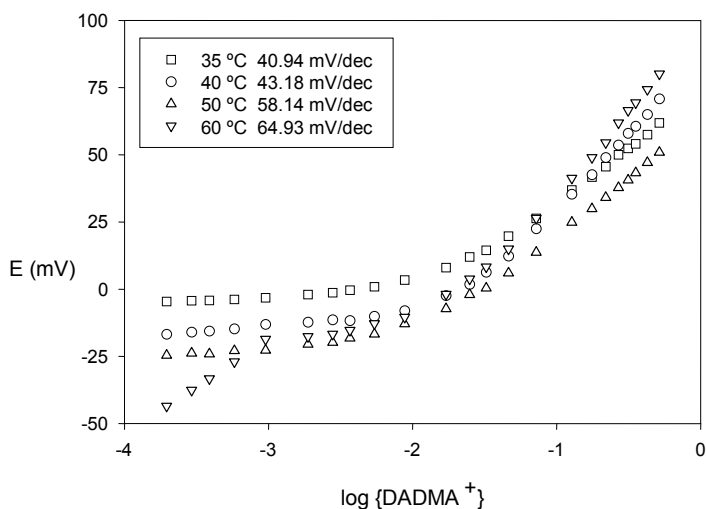


Figura 4.9. Calibratges de l'elèctrode de DADMA⁺ a 4 temperatures diferents.

4.2.1.3 Efecte del medi

Per establir l'operativitat del sensor és fonamental avaluar quin és l'efecte del medi de treball en la resposta de l'elèctrode. Per realitzar-ne una estimació s'han dut a terme diferents experiments per assegurar que el sensor respon a l'analit també en matrius complexes. Intentant simular al màxim les condicions reals de treball, es varen efectuar calibratges afegint volums coneguts d'una solució de DADMAC sobre les diferents matrius en que es sintetitzen els productes KD2025 i K-240 (subministrats per Derypol).

El KD2025 és un dels polímers que fabrica Derypol on la concentració de monòmer final és d'uns 12.000 mg DADMAC/l. És una solució molt viscosa, de color blanc, i de difícil manipulació alhora de fer calibratges.

Es submergiren els elèctrodes en una solució de KD2025, amb agitació constant, i deixant un temps d'estabilització del potencial mesurat. Es realitzà el calibratge dels elèctrodes segons el mètode de les solucions mesclades afegint DADMAC 3.7 M (609.000 mg/l), però la formació de grumolls sòlids, dificultava l'homogeneïtzació de la solució. Després de varies proves, es decidí afegir DADMAC més diluït, que es dilueix més fàcilment en la suspensió de KD2025 malgrat perdre rang de calibratge.

El K-240 és l'altre polímer estudiat on la concentració final d'analit oscil·la entre 20.000 i 15.000 mg/l. És una matriu que malgrat la seva viscositat, és menys complexa i més fàcil de manipular al realitzar els calibratges que l'anterior. Els experiments es duen a terme

seguint el mateix procediment que en el cas descrit anteriorment, però en aquests calibratges si que podem afegir DADMAC concentrat, augmentant així el rang de calibratge. A la taula 4.7 es poden veure les condicions de calibratge i els resultats obtinguts per ambdues matrius i a la figura 4.10 es poden veure ambdós calibratges, en ambdues matrius.

Taula 4.7. Condicions de calibratge de l'elèctrode selectiu de DADMA⁺ en les dues matrius emprades a Derypol: KD2025 i K-240.

| Fons de treball | 100 g KD2025 | 100 g K-240 |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| Solució afegida | DADMAC 150.000 mg/l (0.92M) | DADMAC (609.000 mg/l) (3.77 M) |
| Rang de calibratge | 12800-50.000 mg/l | 17.500-164.400 mg/l |
| Atmosfera | Nitrogen | Nitrogen |
| Temperatura | 42 °C | 60 °C |
| Sensibilitat (mV/dec) | 55.3 | 59.3 |

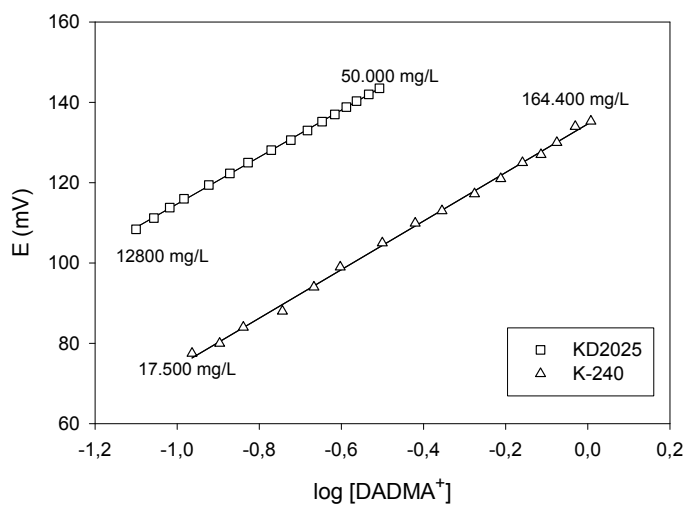


Figura 4.10 Calibratges de l'elèctrode de DADMA⁺ en les matrius KD2025 i K-240.

Un cop fetes aquestes experiències podem concloure que el sensor de DADMA⁺ respon satisfactòriament a l'analit en matrius complexes, a diferents temperatures i en l'atmosfera de treball (nitrogen).

4.2.1.4 Pseudocalibratges en condicions reals de producció

Sabem que l'elèctrode desenvolupat és sensible al monòmer DADMA⁺ però el que realment interessa és aplicar-lo als processos on aquest va desapareixent a mesura que es va polimeritzant per poder relacionar la disminució del potencial amb la concentració de monòmer. Així, abans de dissenyar un sistema analític automatitzat per fer el seguiment *in-line* dins el reactor industrial, i un cop estudiades les variables que poden afectar a la resposta del sensor es va fer el seguiment en continu en la producció pilot del producte KD2025, on la concentració de monòmer DADMAC va disminuint (aproximadament una dècada de 160.000 a 12.000 ppm) a mesura que transcorre la reacció.

Amb aquest objectiu s'introduí el sistema electròdic de mesura dins el reactor pilot (emprant un elèctrode de configuració convencional de disseny llarg). La mesura de potencial es portà a terme amb un potenciòmetre connectat a un registrador a través del qual es podia anar seguint l'evolució del senyal.

Després de deixar establir els elèctrodes durant 2 hores, i un cop verificada l'absència de deriva, es podia obtenir un registre del potencial en funció del temps de reacció. De manera independent, al llarg de la reacció, es prenen mostres del medi del reactor que s'analitzaven amb el mètode habitual a Derypol (cromatografia HPLC). L'objectiu era relacionar el potencial mesurat respecte de la concentració de DADMA⁺ analitzada en les mostres extretes. A la figura 4.11 podem veure les evolucions de la concentració i del potencial en funció del temps.

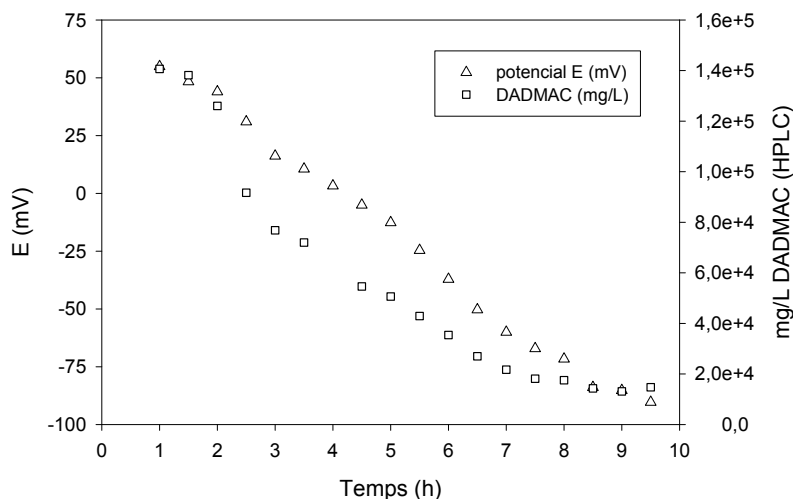


Figura 4.11. Evolució del potencial (mV) i de la concentració de DADMAC en funció del temps.

Podem veure com a mesura que transcorre la reacció, la concentració de monòmer va disminuint, atesa la polimerització que es va produint al llarg de tot el procés. Ens interessa conèixer el punt en què es considera acabada la reacció a través del potencial de l'elèctrode que, segons els protocols de Derypol, té lloc a 12000 ppm (0.075 M). A la figura 4.12, hi ha la representació en forma de calibratge que ens relaciona la diferència de potencial mesurada amb el sensor i la concentració de DADMAC mesurada amb el HPLC.

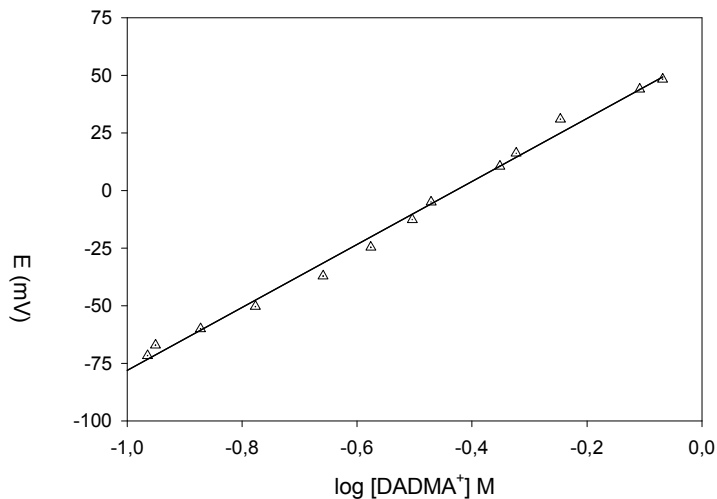


Figura 4.12. Representació en forma de pseudocorba de calibratge de la relació entre el potencial mesurat i la concentració de DADMAC en el reactor mesurada amb HPLC.

En aquest punt, tot i que no coneixem amb exactitud la concentració de DADMA⁺ ja que estan mesurats experimentalment, podem concloure que hi ha una relació lineal entre el logaritme de la concentració mesurada per HPLC i el potencial mesurat. Això ens permet controlar el procés de manera quantitativa ja que a DERYPOL els interessa una bona correlació entre la metodologia de control actual (HPLC) i la monitoritzada. Per a una possible aplicació es podrien preparar corbes de calibratge en què els valors de concentració de les solucions patró fossin les mesures per cromatografia, assegurant així la coherència amb la metodologia de l'empresa.

4.2.1.5 Reaccions en planta

Es van monitoritzar dos processos de producció del k-240 en planta. La reacció es va seguir a través d'un programa (Labview), que enregistrava el senyal del potenciòmetre (en mV) i el transformava en unitats de concentració. Prèviament es van calibrar els elèctrodes amb 4 solucions patró preparades en medi k-240 i es va ajustar una corba de calibratge.

En tots els processos es van agafar mostres del reactor en diferents moments i es van analitzar per HPLC, per tal de comparar-ne els resultats amb els donats pel sistema sensor (monitoritzador).

En la figura 4.13 es pot veure l'evolució de la concentració de DADMAC al llarg de tota la reacció. Gràcies al programari desenvolupat en entorn Labview, s'anaven recollint les dades de potencial que transformava en concentració a través d'una corba de calibratge preparada abans d'iniciar la reacció. Per tal de tenir una mesura de validació, es van extreure algunes mostres del reactor i es van analitzar per HPLC. Durant les primeres 4 hores de les reacció es van afegir 3 catalitzadors per tal d'accelerar la reacció. S'indica també a la figura 4.13 el moment on s'afegeix cada catalitzador.

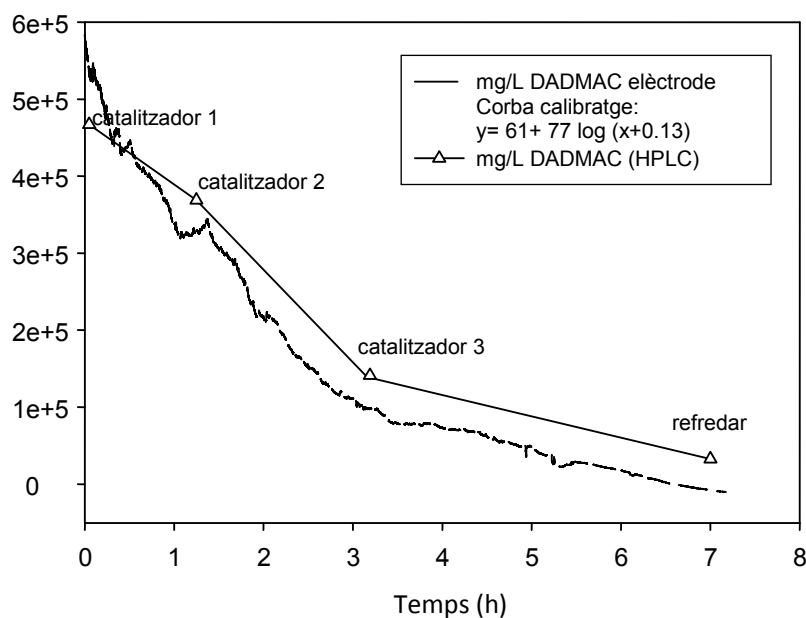


Figura 4.13. Evolució de la concentració de DADMAC en la reacció de producció del polímer K240.

Podem veure com la concentració mesurada per l'elèctrode és lleugerament inferior a la trobada amb la de l'HPLC. L'explicació d'aquestes diferències és difícil de donar només amb 2 monitoratges, ja que caldrien més experiències, però inicialment podem preveure un error degut a que les mostres no estan agafades del mateix lloc. Cal recordar que els elèctrodes estaven en una cassola que es mesclava relativament poc amb la resta del reactor, de manera que si la mescla del reactor no és molt homogènia, el sistema sensor i el cromatògraf poden estar analitzant mostres lleugerament diferents. Malgrat tot, es pot considerar que per ser unes proves inicials la correlació és força bona ja que les diferències de concentració entre ambdós mètodes no superen el 15%.

4.3 SENSORS POTENCIOMÈTRICS EMPRANT LA POLI(ÈTERÈTERCETONA) SULFONADA (SPEEK) COM A Matriu Polimèrica.

Tal i com s'ha comentat abastament a la introducció d'aquesta memòria de tesi, el PVC és el polímer universal més utilitzat per a la preparació de membranes potenciomètriques d'elèctrodes electius d'ions (ESIs). Com que l'objectiu d'aquest treball és la recerca i estudi de materials alternatius al PVC s'ha considerat una alternativa dins d'aquest camp de recerca el SPEEK (*Sulfonated Polyether Ether Ketone*) com a matriu polimèrica.

Els grups sulfònics enganxats a les cadenes del polímer li confereixen càrregues negatives, les quals provoquen que el SPEEK sigui un polímer conductor. En aquest estudi s'intentarà aprofitar les característiques d'aquest material per la construcció de membranes potenciomètriques.

L'objectiu d'estudiar aquest material és conèixer la influència de les càrregues negatives de la seva estructura sobre la resposta potenciomètrica, especialment pel que fa a l'efecte dels ions interferents. Conscients que l'ús d'una matriu amb càrrega negativa per fer un ESI per a un ió pot provocar diferències de selectivitat amb altres ions, per a aquest estudi s'han triat els ions amoni i nitrat perquè són abastament coneguts i perquè en el cas de l'amoni és un bon sensor de base per a la preparació de biosensors amb enzims que donen com a producte de la reacció NH_4^+ (ureasa, etc).

En primer lloc es van desenvolupar elèctrodes selectius d'ió amoni utilitzant SPEEK com a matriu polimèrica i per tal d'optimitzar la composició de la membrana s'estudià la relació polímer/solvent mediador/ionòfor. Els paràmetres avaluats foren la sensibilitat, rang lineal, interval de pH, límit de detecció, temps de vida i les interferències de diferents cations.

Seguidament es compararan les característiques de resposta d'aquests elèctrodes amb membrana de SPEEK amb elèctrodes de mateixa composició però amb membrana de PVC descrits a la bibliografia. Finalment es desenvolupen elèctrodes selectius de nitrat, i es comparen amb els desenvolupats anteriorment amb matriu de polisulfona i PVC.

4.3.1 ELECTRODE SELECTIU D'AMONI (ESI- NH_4^+)

En l'estudi que presentem a continuació s'estudia el SPEEK com a matriu polimèrica alternativa al PVC per a la preparació de membranes selectives a cations estudiant amb especial interès la influència de les càrregues negatives dels grups sulfònics de la membrana en la resposta de l'elèctrode. S'ha escollit un elèctrode selectiu d'amoni com a model per a l'estudi d'aquest polímer, ja que en el nostre grup de recerca existeix una

àmplia experiència en la construcció d'ESIs selectius d'aquest catió amb membranes de PVC. La nonactina actuarà com a ionòfor i el TEHP i el BBPA seran els solvents mediadors escollits.⁹

4.3.1.1 Optimització del material

Es va realitzar un estudi preliminar per tal d'optimitzar la quantitat de SPEEK en DMF tal i com es pot veure a la taula 4.8, mantenint la relació polímer/solvent mediador/ionòfor constant en totes les membranes. Les proporcions més concentrades (130 i 175 mg SPEEK/ml DMF) no es van poder preparar per la baixa solubilitat, i per tant, es va treballar inicialment amb les dues més diluïdes (50 i 95 mg/ml). Inicialment es va fer una primera deposició sobre la superfície de l'elèctrode per veure l'aspecte de les membranes, que tenien un color groguenc, no eren homogènies i trigaren al voltant de 2 hores en assecar-se. En ambdós casos, es van preparar tres sensors de cada un dels còctels sensors.

Taula 4.8. Sensibilitat (mV/dec) i Rang Lineal (M) dels elèctrodes construïts amb membranes de SPEEK.

| mg SPEEK / ml DMF | SPEEK (%) | Solvent Mediador (%) | Ionòfor (%) | Sensibilitat (D.S.) (mV/dec) | Rang Lineal |
|-------------------|-----------|----------------------|-------------|------------------------------|---------------------------------------|
| 50 | 31.4 | 66.9 | 1.7 | 38 (2.8) | $2 \cdot 10^{-4}$ - $3 \cdot 10^{-2}$ |
| 95 | 31.2 | 67.2 | 1.6 | 55 (4.1) | $6 \cdot 10^{-5}$ - $3 \cdot 10^{-2}$ |
| 130 | - | - | - | - | - |
| 175 | - | - | - | - | - |

Tal i com es pot veure a la taula 4.8 els dispositius amb una proporció de 95 mg SPEEK/ml de DMF presenten sensibilitats i rangs lineals superiors als dispositius amb 50 mg SPEEK/ml DMF. Així doncs, aquesta proporció és la que es va emprar en la resta de l'estudi.

4.3.1.2 Característiques de resposta de les membranes assajades

Es van preparar elèctrodes amb membranes de diversa composició per tal d'avaluar la influència de les proporcions relatives de polímer, solvent mediador i ionòfor en la membrana, així com del tipus de solvent mediador (es va provar el adipat de bis (1-butilpentil, BBPA) i el fosfat de tris (2-etilhexil) TEHP). La seva composició i les característiques de resposta dels ESIs desenvolupats es mostren a la Taula 4.9.

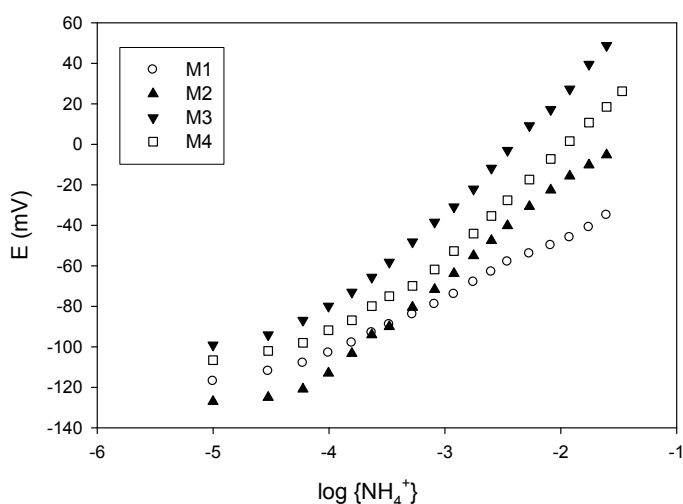
⁹ S. Alegret and E. Martínez-Fàbregas, *Biosens Bioelectron*, **4** (1989): 287.

Taula 4.9. Composició i característiques de resposta de totes les membranes estudiades.

| Composició de les membranes | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | M1 | M2 | M3 | M4 |
| Polímer: SPEEK (%) | 100 | 89 | 33 | 32 |
| Solvent mediador (%) | 0 | 0 | 63 (BBPA) | 65 (TEHP) |
| Ionòfor: Nonactina (%) | 0 | 11 | 4 | 3 |
| Característiques de resposta | | | | |
| Sensibilitat (mV/dec) | 28.6 | 46.3 | 58.3 | 53.8 |
| Rang lineal (M) | $9 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$ | $9 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$ | $8 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$ | $8 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$ |
| LD (M) | $7.3 \cdot 10^{-5}$ | $8.2 \cdot 10^{-5}$ | $7.0 \cdot 10^{-5}$ | $6.3 \cdot 10^{-5}$ |
| Rang de pH | 3 - 7 | 3 - 7.5 | 2 - 8 | 2.5 - 8 |
| Temps de vida (mesos) | 1-2 | 1-2 | 2 | 2 |

M1 representa el blanc, ja que només conté SPEEK, M2 és una membrana amb ionòfor i SPEEK, però sense solvent mediador, i M3 i M4, son membranes amb els 3 components, cada una amb un solvent mediador diferent.

Tal i com es pot veure a la Figura 4.14, hi ha resposta positiva en M1 degut probablement a les càrregues negatives del polímer, però amb un pendent inferior al dels altres sensors. L'absència de solvent mediador en M2 afecta les característiques de resposta d'aquesta membrana ja que obtenim un pendent sub-nerstià. Es pot observar que la presència d'aquest en les membranes M3 i M4 millora la resposta de l'elèctrode en termes de sensibilitat i temps de vida, però no altera el rang lineal, ni el LD de l'elèctrode.

**Figura 4.14.** Resposta potenciomètrica del ESI d'ió amoni amb les 4 membranes de SPEEK

Els resultats obtinguts eren previsibles tenint en compte la naturalesa del polímer. Les càrregues negatives dels grups sulfònics del SPEEK poden provocar unes interaccions electrostàtiques que influeixen en la resposta de l'elèctrode. Tot i així, l'obtenció de sensibilitats superiors en les membranes on hi havia nonactina (M2, M3 i M4) ens fa pensar que, a més de les interaccions electrostàtiques, segurament hi ha un mecanisme de resposta basat en la interacció NH_4^+ -ionòfor.

Es van realitzar calibratges dels ESI amb M2, M3 i M4 en diferents fons iònics. A la taula 4.10, podem veure les sensibilitats i els límits de detecció de les diferents membranes assajades, en 4 fons iònics diferents. Es tornen a repetir les conclusions que hem extret en els calibratges anteriors on les membranes sense solvent mediador (M2) mostren sensibilitats sub-nerstianes per tots els fons iònics estudiats. La presència del solvent millora substancialment la resposta dels ESIs, però malgrat les sensibilitats siguin comparables amb els calibratges sobre aigua, els límits de detecció són substancialment més alts, indicant doncs certa interferència del medi (taules 4.9 i 4.10).

Taula 4.10 Sensibilitats (mV/dec) i límits de detecció (LD) dels ESIs d'amoni per totes les membranes assajades en diferents fons iònics. Els resultats entre parèntesi són la desviació estàndard de 3 calibratges diferents.

| Fons iònic | M2 | | M3 | | M4 | |
|--|----------|---------------------|----------|---------------------|----------|---------------------|
| | mV/dec | LD (M) | mV/dec | LD (M) | mV/dec | LD (M) |
| NaCl $1 \cdot 10^{-3}$ M | 49.5 (2) | $5.4 \cdot 10^{-4}$ | 52.0 (2) | $6.7 \cdot 10^{-4}$ | 53.8 (4) | $5.1 \cdot 10^{-4}$ |
| CaCl₂ $1 \cdot 10^{-3}$ M | 44.2 (6) | $7.3 \cdot 10^{-4}$ | 59.2 (8) | $7.8 \cdot 10^{-4}$ | 56.9 (9) | $8.5 \cdot 10^{-4}$ |
| KCl $1 \cdot 10^{-3}$ M | 42.4 (7) | $7.6 \cdot 10^{-4}$ | 57.7 (5) | $3.7 \cdot 10^{-4}$ | 49.8 (4) | $4.7 \cdot 10^{-4}$ |
| LiCl $1 \cdot 10^{-3}$ M | 38.2 (5) | $3.1 \cdot 10^{-4}$ | 55.1 (5) | $3.7 \cdot 10^{-4}$ | 58.1 (2) | $3.2 \cdot 10^{-4}$ |

4.3.1.3 Diagrama de Riley

Tenint en compte que el SPEEK té càrregues negatives, és probable que la concentració d'ions hidrogen en el medi pugui afectar el senyal de la membrana. Així doncs, es va mesurar la influència del pH en la resposta potenciomètrica dels elèctrodes a una concentració de $1 \cdot 10^{-3}$ M de NH_4^+ per a totes les membranes assajades (taula 4.9). A la figura 4.15 hi ha representada la resposta del ESI amb M3 (membrana amb BBPA) i el que podem observar és que dins el rang de 2 a 8 de pH, la resposta del elèctrode és independent

d'aquest. A pHs superiors a 8 la resposta disminueix, probablement degut al desplaçament de l'equilibri $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ cap a la desaparició del ió amoni i la formació del NH_3 .

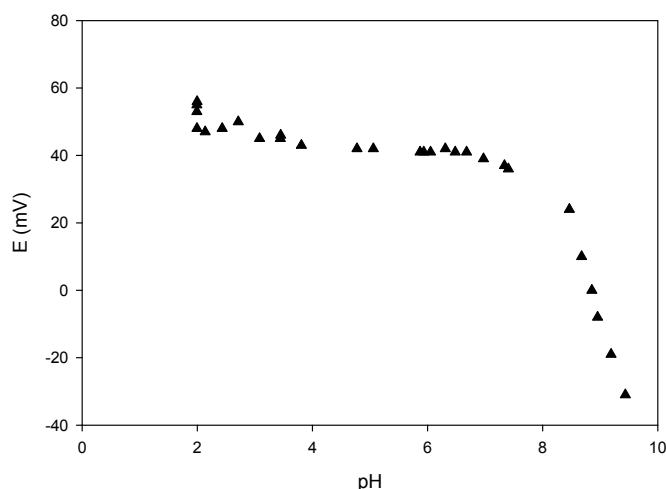


Figura 4.15. Estudi del pH dels elèctrodes selectius de NH_4^+ amb M3 a una concentració constant de $1.0 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

4.3.1.3 Estudi de les Interferències

A fi de seleccionar la millor membrana, també es va dur a terme l'estudi de les interferències amb el mètode de la interferència fixa (FIM). En comparar els coeficients de selectivitat potenciomètrica de totes les membranes assajades (taula 4.11) es pot observar que, els diferents elèctrodes gairebé no són més selectius a ió amoni que a la resta de cations interferents estudiats, Na^+ , K^+ , Li^+ i Ca^{2+} . Els valors són tots del mateix ordre i molt alts (coeficients de l'ordre de 10^{-1}) fet que denota una molt baixa selectivitat de l'elèctrode respecte l'analit d'interès. El ió més interferent és el potassi, degut probablement a la similitud de mides entre aquest i l'amoni. La interferència del calci, és degut a les dues càrregues positives.

Sorprenentment, la presència del solvent mediador en les membranes M3 i M4 no millora la selectivitat d'aquestes, per tant, l'absència o presència del solvent a la membrana no marca cap diferència en la resposta dels elèctrodes quan els calibrem en un fons iònic interferent.

També hem buscat a la bibliografia elèctrodes d'ió amoni amb membrana de PVC^{10,11,12} per poder comparar els coeficients de selectivitat d'aquests amb el ESI amb membrana de

¹⁰ O.G. Davies, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, *Analyst* **113** (1988): 49.

¹¹ P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wroblewski, *Analyst* **108** (2003): 283.

¹² M.S. Gauri, J.D.R. Thomas, *Analyst* **119** (1994): 2323.

SPEEK i s'observa que els ESIs amb membrana de PVC presenten una selectivitat molt millor, amb unes K_{POT} 100 o 1000 vegades més petites, excepte pel potassi on tenen el mateix ordre de magnitud. Això ens fa pensar que la presència de càrregues negatives a la membrana genera un senyal poc selectiu amb la majoria de cations de la solució.

Taula 4.11 Coeficients de selectivitat potencimètrica dels ESIs d'amoni per totes les membranes assajades

| Ió interferent | M2 | M3 | M4 | [10] | [11] | [12] |
|-----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Na ⁺ | $1.4 \cdot 10^{-1}$ | $2.1 \cdot 10^{-1}$ | $1.4 \cdot 10^{-1}$ | $2.3 \cdot 10^{-3}$ | $2.1 \cdot 10^{-3}$ | $7.9 \cdot 10^{-3}$ |
| K ⁺ | $2.1 \cdot 10^{-1}$ | $1.9 \cdot 10^{-1}$ | $2.2 \cdot 10^{-1}$ | $1.5 \cdot 10^{-1}$ | $1.3 \cdot 10^{-1}$ | $3.9 \cdot 10^{-2}$ |
| Li ⁺ | $9.0 \cdot 10^{-2}$ | $1.3 \cdot 10^{-1}$ | $1.0 \cdot 10^{-1}$ | - | $1.2 \cdot 10^{-4}$ | $5.0 \cdot 10^{-4}$ |
| Ca ²⁺ | $2.2 \cdot 10^{-1}$ | $1.6 \cdot 10^{-1}$ | $1.1 \cdot 10^{-1}$ | $1.1 \cdot 10^{-4}$ | $3.0 \cdot 10^{-4}$ | $2.5 \cdot 10^{-3}$ |

La conclusió que es pot extreure d'aquest treball amb membranes de SPEEK, és que la preparació d'elèctrodes selectius d'ions emprant aquest material és factible, amb uns resultats comparables a les membranes convencionals en quant a sensibilitat, rang lineal, interval de pH i LD. La resposta nerstiana d'aquests elèctrodes indica la compatibilitat del ionòfor amb aquesta matriu, fins i tot en absència de solvent medidor. Però la limitació principal es troba en la selectivitat de l'elèctrode ja que les càrregues negatives del polímer provoquen interaccions electrostàtiques amb tots els cations donant lloc a una baixa selectivitat. Com a contrapartida, pensem que podem aprofitar aquestes característiques pel desenvolupament d'ESIs per anions, on tindriem l'efecte contrari, millorant la selectivitat dels dispositius.

4.3.2 ELECTRODE SELECTIU DE NITRAT (ESI-NO₃⁻)

Arran de l'estudi i optimització del SPEEK com a matriu polimèrica per a un sensor de cations i degut a les característiques del material, vàrem considerar interessant estudiar aquesta matriu per a un sensor d'anions. Així doncs, en el present treball que va donar lloc a l'article presentat en aquesta memòria (Art.3), es proposa de nou l'optimització de la composició d'una matriu polimèrica de SPEEK per a un sensor de nitrat, contenint nitrat de tetra octil amoni (T8) com a ionòfor responsable del reconeixement i el NPOE com a solvent medidor, igual que vàrem utilitzar per al ESI selectiu a aquest anió amb matriu de polisulfona.¹³

¹³ A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, *Sens. Actuators, B* **115** (2006): 691.

En aquest estudi d'optimització d'un elèctrode selectiu de nitrat amb membrana de SPEEK es van utilitzar els components i proporcions de la membrana estudiats anteriorment per l'elèctrode d'amoni (95 mg SPEEK /ml DMF).¹⁴ Així doncs, es va preparar una membrana que contenia un 30 % de SPEEK, 65 % de NPOE com a solvent mediador i un 5 % d'ionòfor. Es van estudiar les característiques de resposta de l'elèctrode: sensibilitat, rang lineal, límit de detecció, interval de pH, interferències i temps de vida.

4.3.2.1 Característiques de resposta dels elèctrodes

La corba de calibratge de l'elèctrode de nitrat sota un fons d'aigua destil·lada es pot veure a la figura 4.16, on s'observa una resposta positiva a aquest anió, amb una sensibilitat de -50.8 mV/dec, un límit de detecció de $5 \cdot 10^{-5}$ M i un rang lineal de concentració entre $8 \cdot 10^{-5}$ i $2.5 \cdot 10^{-2}$.

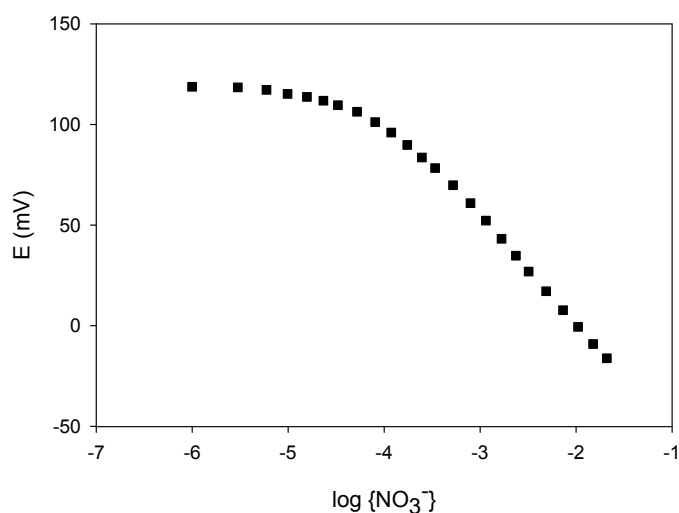


Figura 4.16. Resposta potenciomètrica del ESI de nitrat amb membrana de SPEEK.

A la primera columna de la taula 4.12 es poden observar els resultats corresponents als paràmetres de calibratge dels sensors preparats amb la membrana de SPEEK. La segona columna mostra els valors obtinguts en l'anterior estudi basat en membranes de polisulfona¹³ i la tercera columna mostra els resultats d'un elèctrode de PVC trobat a la bibliografia¹⁵ ja que els autors van utilitzar el mateix ionòfor que en aquest treball i la comparació de resultats és més significativa. És interessant remarcar, que tots els elèctrodes empenen el mateix ionòfor, el T8.

¹⁴A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, *Analytica Chimica Acta*, **577** (2006): 85

¹⁵R. Pérez-Olmos, A. Rios, J.R. Fernández, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, *Talanta*, **53** (2001):741.

Taula 4.12. Característiques de resposta dels sensors de nitrat amb membrana de SPEEK, Polisulfona i PVC.

| | SPEEK- ESI-NO ₃ ⁻ | PS – ESI-NO ₃ ⁻¹³ | PVC – ESI-NO ₃ ⁻¹⁵ |
|-----------------------|---|---|--|
| Sensibilitat (mV/dec) | -50.8 (1.1) | -57.2 (3.3) | -57.5 (0.2) |
| Rang lineal (M) | $8 \cdot 10^{-5} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ | $5 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$ | $6.5 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-2}$ |
| LD (M) | $5.0 \cdot 10^{-5} (1.5 \cdot 10^{-5})$ | $3.0 \cdot 10^{-5} (1.0 \cdot 10^{-5})$ | $1.9 \cdot 10^{-5}$ |
| Rang de pH | 4-8 | 2.5 – 12 | 3.5-11 |
| Temps de vida (mesos) | 1 | 1 | >12 |

Es pot observar que la majoria dels paràmetres de resposta del sensor amb matriu de PS i PVC són una mica millors que els del sensor amb matriu de SPEEK. Les sensibilitats són més altes, el rang lineal i el rang de pH lleugerament superior i els límits de detecció són una mica inferiors.

Per avaluar la reproductibilitat i el temps de vida dels elèctrodes, els vam calibrar periòdicament durant un temps global de 2 mesos. Els paràmetres que vam anar seguint, la sensibilitat i el rang lineal es poden veure a la taula 4.13.

Taula 4.13. Sensibilitats i Rang lineal dels ESIs de nitrat durant un període de 2 mesos. Els valors entre parèntesi son la desviació estàndard resultat de 5 calibratges successius.

| Temps (dies) | Sensibilitat (mV/dec) | Rang Lineal (M) |
|--------------|-----------------------|---|
| 1 | -51.3 (1.9) | $8.0 \cdot 10^{-5} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 7 | -50.4 (1.5) | $8.0 \cdot 10^{-5} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 14 | -52.4 (1.2) | $8.0 \cdot 10^{-5} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 21 | -50.6 (1.8) | $1.0 \cdot 10^{-4} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 28 | -49.4 (1.5) | $1.0 \cdot 10^{-4} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 35 | -44.3 (2.0) | $5.0 \cdot 10^{-4} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 42 | -40.2 (2.3) | $5.0 \cdot 10^{-4} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 49 | -35.2 (1.9) | $5.0 \cdot 10^{-4} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |
| 56 | -30.8 (1.6) | $5.0 \cdot 10^{-4} - 2.5 \cdot 10^{-2}$ |

Podem observar, que durant el primer mes tant la sensibilitat com el rang lineal es mantenen en uns valors molt pròxims als inicials. És a partir d'aleshores que notem una pèrdua de sensibilitat i també una disminució del rang de treball, molt probablement degut al *leaching* de l'ionòfor. El fet de perdre algun dels components de la membrana afecta irreversiblement i negativa a la resposta d'aquesta. Així doncs, determinem el temps de vida d'aquest dispositius al voltant d'un mes.

4.3.2.2 Efecte del pH

Igual que ens els estudis anteriorment presentats, també es va avaluar la influència del pH en la resposta del ESI de nitrat amb membrana de SPEEK, a una concentració de NO_3^- constant de $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Inicialment s'ajustà el pH de la solució amb àcid clorhídric diluït, i es van anar fent microadicions d'hidròxid de sodi també diluït. Tal i com es pot veure a la figura 4.17, el rang de treball de l'elèctrode és de 4 a 8, ja que a partir d'aquest valor hi ha una davallada important del potencial de l'elèctrode.

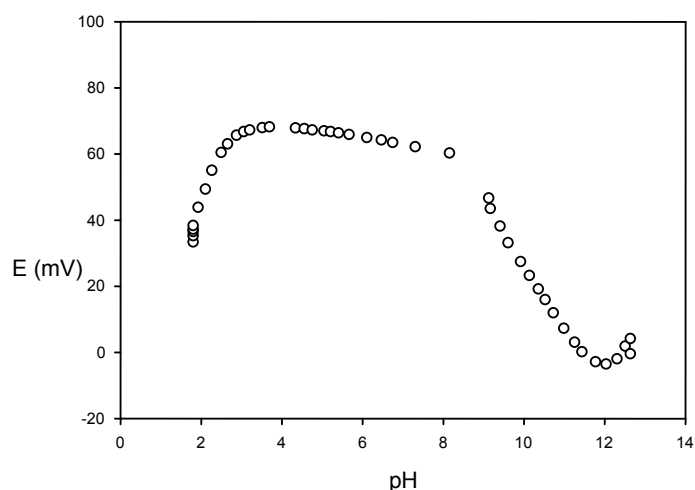


Figura 4.17. Influència del pH en el potencial de resposta del ESI de nitrat a una concentració de $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

4.3.2.3 Estudi de les interferències

No ens podíem deixar un dels estudis més importants de cara a l'aplicació dels sensors en mostres reals. Així doncs, es va dur a terme, amb el mètode de la interferència fixa (FIM), l'estudi de les interferències per els anions següents: F^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , HCO_3^- i Cl^- a una concentració constant d'interferent de $1 \cdot 10^{-2} \text{M}$. S'han escollit aquests anions perquè son els més comuns en mostres reals on també es troba el nitrat (aigües potables, aigües

residuals...etc.)

Els resultats els podem veure a la taula 4.14, on podem analitzar els coeficients de selectivitat potenciomètrica (en forma logarítmica), del ESI de nitrat amb membrana de SPEEK, i comparar-los amb els coeficients dels elèctrodes del mateix anió, amb el mateix ionòfor, però amb diferent membrana polimèrica.

És molt important remarcar les diferències observades en la selectivitat del sensor segons la matriu polimèrica emprada. Per a tots els ions estudiats, excepte pel HCO_3^- , (en l'elèctrode basat en la matriu de PS) els coeficients de selectivitat són inferiors per als elèctrodes amb membrana de SPEEK. Aquesta millora en la selectivitat es podria explicar per la repulsió de les càrregues negatives dels grups sulfonats del polímer amb els anions interferents de la solució. És lògic pensar, que aquesta repulsió afectaria a tots els anions per igual, però pensem que l'afinitat del ionòfor pel nitrat és lleugerament superior a aquesta repulsió, fet que permetria al nitrat interaccionar amb la fase membrana més que la resta d'anions. Aquesta hipòtesis, es veu corroborada pels resultats obtinguts: una millora en la selectivitat de l'elèctrode.

Taula 4.14. Logaritme del coeficient de selectivitat potenciomètrica dels elèctrodes de nitrat amb matrius polimèriques de SPEEK, Polisulfona i PVC.

| Ió interferent | Concentració (M) | SPEEK ESI- NO_3^- | POLISULFONA ESI- NO_3^- [13] | PVC ESI- NO_3^- [15] |
|---------------------|------------------|-------------------------------|--|----------------------------------|
| F^- | 0.01 | -3.06 | -2.62 | -2.25 |
| HPO_4^{2-} | 0.01 | -3.72 | -2.95 | - |
| SO_4^{2-} | 0.01 | -3.5 | -2.90 | -3.36 |
| HCO_3^- | 0.01 | -2.66 | -2.73 | - |
| Cl^- | 0.01 | -2.28 | -2.14 | -1.4 |

Els resultats obtinguts emprant una membrana de SPEEK com a matriu polimèrica per un elèctrode selectiu a anions permeten afirmar que aquest polímer sulfonat es presenta com una alternativa a les membranes de PVC per a la determinació d'anions. La selectivitat d'aquesta membrana en front d'anions interferents és substancialment millor, i la sensibilitat, rang lineal i límit de detecció són comparables. L'únic inconvenient observat és el temps de vida d'aquests dispositius, inferior als dispositius amb membranes de PVC i també el rang de treball de pH, limitat només a un interval entre 4 i 8.

4.3.3. CONCLUSIONS

Una anàlisi global dels resultats obtinguts en el desenvolupament de dos elèctrodes selectius d'ions, emprant el SPEEK com a matriu polimèrica ens mostra que, per una banda, s'han pogut corroborar les hipòtesis plantejades inicialment. Les càrregues negatives de la membrana provoquen interaccions electrostàtiques amb els cations de la solució obtenint-ne bones sensibilitats, rangs lineals i límits de detecció per l'ESI d'amoni, però una baixa selectivitat, ja que gairebé no hi ha discriminació dels ions interferents. Això acaba per ser una limitació, ja que si pensem en aplicacions futures en mostres reals, ens trobarem altres cations interferents a les mostres, dificultant la detecció de NH_4^+ .

Per altra banda aquestes càrregues negatives redueixen la interacció dels anions presents a la solució amb la membrana, fenomen que millora la selectivitat dels ESIs d'anions. El model que hem escollit per demostrar la viabilitat d'aquesta matriu com a polímer per la construcció d'ESIs, ens ha corroborat aquesta millora mostrant uns coeficients de selectivitat menors que els de les membranes de PVC. Això vol dir que amb una combinació d'un ionòfor prou selectiu i el SPEEK com a matriu polimèrica, podem construir ESIs per a anions de gran selectivitat, que acaba per ser uns dels paràmetres bàsics a considerar quan apliquem els sensors en mostres reals.

4.4 BIOSENSORS AMB METAL·LOTIONEÏNES EMPRANT LA POLISULFONA (PS) COM A Matriu POLIMÈRICA.

4.4.1 ELÈCTRODE SELECTIU DE PLATA (ESI- Ag^+)

Fins a l'actualitat s'han descrit i desenvolupat molts elèctrodes selectius d'ions de metalls de transició basats en setis fixos (habitualment membranes cristal·lines) o bé en membranes líquides amb un portador mòbil.¹⁶

Una limitació d'aquestes últimes és que els ionòfors han de ser molt lipòfils ja que si no se'n produeix una pèrdua (*leaching*) cap a la fase aquosa amb la consegüent reducció del temps de vida del sensor. Pel mateix motiu, el PVC o altres matrius (els poliuretans, els polisiloxans, etc.) també han de ser molt lipòfiles per contenir-hi la fase orgànica extractant (solvent mediador) que haurà de contenir el complex ionòfor-metall.

Una altra limitació d'aquest tipus de membranes és la dificultat per incorporar-hi material biològic ja que gairebé sempre es preparen en dissolvents orgànics que no dissolen bé les proteïnes, anticossos, etc, i que sovint afecten la seva activitat posterior.¹⁷ Com s'ha

¹⁶ G.J. Moody, *J. Biomed. Eng.*, **7** (1985): 183.

¹⁷ S.G. Cha, D. Liu, M.E. Meyerhoff, A.C. Cantor, A.R. Mdgley, H.D. Goldberg, R.B. Brow, *Anal. Chem.*, **63** (1991): 1666.

explicat anteriorment, en la present tesi s'han construït sensors amb matriu de polisulfona, material que fins a l'actualitat no s'havia utilitzat per a la construcció d'aquests dispositius i que degut a la seva estabilitat química i biològica és un material atractiu per al disseny de biosensors potenciomètrics ja que permet, per una banda la incorporació de material d'origen biològic (enzims^{18,19,20} i anticossos^{21,22}) durant el procés d'inversió de fase, i per altra el seu ús com a matriu per a la preparació de membranes potenciomètriques²³ tal i com hem explicat anteriorment. Així, ens hem plantejat incorporar metal·loproteïnes a l'interior de la matriu de polisulfona. El mecanisme de reconeixement es basa en la capacitat d'aquestes proteïnes per formar compostos de coordinació amb diferents metalls, obtenint així biosensors potenciomètrics en sentit estricte ja que una part de la membrana és d'origen biològic.

En aquest estudi s'han utilitzat metal·lotioneïnes (MTs) com a ionòfors (de mamífer MT1²⁴ i d'eriçó de mar SpMTA²⁵) per la seva capacitat de complexar diferents metalls, en particular l'ió plata. Així, hem obert la possibilitat d'utilitzar proteïnes hidrosolubles perfectament immobilitzades en una membrana que no inhibeix la seva capacitat d'interacció amb els metalls, donant així una resposta potenciomètrica. Això és possible perquè incorporem el material biològic a la membrana durant el procés d'inversió de fase. Aquest procediment d'immobilització presenta, entre d'altres avantatges, que la proteïna gairebé no rep cap agressió al llarg del procés (sempre està en un medi aquós a pH controlat) i que en cal poca quantitat ja que la majoria queda a la solució de treball que pot ser reutilitzada diverses vegades.

Així doncs, l'objectiu del present treball és demostrar que es poden utilitzar proteïnes hidrosolubles, en aquest cas metal·lotioneïnes, com a ionòfors en una matriu polimèrica de la polisulfona. És important destacar que, a diferència del PVC, aquest material permet la incorporació de material biològic dins la membrana sense alterar-lo apreciablement.

¹⁸ B. Prieto-Simon, E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2006): 131.

¹⁹ B. Prieto-Simon, E. Fàbregas, A. Hart, *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007): 2663.

²⁰ B. Prieto-Simón, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, *Talanta*, **71** (2007): 2102.

²¹ Sanchez, S.; Fàbregas, E. *Biosens. Bioelectron.*, **22** (2007): 965.

²² Sanchez, S.; Pumera, M.; Cabruja, E.; Fàbregas, E. *Analyst*, **132** (2007): 142.

²³ González-Bellavista, A.; Macanás, J.; Muñoz, M.; Fàbregas, E. *Sens. Actuators B*, **115** (2006): 691.

²⁴ Robbins, A. H.; McRee, D. E.; Williamson, M.; Collett, S. A.; Xuong, N. H.; Furey, W. F.; Wang, B. C.; Stout, C. D. *J. Mol. Biol.* **221** (1991): 1269.

²⁵ Riek, R.; Prêcheur, B.; Wang, Y.; Mackay, E. A.; Wider, G.; Güntert, P.; Liu, A.; Kägi, J. H. R.; Wüthrich, K. *J. Mol. Biol.* **291** (1999): 417.

4.4.1.1 *Avaluació preliminar de la membrana sensora*

Tenint en compte les característiques especials d'aquesta membrana, com són l'ús de metal·lotioneïnes com a ionòfors i l'absència de solvent mediador en la membrana, s'ha fet un estudi preliminar d'algunes variables que podrien afectar la resposta de l'elèctrode com són la reproductibilitat de preparació de les membranes, la concentració de metal·lotioneïna, i les condicions de conservació dels elèctrodes.

L'objectiu dels primers calibratges és conèixer d'antuvi el comportament dels sensors en un primer entorn poc agressiu. A partir d'aquí, podem determinar els paràmetres de resposta habituals (sensibilitat, rang lineal, límit de detecció, i el temps de vida) i finalment s'estudiarà l'efecte del pH i de l'efecte de possibles interferències.

Així, es construïren elèctrodes emprant com a ionòfors 2 metal·lotioneïnes diferents: la MT1 de mamífer i la SpMTA d'equinoderm, concretament de ratolí i d'eriçó de mar, respectivament.

La primera variable a optimitzar és el volum de solució proteica necessari per la deposició de 3 membranes iguals sobre la superfície dels elèctrodes en el procés d'inversió de fase, ja que ens interessa gastar el mínim volum possible de solució de MT i treballar sempre amb replicats. Es va comprovar que emprant 100 microlitres de solució de metal·lotioneïna podíem depositar 3 membranes iguals i que la manualitat del procés no afectava la resposta dels sensors, ja que no es van observar diferències apreciables en les característiques de resposta entre els elèctrodes construïts de la mateixa manera.

La segona variable més important fou optimitzar la concentració de solució de MT que emprem per a la construcció dels elèctrodes. Vam provar-ne tres ($5.0 \cdot 10^{-5}$, $1.0 \cdot 10^{-5}$, $5.0 \cdot 10^{-4}$ M) per ambdós MTs.

Per últim vam estudiar les condicions de conservació dels elèctrodes (guardats en sec i en solució de AgNO_3 0.01 M, ambdós a 4 °C).

Tal i com es pot observar a la taula 4.15, la concentració de solució de MT no és una variable que afecti la resposta dels elèctrodes, ja que tant la sensibilitat, com el rang lineal i el límit de detecció d'aquests són pràcticament iguals en totes les membranes estudiades i per ambdós ionòfors assajats.

Taula 4.15. Composició i característiques de respostes de tots els elèctrodes construïts. Els resultats entre parèntesi són les desviacions estàndard obtingudes del calibratge de 3 ESIs en 3 corbes de calibració diferents.

| Composició de les membranes | | | | | | | |
|------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Ionòfor | Zn ₇ -MT1 | Zn ₇ -MT1 | Zn ₇ -MT1 | Zn ₇ -MT1 | Zn ₇ -SpMTA | Zn ₇ -SpMTA | Zn ₇ -SpMTA |
| Concentració MT | $5.0 \cdot 10^{-5}$ | $1.0 \cdot 10^{-4}$ | $5.0 \cdot 10^{-4}$ | $1.0 \cdot 10^{-4}$ | $5.0 \cdot 10^{-5}$ | $1.0 \cdot 10^{-4}$ | $1.0 \cdot 10^{-4}$ |
| Conservació dels elèctrodes | sec | sec | sec | humit | sec | sec | humit |
| Nom de la membrana | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 |
| Característiques de resposta | | | | | | | |
| Sensibilitat (mV/dec) | 61 (4) | 58 (2) | 62 (5) | - | 61 (5) | 61 (4) | - |
| Rang lineal (M) | $2 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-2}$ | $5 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-2}$ | $5 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-2}$ | - | $5 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-2}$ | $4 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-2}$ | - |
| Log LD (M) | -4.8 (0.2) | -4.4 (0.3) | -4.4 (0.2) | - | -4.4 (0.2) | -4.5 (0.3) | - |
| Temps de vida (mesos) | 2 | 2 | 2 | 0.30 | 2 | 2 | 0.12 |

El que si és interessant ressaltar és la única variable que influeix en la resposta dels elèctrodes: les condicions de conservació. En la Figura 4.18 es mostra l'evolució dels elèctrodes guardats en sec (A) i en solució (B) (tots ells a 4 °C), durant els deu primers dies. Es pot observar com aquests últims empitjoren la resposta potenciomètrica. En només deu dies consecutius, i independentment de l'ionòfor emprat, hi ha un pèrdua de les característiques de resposta inicials que sembla mostrar l'empitjorament de la capacitat extractant del receptor al llarg del temps. Els sensors conservats en solució tenen un temps de vida aproximat de 10 dies, mentre que els conservats en sec i a 4 °C duren fins a més de 2 mesos. Aquest fet ens porta a concloure que es necessari conservar els elèctrodes en sec i a una temperatura de 4 °C.

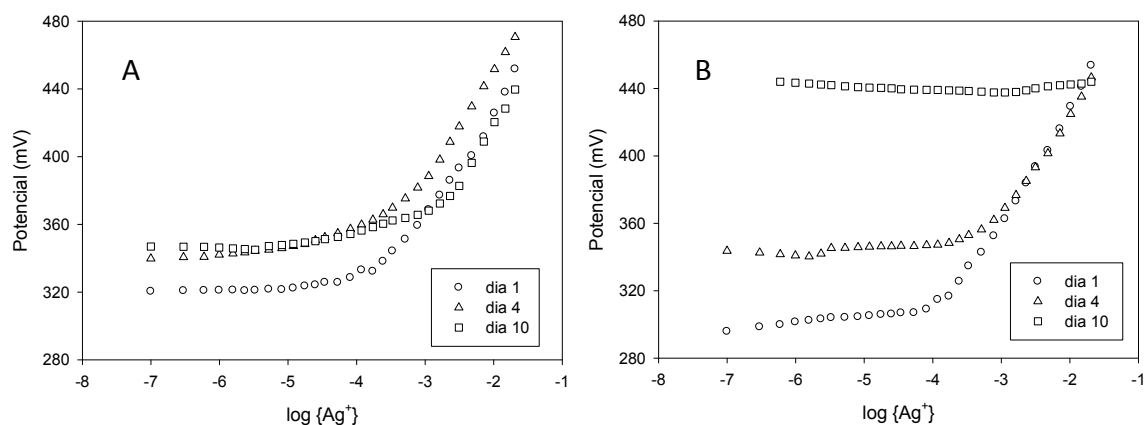


Figura 4.18. Evolució dels elèctrodes guardats en sec (a) i guardats en solució (b), ambdós a 4 °C.

Aquest fet experimental contradiu la literatura on s'exposa que les MTs s'oxiden en entrar en contacte amb l'oxigen i per tant és necessari mantenir-les en una atmosfera inert.²⁶ El que creiem és que probablement dins la membrana porosa de polisulfona es creen unes condicions que eviten l'oxidació dels residus de cisteïna de les MTs. A partir d'aquest estudi vàrem descartar les membranes que guardàvem en solució (M4 i M7).

Així doncs, de totes les membranes assajades, vàrem escollir els elèctrodes amb la membrana M1 basats en MT1, i amb la membrana M5 basats en SpMTA per prosseguir amb la resta d'experiments, ja que són els que tenen una concentració de MT més baixa ($5.0 \cdot 10^{-5}$ M) afavorint així l'estalvi de metal·loproteïna.

4.4.1.2 Influència del pH

S'ha avaluat l'estabilitat de la resposta dels elèctrodes enfront del pH mitjançant l'estudi dels diagrames potencial/pH, a concentració d'ió Ag^+ constant. Aquestes representacions ens poden informar, també, sobre la presència de possibles equilibris en solució que modifiquin la concentració lliure de l'espècie a determinar. La figura 4.19 mostra els resultats obtinguts al llarg d'un ampli interval de valors de pH pels elèctrodes que contenen MT1 i SpMTA.

Els intervals de pH en què el senyal es manté estable varien en funció de la concentració d'ió plata en ambdós sensors. Això és raonable, ja que com més concentrada en ió plata sigui la solució, menor ha d'ésser la concentració d'ió hidroxil necessària per a què es compleixi el producte de solubilitat de l'hidròxid de plata i per tant es produeix la precipitació a pH inferior.

Els intervals de pH a diferents concentracions d'ió plata per als elèctrodes presentats es poden veure a la taula 4.16. Podem observar que el rang de treball és molt ampli, cosa que facilita molt l'ús dels elèctrodes presentats, ja que una variació raonable del pH durant una anàlisi no altera les mesures de potencial.

²⁶ Bontidean, I.; Berggren, C.; Johansson, G.; Csoregi, E.; Mattiasson, B.; Lloyd, J. R.; Kenneth, K. J.; Jakeman, J.; Brown, N. L. *Anal. Chem.*, **70** (1998): 4162.

Taula 4.16 Interval de pH per als elèctrodes basats en MT1 i SpMTA assajats a tres concentracions d'ió plata diferents.

| Concentració Ag^+ (M) | Rang de pH | |
|--------------------------------|------------|---------|
| | MT1 | SpMTA |
| 0.1 | 1.5-7.7 | 1.5-8.0 |
| 0.01 | 1.5-8.4 | 2.0-8.3 |
| 0.001 | 1.6-10.3 | 1.8-9.7 |

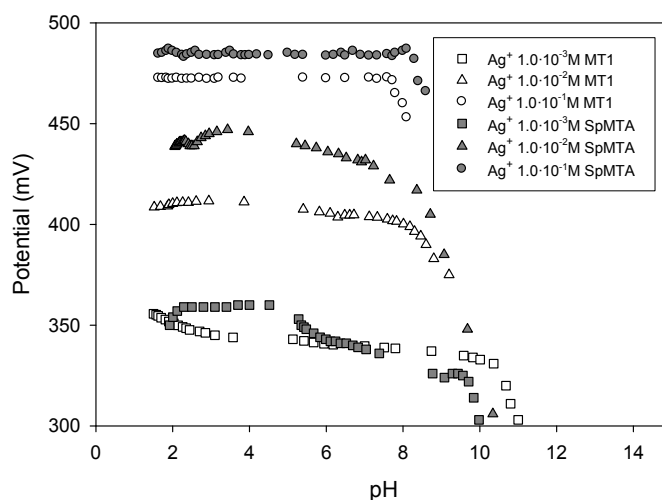


Figura 4.19. Estudi de la influència del pH dels elèctrodes selectius de Ag^+ amb MT1 i SpMTA a diferents concentracions d'ió plata: 10^{-1} , 10^{-2} i 10^{-3} M.

4.4.1.3 Interferències

L'estudi d'interferències és important per a una futura aplicació del sensor. Tenint en compte que l'ionòfor és una metaloproteïna capaç de reaccionar amb diferents metalls (plom, cadmi, zinc, coure, mercuri i plata), ens interessa saber si el nostre sensor és més selectiu a l'ió plata que a la resta dels metalls esmentats. Per tant, hem estudiat l'efecte que produïen aquests ions sobre la resposta dels elèctrodes.

L'afinitat de les metal·lotioneïnes envers els metalls pesants segueix una ordenació propera a la dels tiolats²⁷: $\text{Hg (II)} \gg \text{Cu (I)} \approx \text{Ag (I)} \gg \text{Cd (II)} > \text{Pb (II)} > \text{Zn (II)}$. En base a això, podem esperar possibles interferències d'alguns d'aquests ions metàl·lics, especialment del mercuri, que ocupa el primer lloc a la sèrie, sobre els elèctrodes de plata (basats en MT1 i SpMTA) que s'han construït en aquest treball. Així doncs, per conèixer l'efecte de la resta dels metalls esmentats sobre el nostre sensor d'ió plata, hem estudiat l'efecte que produïen aquests ions sobre la resposta de les membranes. Per a cada interferència s'han estudiat tres

²⁷ Vasak, M. *Methods in Enzymology*, **205** (1991): 452.

concentracions de fons diferents, excepte pel mercuri per al que només se n'han provat dues degut a la poca solubilitat de la sal de partida. (vegeu la taula 4.17).

De forma general, l'elèctrode basat en MT1, no presenta alteracions en les característiques de resposta quan és calibrat en presència del qualsevol dels ions metàl·lics considerats. Només en el cas del mercuri es pot afirmar que existeix una interferència real, ja que veiem una considerable disminució de la sensibilitat i un augment del límit de detecció de l'elèctrode.

Respecte a l'elèctrode basat en SpMTA, el mercuri també influeix negativament sobre les seves característiques de resposta. A més a més, i a diferència de l'elèctrode basat en MT1, a concentracions elevades d'interferent (10^{-1} M) observem un augment del LD de l'elèctrode en presència de Pb^{2+} i Zn^{2+} . El comportament de l'elèctrode en presència de la resta de metalls estudiats no presenta diferències respecte a quan és calibrat en un fons iònic de Na^{+} . Per tant, descartem l'efecte interferent de la resta de metalls.

Taula 4.17. Sensibilitats i LD dels elèctrodes basats en MT1 i SpMTA en diferents fons interferents. Els resultats entre parèntesi són les desviacions estàndard obtingudes a partir de 3 corbes de calibratge.

| MT | Medi iònic | 10^{-3} M | | 10^{-2} M | | 10^{-1} M | |
|-------|--------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| | | Sensibilitat (mV/dec) | Log LD | Sensibilitat (mV/dec) | Log LD | Sensibilitat (mV/dec) | Log LD |
| MT1 | $NaNO_3$ | 63(4) | -4.3 (0.9) | - | - | 61(3) | -3.7 (0.4) |
| | $Pb(NO_3)_2$ | 60 (3) | - 4.3 (0.3) | 63 (4) | - 4.4 (0.3) | 65 (5) | - 4.7 (0.4) |
| | $Cd(NO_3)_2$ | 59 (2) | - 4.2 (0.4) | 59 (5) | - 4.9 (0.5) | 60 (5) | - 4.7 (0.3) |
| | $Zn(NO_3)_2$ | 59 (4) | - 4.0 (0.6) | 63 (4) | - 3.5 (0.4) | 61 (6) | - 4.4 (0.7) |
| | $Cu(NO_3)_2$ | 55 (1.4) | - 4.1 (0.2) | 58 (1.3) | - 4.5 (0.3) | 59 (1.6) | - 4.2 (0.2) |
| | $Hg(NO_3)_2$ | 28 (2) | - 2.2 (0.1) | 24 (2) | - 1.9 (0.1) | - | - |
| SpMTA | $NaNO_3$ | 69 (0.8) | -5.1 (0.3) | - | - | 66 (0.5) | -3.6 (0.8) |
| | $Pb(NO_3)_2$ | 62 (1.6) | - 3.4 (0.1) | 70 (0.5) | - 3.3 (0.6) | 79 (5) | - 2.3 (0.3) |
| | $Cd(NO_3)_2$ | 67 (1.3) | - 3.4 (0.1) | 60 (0.1) | - 3.6 (0.4) | 59 (2) | - 4.1 (0.2) |
| | $Zn(NO_3)_2$ | 64 (0.2) | - 3.3 (0.1) | 66 (4) | - 4.6 (0.5) | 66 (0.9) | - 3.2 (0.1) |
| | $Cu(NO_3)_2$ | 63 (0.2) | - 4.7 (0.5) | 61 (0.1) | - 4.8 (0.3) | 65 (0.2) | - 4.5 (0.7) |
| | $Hg(NO_3)_2$ | 22 (0.2) | - 3.7 (0.5) | 18 (4) | - 1.6 (0.2) | - | - |

Per avaluar el grau d'interferència dels metalls considerats sobre l'elèctrode selectiu de plata presentem a la figura 4.20 els coeficients de selectivitat potenciomètrica d'ambdós elèctrodes basats en MT1 i SPMTA, respectivament.

Per ambdós elèctrodes, si es complís l'ordre d'afinitat esmentat anteriorment de les metal·lotoneïnes per als metalls estudiats, esperaríem que l'elèctrode fos més selectiu a mercuri que a plata, fet que no succeeix, ja que, malgrat la forta capacitat interferent

d'aquest, l'elèctrode ha estat preparat amb el complex Ag-MT i li confereix una afinitat inicial. Per tant, no podem corroborar que l'ordre d'afinitat de les metal·lotioneïnes en membrana sigui exactament el mateix que en solució. Tot i així, si que es compleix en part la hipòtesis plantejada anteriorment, on esperàvem que el mercuri seria el metall més interferent, tal i com es pot comprovar amb l'elevat valor de la seva K^{pot} . Els baixos valors de les K^{pot} de la resta de metalls denoten l'efecte interferent nul per l'elèctrode basat en MT1, mentre que per l'ESI basat en SpMTA si que s'observa una lleugera interferència del plom i del zinc que només pot ser explicada si ens basem amb les diferents propietats de coordinació metàl·lica de les dues MTs emprades per a la construcció d'aquests ESIs.

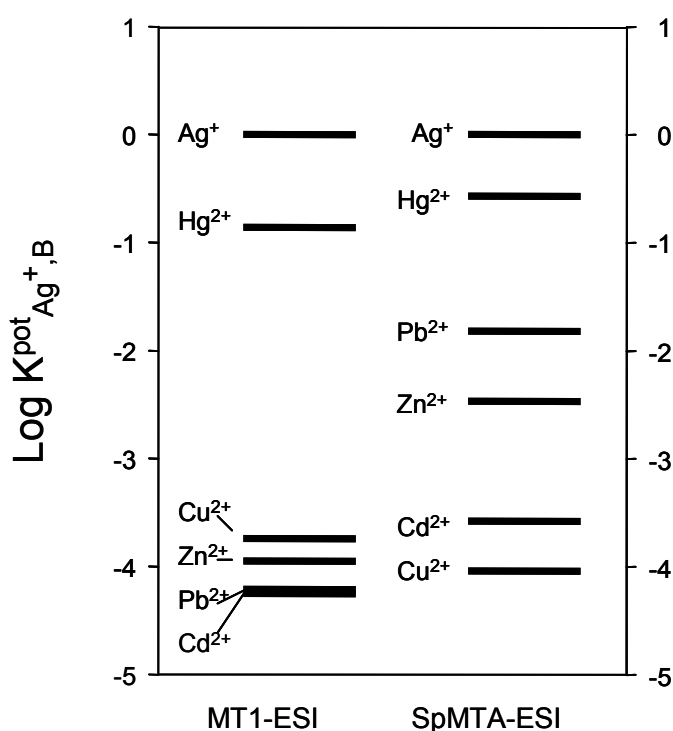


Figura 4.20. Coeficients de selectivitat potenciomètrica dels elèctrodes basats en MT1 i SpMTA.

Per explicar la interferència del plom sobre l'elèctrode basat en SpMTA, s'ha de tenir en compte que els lligands O-donadors presenten més afinitat per al Pb^{2+} que per a Ag^+ . Sabent que SpMTA té 7 aminoàcids que poden ser considerats lligands O-donadors i MT1 només en té 2, és lògic que l'elèctrode que conté SpMTA mostri una major afinitat per al Pb^{2+} que el que conté un menor contingut d'aminoàcids O-donadors (elèctrode amb MT1), tal i com manifesten les nostres dades experimentals.

La major interferència del Zn en l'elèctrode basat en SpMTA podria ser explicada per la ja descrita fortalesa de l'enllaç Zn-S en MTs d'equinoderm. A la literatura s'ha proposat que

aquest enllaç és 3000 vegades més feble²⁸ en MTs de mamífer que en equinoderm, motiu pel qual s'explica que el Zn no sigui un metall interferent en l'elèctrode basat en MT1 i si que ho sigui en l'elèctrode basat en SpMTA.

Així doncs, és interessant remarcar que les diferents propietats coordinants d'aquestes dues MTs es veuen reflectides en les característiques de resposta dels elèctrodes construïts amb cadascuna d'elles, sobretot en presència d'altres metal·lotioneïnes.

4.4.2 ELÈCTRODE SELECTIU DE METAL·LOTIONEÏNES

Arran de l'èxit obtingut en la incorporació de metal·lotioneïnes unides a ions metàl·lics en membranes de polisulfona,²⁹ es va plantejar la possibilitat d'utilitzar aquests elèctrodes selectius per a determinar les pròpies metal·lotioneïnes. Cal recordar que aquestes proteïnes en solució són espècies iòniques que poden interaccionar amb el complex que hi ha a la membrana. Els mètodes emprats per la detecció d'aquestes, com ja s'ha comentat extensament en la introducció d'aquest treball són eficaços, però presenten dificultats associades a la determinació de les MTs, convertint la quantificació d'aquestes en una tasca incòmoda. De tota manera, hi ha problemes en els protocols per la majoria de mètodes i aquests són implícits en la naturalesa de la proteïna: l'oxidació de les MTs i el polimorfisme que presenten.

Dins d'aquest escenari, i aprofitant tot el coneixement previ sobre els elèctrodes selectius d'ions, es va desenvolupar i estudiar un ESI selectiu de metal·lotioneïnes (MTs). Fins al moment de la publicació d'aquest treball (Art.5) no s'havia proposat cap elèctrode selectiu de proteïnes, essent per tant, el primer elèctrode potenciomètric per a proteïnes que permet la quantificació directa de MTs.

Es van construir elèctrodes selectius de metal·lotioneïna de mamífer MT1 que incorporaven Zn₇-MT1 dins la membrana actuant com a iònofor.

4.4.2.1 Avaluació de la membrana sensora

Aprofitant tot el treball d'optimització fet anteriorment sobre la membrana sensora (reproductibilitat de preparació de les membranes, concentració de MT, condicions de conservació dels elèctrodes), es va passar directament a l'estudi de les característiques de resposta dels elèctrodes (sensibilitat, rang lineal, límit de detecció, temps de vida, efecte del pH i presència de possibles interferències).

²⁸ Wang, Y.; Mackay, E. A.; Kurasaki, M.; Kägi, J. H. R. *Eur. J. Biochem.*, **225** (1994): 449.

²⁹ Anna González-Bellavista, Silvia Atrian, Maria Muñoz, Mercè Capdevila, Esteve Fàbregas, *Talanta*, **77** (2009): 1528

Així doncs, es construïren elèctrodes emprant com a ionòfor Zn_7 -MT1 de mamífer, concretament de ratolí. La concentració de solució proteica emprada per la preparació de les membranes sensores fou de $5.0 \cdot 10^{-5}$ M, i els elèctrodes es van guardar en sec a $4^\circ C$ durant tot el període d'estudi.

Els primers calibratges (vegeu figura 4.21) indiquen una resposta positiva dels elèctrodes amb una sensibilitat mitjana de -53 mV/dec. Els límits de detecció foren també molt baixos (al voltant de $1.0 \cdot 10^{-7}$ M). Això demostra la resposta dels elèctrodes a la MT1.

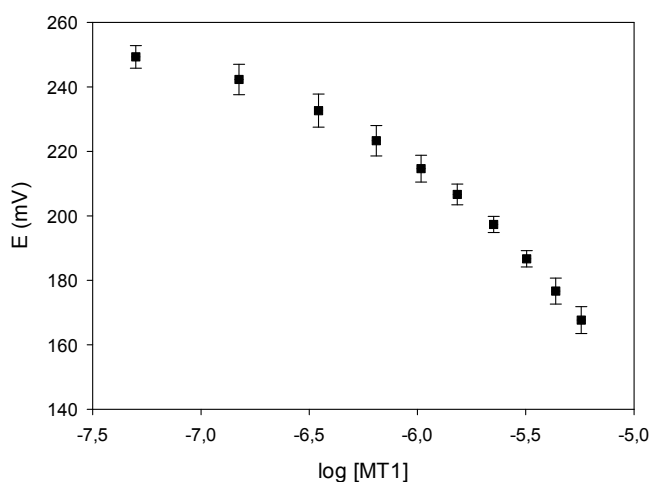


Figura 4.21. Calibratges dels l'elèctrode de MT1 en fons d'aigua mili-q. Les barres són les desviacions estàndard obtingudes a partir de 3 corbes de calibratge.

4.4.2.2 Influència del pH

També s'ha determinat l'estabilitat de la resposta dels elèctrodes enfront del pH, mitjançant els diagrames de potencial/pH, a concentració constant de MT1.

Es determina que el rang operacional de pH d'aquests biosensors és entre 2 i 7, tal i com es pot veure a la figura 4.22, ja que dins aquest interval no s'observen canvis en el potencial dels elèctrodes. Tenint en compte que s'han descrit valors de pK_a al voltant de 5.0,³⁰ per les Zn -MTs de mamífers, aquests resultats mostren que el mètode també és vàlid per apo-MTs i per MTs parcialment metal·lades, formes que d'acord amb alguns autors,³¹ s'estan rebel·lant com a protagonistes importants de la especiació de les MT.

³⁰ L.J. Jiang, M. Vasak, B. L. Vallee and W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97** (2000): 2503.

³¹ Y. Yang, W. Maret and B. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98** (2001): 5556.

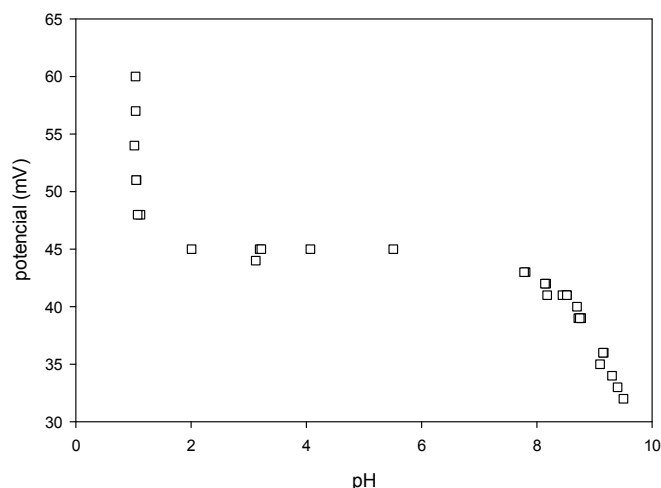


Figura 4.22. Efecte del pH sobre els elèctrodes selectius de MT1 a una concentració constant de MT1 de $4.0 \cdot 10^{-6} M$.

4.4.2.3 Interferències

Pensant en aplicacions reals, no podem subestimar la presència d'altres analits, en aquest cas, proteïnes que podrien interferir en la resposta dels elèctrodes. S'ha demostrat la resposta positiva dels ESIs de MT1, però sense altres espècies que podrien afectar la resposta del sensor en cas de ser-hi presents.

Es va estudiar la resposta dels ESIs de MT1, en presència de MT4, per determinar el grau d'interferència d'aquesta proteïna mitjançant el mètode de la interferència fixa (FIM), on es realitza una corba de calibratge en presència d'una concentració de fons d'espècie interferent que es manté invariable (en aquest cas, a una concentració fixa de $1 \cdot 10^{-6} M$).

S'ha escollit la metal·lotioneïna MT4 com a model de proteïna interferent, degut a la seva gran similitud a les isoformes de les MT de mamífer, tal i com es pot veure a la taula 4.18. Una segona raó per escollir a MT4, és la presència d'aquesta en mostres biològiques, convertint-se doncs en una possible interferència real.

Taula 4.18. Seqüència d'aminoàcids de les isoformes de MT1 i MT4 de ratolí. Ambdues amb els residus de cisteïnes, que provoquen la coordinació amb els ions metàl·lics.

MT1 MDP-NCSCSTGGSCTCTSSCACKNKCTSCCKSCCSCCPVGC SKCAQGCVCKGAADKCTCCA

MT4 MDPGECTCMSGGICICGDNCKCTTCSCKTCRKSCCPCCPPGCAKCAARGCICKGGSDKCSCCP

Tal i com es pot veure a la figura 4.23, hi ha una certa selectivitat de l'elèctrode a MT1, en presència de MT4 ($K^{pot} = 0.054$), ja que al comparar els dos calibratges representats, les dues corbes tendeixen a solapar-se a concentracions superiors a $3 \cdot 10^{-6}$ M de MT1. Això vol dir, que la resposta de l'elèctrode a MT1 es veu afectada per la presència de MT4, però considerant que estem comparant MTs de mamífer que són relativament semblants, considerem que la selectivitat en aquestes primeres experiències és acceptable.

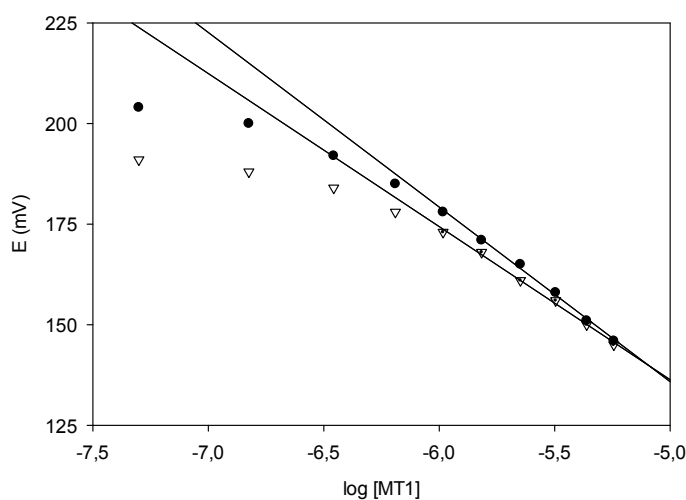


Figura 4.23. Calibratge de l'elèctrode selectiu de MT1 en un fons de calibratge d'aigua (cercles), i en un fons interferent de MT4 a $1 \cdot 10^{-6}$ M (triangles).

4.4.3. CONCLUSIONS

El que podem concloure després de veure els resultats d'aquests dos últims treballs és que podem emprar les metal·lotioneïnes metal·lades com a ionòfors per a la construcció de biosensors potenciomètrics amb membranes de polisulfona, on gràcies al procés d'inversió de fase, el material biològic no es veu alterat durant el procés de formació de la membrana.

Per l'estructura i composició de la membrana, pensem que ambdós biosensors, tant el d'ió plata com el de MT1, presenten un mecanisme de resposta similar a les membranes de bescanvi iònic, però amb la particularitat que la interacció entre l'ionòfor i l'analit correspon a un mecanisme de complexació. Això confereix una major selectivitat a l'elèctrode, depenent de les diferents afinitats de l'analit i els interferents amb l'ionòfor. Això explicaria, en el cas del biosensor de MT1, la seva selectivitat a MT1 en presència de MT4, ja que aquesta última és menys afí en l'enllaç de complexació amb el Zn (II).

Cal dir també que són els primers en emprar una proteïna (metal·lada) com a element de reconeixement o ionòfor, amb el gran avantatge que no cal cap procés de regeneració després del seu ús, com passa amb els sensors de capacítància descrits a la bibliografia.^{32,33}

Així doncs, un dels grans punts destacables d'aquest dos últims estudis és presentar biosensors amb les característiques dels ESIs: baix temps de resposta, robustesa dels dispositius, temps de vida llarg, i sobretot molt econòmics degut a la poca quantitat de solució de metal·lotioneïna requerida per la membrana. Addicionalment a aquestes característiques positives, no calen processos d'incubació ni de regeneració. Això els fa molt atractius si pensem en l'automatització de processos aplicables a l'anàlisi *in-line*.

³² I. Bontidean, J. Ahlqvist, A. Mulchandani, W. Chen, W. Bae, R. K. Mehra, A. Mortari, E. Csöregi, *Biosens. Bioelectron.*, **18** (2013): 547.

³³ I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csöregi, B. Mattiasson, J. R. Lloyd, K. J. Kenneth, J. Jakeman, N. L. Brown, *Anal. Chem.*, **70** (1998): 4162.

Capítol 5

CONCLUSIONS

5. Conclusions

En aquesta tesi s'han plantejat una sèrie d'objectius, basats principalment en l'aplicació de polímers sulfonats per a la construcció d'elèctrodes selectius d'ions i biosensors potenciomètrics. Els dos polímers que s'han emprat han estat la polisulfona i el SPEEK.

Les conclusions del present treball són:

1. S'ha demostrat la viabilitat de la polisulfona com a matriu polimèrica per a la construcció de quimiosensors potenciomètrics (ESIs).

En el cas de l'elèctrode selectiu de nitrat (ESI-NO₃⁻), escollit com a model d'ESI d'anions:

- ✓ S'ha determinat que la solució de polisulfona per a la preparació de les membranes sensores ha de tenir una concentració de 100 mg de PS/1 ml de DMF.
- ✓ S'ha definit que la millor proporció dels components de la membrana és de un 30 % de polímer, un 65 % de solvent mediador i un 5 % d'ionòfor. Amb aquestes proporcions s'han obtingut els millors paràmetres de resposta.

- ✓ S'han provat 2 solvents mediadors: el DBP i el NPOE. S'ha escollit el NPOE per a la construcció de les membranes sensores degut a que els elèctrodes construïts amb aquest solvent, presentaven millors sensibilitats i rangs lineals que els construïts amb DBP. Com a ionòfor es va emprar el T8, degut a l'experiència anterior en el nostre grup de recerca.
 - ✓ S'ha determinat que el rang de treball de l'elèctrode està comprès entre un pH de 2.5 i 12.0.
 - ✓ S'ha fet l'estudi de les interferències i s'ha observat que el fluorur i hidrogencarbonat són els anions més interferents, ja que presenten uns coeficients de selectivitat més alts. Tot i així, l'elèctrode és 400 vegades més selectiu de l'ió nitrat que aquests anions.
 - ✓ S'ha determinat que el temps de vida del dispositiu és al voltant d'un mes.
2. S'ha desenvolupat un elèctrode selectiu d'ions per a la monitorització del DADMAC en control de processos industrials.
- ✓ S'han avaluat membranes de portador mòbil per desenvolupar un elèctrode selectiu de DADMA⁺, tant amb matriu polimèrica de polisulfona, com de PVC. La selecció de la membrana òptima es fa en funció de la sensibilitat, el rang de resposta i el temps de vida de l'elèctrode. Les membranes estudiades tenen com a ionòfor el TEHP, i el DOP com a solvent mediador (i també plastificant en la membrana de PVC). La seleccionada com a òptima conté un 25 % de PVC, un 70 % de DOP i un 5 % de TEHP. S'ha escollit la membrana amb matriu polimèrica de PVC per a l'aplicació industrial en planta, degut a la major robustesa que presenta el dispositiu, ja que l'aplicarem en condicions adverses.
 - ✓ De l'estudi de la influència del medi de treball (matrius complexes i molt concentrades), temperatura, i atmosfera de nitrogen, s'ha observat que l'elèctrode respon satisfactòriament en tot el rang de treball.
 - ✓ S'ha estudiat la deriva dels elèctrodes i s'ha demostrat que s'estabilitzen després de dues hores de funcionament.
 - ✓ S'han fet experiències en un reactor pilot i s'ha comprovat com aquest sensor és capaç de seguir *in-line* el procés.

- ✓ S'ha desenvolupat un programa amb el LABVIEW per tal de monitoritzar el senyal i calcular la concentració de DADMAC, a partir d'una corba de calibratge.
 - ✓ S'ha observat que una corba de calibratge construïda a partir de 4 patrons permet obtenir resultats experimentals en tot el rang de treball amb una diferència al voltant d'un 10-15 % respecte les mesures puntuals efectuades amb HPLC. S'observen diferències entre ambdós mètodes, degudes segurament, a la presa manual de mostra de llocs diferents del reactor.
 - ✓ S'ha aconseguit desenvolupar un sensor potenciomètric selectiu de DADMAC efectiu en el rang de concentracions d'interès per a Derypol.
 - ✓ El sensor desenvolupat permet monitoritzar la concentració de DADMAC en processos industrials. Fins l'actualitat el seguiment d'aquest reactiu només es podia realitzar *at-line* amb una tècnica que exigeix personal qualificat, temps i manipulació de la mostra.
3. S'ha demostrat la viabilitat del SPEEK com a matriu polimèrica per a la construcció de quimiosensors potenciomètrics (ESIs).

Pel que fa a l'elèctrode selectiu d'amoni (ESI-NH_4^+), escollit com a model de cations:

- ✓ S'ha determinat que la solució de SPEEK per a la preparació de les membranes sensores ha de tenir una concentració de 95 mg de SPEEK/1 ml de DMF.
- ✓ S'han avaluat 4 membranes amb composicions diferents, i s'ha demostrat la compatibilitat de l'ionòfor amb aquesta matriu i la viabilitat de construcció de membranes sense solvent mediador, tot i que la incorporació d'aquest millora substancialment la resposta de l'elèctrode pel que fa a sensibilitat, però no en quant a selectivitat.
- ✓ S'ha comprovat el que ja es preveia inicialment tenint en compte la naturalesa del polímer: les càrregues negatives dels grups sulfònics del SPEEK poden provocar unes interaccions electrostàtiques que influeixen en la resposta de l'elèctrode. Comparant les K^{pot} de l'elèctrode desenvolupat amb les referenciades a la literatura per altres ESIs amb membrana de PVC, es fa palesa la baixa selectivitat de l'elèctrode respecte l'analit d'interès.

En el cas de l'elèctrode selectiu de nitrat (ESI-NO₃⁻), escollit com a model d'anions, s'han construït elèctrodes selectius de nitrat amb matriu de SPEEK i s'han comparat amb els anteriorment descrits amb matriu de polisulfona selectius del mateix anió i amb un elèctrode trobat a la bibliografia amb matriu de PVC. Tots 3 incorporen dins la membrana el mateix ionòfor, el T8.

- ✓ S'ha observat que alguns paràmetres de resposta del sensor amb matriu de SPEEK són lleugerament inferiors, que els dels sensors amb matriu de PS i PVC. Les sensibilitats són més baixes, el rang lineal i el rang de pH lleugerament més estrets i els límits de detecció són una mica superiors.
 - ✓ S'ha observat que els coeficients de selectivitat d'aquesta membrana en front d'anions interferents són menors i per tant, substancialment millors que els coeficients de selectivitat de les membranes de polisulfona i PVC.
 - ✓ S'ha corroborat la hipòtesi inicial on predèiem que les càrregues negatives del SPEEK redueixen la interacció dels anions presents a la solució amb la membrana. Aquest fenomen afecta especialment els anions interferents degut a que la interacció analit-ionòfor és superior a la repulsió de càrregues, fet que permet obtenir un elèctrode més selectiu.
4. S'ha demostrat la viabilitat de la polisulfona com a matriu polimèrica per a la construcció de biosensors potenciomètrics, ja que s'hi poden incorporar proteïnes hidrosolubles (concretament metal·lotioneïnes), com a ionòfors dins d'aquestes membranes.

En el cas de l'elèctrode selectiu de plata:

- ✓ S'ha definit la concentració de solució de metal·lotioneïna dins la membrana sensora a una concentració de $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$.
- ✓ S'ha observat que els elèctrodes han d'estar conservats en sec i a 4°C per mantenir les característiques de resposta inicials. Si els conservem en aquestes condicions, el temps de vida dels dispositius és de 2 mesos.
- ✓ S'han estudiat 2 metal·lotioneïnes diferents (de mamífer MT1, i d'eriçó de mar SpMTA) com a ionòfors dins la membrana de PS, i s'ha demostrat la viabilitat d'ambdues com a element de reconeixement de l'ió plata, ja que ambdues membranes presentaven sensibilitats, rangs lineals i límits de

detecció molt similars. Tot i així, cal destacar que el biosensor amb MT1 presentava millor selectivitat de l'ió plata, que el biosensor amb SpMTA.

- ✓ S'ha determinat que el rang de treball dels elèctrodes està comprès entre un pH de 1.5 i 8.
- ✓ S'ha estudiat l'efecte interferent que produïen els ions plom (II), cadmi (II), zinc (II), coure (II), mercuri (II) sobre la resposta dels elèctrodes. S'han triat aquests tenint en compte la gran afinitat dels dos ionòfors emprats (MT1 i SpMTA) per complexar aquests metalls.
- ✓ S'ha observat que l'elèctrode basat en MT1, no presenta canvis en les seves característiques de resposta en presència dels metalls estudiats (excepte per al mercuri) si comparem les sensibilitats i els LD, amb les observades en un fons de calibració d'aigua. El cas del mercuri, si que representa una interferència per a les mesures de plata(I) amb aquest elèctrode.
- ✓ Per l'elèctrode basat en SpMTA, hem trobat algunes diferències significatives. A més a més de la interferència del mercuri, també podem observar interferències dels ions plom (II) i zinc (II).
- ✓ Així doncs, s'ha demostrat que les diferents propietats coordinants d'aquestes dues metal·lotioneïnes (MT1 i SpMTA) es veuen reflectides en les característiques de resposta dels elèctrodes en quant a la selectivitat.

Atès que aquestes membranes no contenen cap solvent mediador, considerem que aquests sensors presenten un mecanisme de resposta semblant a les membranes de bescanvi iònic, però en aquest cas, la interacció entre l'ionòfor i l'analit seria un mecanisme de complexació, conferint major selectivitat a l'elèctrode.

En el cas del elèctrode selectiu de MT1:

- ✓ S'ha desenvolupat un biosensor potenciomètric de MT1 que conté com a ionòfor el complex Zn-MT1 immobilitzat a la membrana. Això el fa el primer biosensor capaç de mesurar proteïnes en solució mitjançant un mecanisme de resposta potenciomètric, aprofitant el caràcter iònic d'aquestes proteïnes.
- ✓ Aquests sensors mostren una sensibilitat mitjana de -53 mV/dec i un límit de detecció de $1.0 \cdot 10^{-7}$ M. S'ha estudiat l'efecte interferent de la MT4 de mamífer, una metal·lotioneïna amb una estructura molt semblant a la MT1.

S'ha observat una lleu interferència d'aquesta sobre la resposta de l'elèctrode de MT1.

- ✓ Considerem que el mecanisme de resposta d'aquests biosensors és el mateix que s'ha descrit per als elèctrodes de plata, o sigui, que la resposta potenciomètrica és deguda a un procés de bescanvi entre els ions que hi ha en solució i aquests mateixos ions atrapats en forma de compost de coordinació al si de la membrana. La particularitat d'aquest nou biosensor és que la resposta potenciomètrica seria deguda al caràcter iònic de les proteïnes.
- ✓ El desenvolupament d'aquests biosensors obre un ampli ventall de possibilitats pel que fa a l'aplicació de la potenciometria amb elèctrodes selectius.

6. Anexos

PUBLICACIONES

Polysulfone as an alternative material to PVC in the design of ion-selective electrodes

Anna González-Bellavista^a, Jorge Macanás^b, Maria Muñoz^b, Esteve Fàbregas^{a,*}

^a *Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

^b *Group of Separation Techniques in Chemistry (GTS), Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

Received 23 June 2005; accepted 28 October 2005

Available online 13 December 2005

Abstract

Polysulfone (PS), a non-conductive polymer, is employed as an alternative material to polyvinyl chloride (PVC), the most used polymer in the design of ion-selective electrode (ISE) membranes to date.

A nitrate-ISE is chosen as a model electrode to study the efficiency of PS as a polymer matrix of the membrane. Tetra-octyl ammonium nitrate is used as ionophore and 2-nitrophenyl octyl ether as plasticizer. The polymer/plasticizer/ionophore ratio is optimized and the analytical performance parameters of the prepared electrodes are evaluated. The electrodes show a slope between 45 and 60 mV/decade (depending on the calibration medium and membrane composition). A linear range response between 1.0×10^{-4} and 3.0×10^{-2} M, and a lifetime of at least 1 month are obtained. The electrodes exhibit good selectivity for nitrate in respect to other anions.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Polysulfone membrane; Ion-selective electrode; Nitrate

1. Introduction

The application of new polymeric matrices as ion-sensitive membranes has given new possibilities for fabrication techniques for ion-selective electrodes (ISEs). Although a limited number of polymeric materials are used in conventional ISEs, the large choice of different ionophores that can be embedded into the polymer matrix provides the possibility of building up many different electrode types. The main material used as polymer matrix in ISEs is polyvinyl chloride (PVC) [1]. Alternative polymeric membranes such as silicon rubber, epoxy polyurethanes and modified PVC [2–8] have been tested and found to improve adherence to solid state devices or to reduce adsorption of macromolecules from analytical samples, but PVC is still the most used polymer in ISE membranes.

The knowledge of new materials, such as polysulfone (PS; see Fig. 1), allows us to expand the possibilities of constructing

potentiometric sensors. The first PS membranes appeared in the 1960s as an alternative to cellulosic membranes in separation processes as PS has a high resistance in extreme pH conditions as well as good thermal stability [9,10]. Furthermore, PS is soluble in chloroform and dimethylformamide, and membranes are easily prepared by conventional phase inversion technique [11]. Its porosity allows it to be used in micro-, ultrafiltration and reverse osmosis processes [12] as well as in the development of composite membranes to facilitate transport [13].

PS is a porous polymer that provides a suitable environment to embed some hydrophilic components like solvent mediators and ionophores. In addition, it is possible to modify the concentration of ionophores in the membrane and also the chemical nature of the solvent in order to optimize membrane composition. Moreover, it is easy and fast to prepare electrodes based on PS membranes. Therefore, PS is an attractive structural material to be studied in the potentiometric sensors field.

PS allows us to design tailored membranes due to its high compatibility with a large number of ionophores and organic and biological compounds. In this sense, incorporation of enzymes can be achieved by using PS polymeric matrices. This is not

* Corresponding author. Tel.: +34 935812483; fax: +34 935812379.
E-mail address: Esteve.fabregas@uab.es (E. Fàbregas).

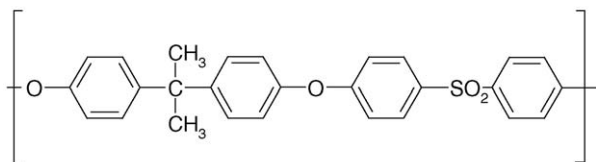


Fig. 1. Structural representation of PS used as polymeric matrix.

possible with PVC, which is usually dissolved in tetrahydrofuran (THF), because of the denaturalization of many biological compounds. For these reasons, the great advantage of PS membranes over PVC is their capacity to embed biological material to build compact biosensors [14]. Nevertheless, in this paper, PS is used as a polymeric matrix to construct a potentiometric sensor. To our knowledge, this is the first time that PS has been reported as a support material for the construction of an ISE.

The aim of the work presented here is to study the efficiency of PS, as an alternative polymeric matrix to common PVC, which possesses adequate physical properties to obtain “potentiometric electrode membranes”. A NO_3^- -ISE has been chosen as a model electrode to study the behavior of PS as polymer matrix of the membrane. The electrochemical selectivity for a variety of interferent anions, and the effect of membrane matrix, ionophore concentration and pH on the potentiometric response have been investigated.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Potentiometric measurements were performed using a digital potentiometer, Crison μpH 2002, with ± 0.1 mV resolution (Alella, Spain) and a serial communication line. Up to 16 electrodes could be calibrated simultaneously with the use of “switch TMI-6017 CONM16”. The readings were computer-controlled, using the serial communication line (RS232C) connected to a Pentium 4 computer with especially developed software. Both instrument and software were made by TMI (Alella, Spain). As reference electrode, a double-junction Ag/AgCl electrode from Orion Thermo (West Palm Beach, FL, USA) 90-02-00 was used.

2.2. Reagents and solutions

Polysulfone BASF 3010 natur (Frankfurt, Germany) was used as a polymer matrix and *N,N*-dimethylformamide (DMF)

was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). The plasticizers were 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE) and dibutyl phthalate (DBP) [15,16], both from Fluka (Büchs, Switzerland). The ionophore, tetra-octyl ammonium nitrate (T8), was synthesized as described elsewhere [17] and used after purification. All other reagents used were analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q (Bedford, MA, USA) was used throughout. For the preparation of the electrode, graphite powder was obtained from Merck, epoxy resin Araldit M from Uneco (Badalona, Spain) and the hardener HY 5162 from Vantico (Barcelona, Spain).

2.3. Preparation of ion-selective electrodes

The electrodes were of the all-solid-state kind using a solid internal contact in use in our laboratories [18]. The supporting conductor was prepared first by mixing Araldit M and the hardener in a 1:0.4 (w/w) ratio, respectively [19]. This epoxy resin was then mixed with graphite powder in a 1:1 (w/w) ratio. The resulting paste was placed in the electrode body and cured at 40°C for 24 h. After curing of epoxy graphite, 0.3 mm from the top layer of the surface was removed mechanically so that the electrode was ready for membrane deposition (see Fig. 2).

The membrane was prepared in two steps. The first involved mixing the plasticizer and the ionophore in a 13:1 (w/w) ratio. The second step involved the preparation of a solution of PS in DMF (100 mg/ml). Afterwards, both solutions were mixed to obtain a solution of 30% (PS/DMF) and 70% (plasticizer:ionophore). This cocktail was used to prepare PS membranes by phase inversion technique [20] (see Fig. 2). Finally, the ISEs were conditioned for 2 h in 0.1 M nitrate solution [21].

2.4. Potential measurements and calibration

The calibration experiments were carried out performing known additions of nitrate standards with several concentrations to a 25.00 ml volume of initial solution in order to reach a working concentration range between 1.0×10^{-5} and 3.0×10^{-2} M. Stock solutions (1.0 M) were prepared every 3 months by direct weighing of the sodium nitrate, whereas the standard solutions were prepared monthly by dilution of the stock. Before starting the measurements, the electrode was preconditioned in a stirred sample solution until a steady potential was obtained. Data were plotted as potential versus logarithm of the NO_3^- activity. Activities were calculated by the Debye–Hückel formula [22].

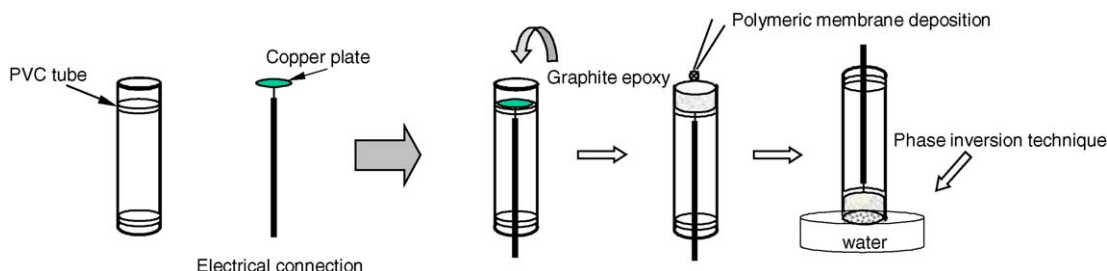


Fig. 2. Construction of the electrodes and membrane deposition.

Table 1
Optimized membrane composition using NPOE as a plasticizer and their potentiometric response properties in a nitrate-selective electrode

| DMF (mg PS/ml) | PS (%) | Plasticizer:ionophore (%) | Slope (mV/dec) | Linear range (M) |
|----------------|--------|---------------------------|----------------|------------------------------|
| 80 | 30 | 70 | −51.5 | 1.8×10^{-4} to 0.03 |
| 80 | 50 | 50 | −47.8 | 1.1×10^{-4} to 0.03 |
| 80 | 70 | 30 | −30.1 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 100 | 30 | 70 | −58.6 | 5.2×10^{-4} to 0.03 |
| 100 | 50 | 50 | −50.3 | 3.0×10^{-4} to 0.03 |
| 100 | 70 | 30 | −29.2 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 160 | 30 | 70 | −47.1 | 7.0×10^{-5} to 0.03 |
| 160 | 50 | 50 | −41.1 | 1.1×10^{-4} to 0.03 |
| 160 | 70 | 30 | −26 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |

The plasticizer:ionophore ratio (w/w) is constant (13:1) in all membranes. PS: polysulfone; DMF: dimethylformamide.

3. Results and discussion

3.1. Polysulfone concentration

A study of the concentration of PS in DMF was performed. Three different concentrations of PS dissolved in DMF (80, 100 and 160 mg/ml) were tested. For each one, the best proportion of PS:plasticizer was studied. For this reason, nine different weightings of both materials were mixed in order to reach the following proportions of PS (%):plasticizer (%)—10:90; 20:80; 30:70; 40:60; 50:50; 60:40; 70:30; 80:20; 90:10. In this first study the plasticizer:ionophore ratio was kept constant. The appearance of the formed membranes after drying the electrode was verified and checked. Due to their physical properties observed the study only evaluated the membranes with 30, 50 and 70% of plasticizer of the three concentrations of PS dissolved in DMF.

3.2. Optimization of the membrane composition

The composition of the membranes was studied by testing two different plasticizers NPOE and DBP. Calibration curves were performed in the 1.0×10^{-5} to 3.0×10^{-2} M nitrate concentration range, to study the slope and the linear range of all electrodes. Table 1 (membranes with NPOE) and Table 2 (membranes with DBP) summarize the composition of the different studied membranes.

Results from Tables 1 and 2 clearly show that all slopes from membranes using DBP as plasticizer are lower than those

membranes with NPOE. Therefore, NPOE was further used in the study. It was checked that the initial PS/DMF concentration had a little influence in the electrode response because there is only a small difference in the sensitivities working with the same proportions. For this reason, a concentration of 100 mg PS/ml DMF was chosen because it provided the best results with both plasticizers. Another important variable is the PS:plasticizer:ionophore ratio in the response electrodes. Membranes with 30% of plasticizer:ionophore solution present a low sensitivity, most likely due to a low ionophore concentration in the membrane. Membranes with 50% PS improve the sensitivity, but membranes with 30% PS and 70% of plasticizer:ionophore composition gave the best sensitivity and widest linear concentration range. Due to rather bad physical properties, membranes containing a higher percentage of plasticizer have not been evaluated.

3.3. Optimization of the plasticizer:ionophore ratio

Three new membranes were prepared keeping constant the PS amount (30%) and with NPOE as plasticizer, but varying the plasticizer:ionophore ratio. Table 3 depicts the composition of the three membranes.

From the results obtained, we can conclude that the optimum composition which provides the best sensitivity is 30% PS, 65% plasticizer and 5.0% ionophore (see Table 3, membrane A) and therefore it was chosen for further studies. This composition was used to study the performance characteristics of the electrode such as selectivity, lifetime and the effect of pH.

Table 2
Optimized membrane composition using DBP as a plasticizer and their potentiometric response properties in a nitrate-selective electrode

| DMF (mg PS/ml) | PS (%) | Plasticizer:ionophore (%) | Slope (mV/dec) | Linear range (M) |
|----------------|--------|---------------------------|----------------|------------------------------|
| 80 | 30 | 70 | −37.9 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 80 | 50 | 50 | −32.4 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 80 | 70 | 30 | −26.1 | 5.0×10^{-3} to 0.03 |
| 100 | 30 | 70 | −36.8 | 5.0×10^{-3} to 0.03 |
| 100 | 50 | 50 | −30.1 | 5.0×10^{-3} to 0.03 |
| 100 | 70 | 30 | −19.8 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 160 | 30 | 70 | −32.1 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 160 | 50 | 50 | −33.8 | 1.0×10^{-3} to 0.03 |
| 160 | 70 | 30 | −11.9 | 5.0×10^{-3} to 0.03 |

The plasticizer:ionophore ratio (w/w) is constant (13:1) in all membranes. PS: polysulfone; DMF: dimethylformamide.

Table 3
Composition of the membranes using NPOE as the plasticizer

| Membrane | PS (%) | Plasticizer (%) | Ionophore (%) | Slope (mV/dec) | Linear range (M) |
|----------|--------|-----------------|---------------|----------------|--|
| A | 30 | 65.0 | 5.0 | −56.7 | 5.0×10^{-5} to 3.0×10^{-2} |
| B | 30 | 67.5 | 2.5 | −53.0 | 1.1×10^{-4} to 3.0×10^{-2} |
| C | 30 | 69.0 | 1.0 | −50.0 | 1.1×10^{-4} to 3.0×10^{-2} |

PS: polysulfone.

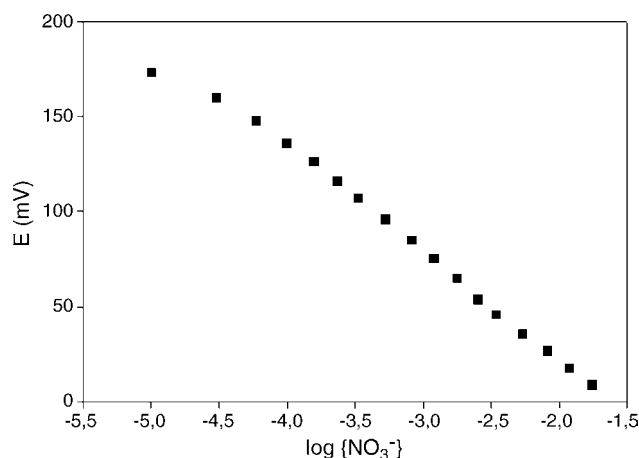


Fig. 3. Potentiometric response of the membrane based on the PS matrix with a slope of 56.7 mV/dec.

3.4. Response characteristics of the electrode

The calibration parameters were evaluated from repeatedly making calibration curves with 1.0×10^{-5} to 3.0×10^{-2} M nitrate solutions using the above-mentioned optimized membrane composition. A typical calibration plot is shown in Fig. 3, which depicts a linear range from 5.0×10^{-5} to 3.0×10^{-2} M. This was the upper working concentration tested. The practical limit of detection (LOD), taken as the concentration of NO_3^- at the point of intersection of the extrapolated linear segments of the calibration plot, was 3.0×10^{-5} M.

The repeatability ($n=5$) and reproducibility of the calibration parameters were studied by making successive calibrations with the same membrane on the same day, and different days ($n=10$), respectively. The results obtained (see Table 4) were 3.0×10^{-5} M (S.D. = 1.0×10^{-5}) for LOD, and 57.2 mV/dec (S.D. = 3.3) for slopes.

The electrode was tested over a period of 1 month to investigate its stability. During this period the electrode was in daily

Table 4
Characteristics of the nitrate-selective electrode based on the PS membrane

| Properties | Values and/or range |
|--------------------------------|---|
| Optimized membrane composition | 30% PS, 65% NPOE, 5% T8 |
| Useful pH range | 2.5–12 |
| Linear range | 5×10^{-5} to 3×10^{-2} M |
| Slope | 57.2 mV/dec (S.D. = 3.3) |
| Detection limit | 3×10^{-5} M (S.D. = 1×10^{-5}) |
| Lifetime | At least 1 month |

use and was stored in 10^{-2} M NaNO_3 solution. No significant changes in the performance of the electrode were observed during this period. Parameters such as slope, working concentration range and LOD of the electrode were found to be reproducible.

The influence of pH on the potentiometric response of the membrane electrode was examined at 1×10^{-3} M nitrate concentration. The initial pH was adjusted with dilute hydrochloric acid and sodium hydroxide solutions, as required, during the experiment. As can be seen in Fig. 4 the potentiometric response of the electrode is robust to pH changes in the range of 2.5–12.0 and it is suitable for nitrate concentration measurement in this pH range.

3.5. Selectivity of the electrode

The selectivity characteristics of the membrane were further studied. Usually an increase of the LOD and a reduction of the linear response range reveal the interfering effects of the compounds on the ISEs response. The selectivity coefficients of the new PS containing electrodes were evaluated by the fixed interference method (FIM) [23] from potential measurements of solutions prepared with a fixed concentration of the interfering ions (1×10^{-2} M), and varying concentrations of NO_3^- as described by Saez de Viteri and Diamond [24]. The selectivity coefficients obtained and those reported for previous nitrate-selective electrodes are shown in Table 5.

Table 5 lists the potentiometric selectivity coefficient data of the sensor for several anions relative to nitrate. The selectivity coefficients clearly indicate that the electrode is selective

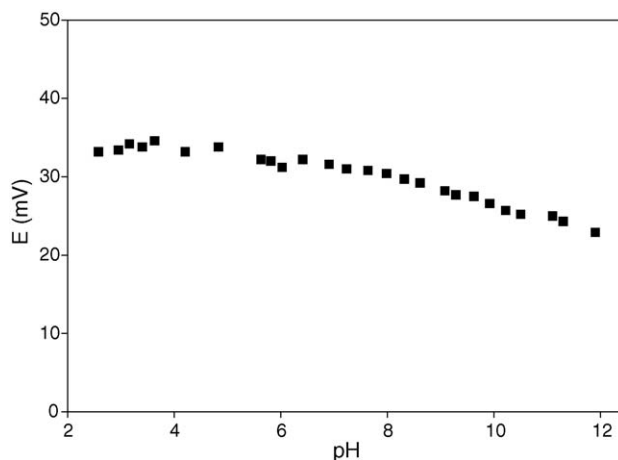


Fig. 4. Influence of pH on the potential response of the nitrate-selective electrode tested in a 1×10^{-3} M nitrate concentration.

Table 5

Comparison of the potentiometric selectivity coefficients ($\log K_{\text{NO}_3^-, \text{A}^-}^{\text{pot}}$) of the proposed nitrate-selective electrode with several commercial electrodes and some previous developed nitrate electrodes

| Interfering ion | Proposed NO_3^- -ISE | Orion 93-07 | Beckam 39618 | [25] | [26] | [27] |
|---------------------|-------------------------------|-------------|--------------|-------|------|------|
| F^- | -2.62 | -2.72 | -2 | 0.47 | | -3.5 |
| HPO_4^{2-} | -2.95 | - | - | >0.51 | | -2.6 |
| SO_4^{2-} | -2.90 | - | - | >0.51 | -3.7 | -2.9 |
| HCO_3^- | -2.73 | - | - | >0.51 | -1.7 | |
| Cl^- | -2.14 | -2.25 | -2 | 0.36 | -2.0 | -3.6 |

All three references [25–27] describe a liquid/liquid ion-exchanger/PVC membrane.

to nitrate over a number of other inorganic anions. Interference studies were carried out for F^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , HCO_3^- and Cl^- . The reason for selection of these ions was that many of them might be present in media when nitrate is present (i.e. drinking water, tap water, river water and industrial effluents).

As can be seen from the data in Table 5, the electrode based on PS matrix is more selective to nitrate than the other inorganic anions studied. The selectivity pattern of the electrode for several anions is as follows: nitrate > hydrogen phosphate > sulfate > hydrogen carbonate > fluoride > chloride. The electrode shows good selectivity over several anions. These coefficients have not been reported to our knowledge for other commercial electrodes such as phosphate, sulfate and hydrogen carbonate. The selectivity coefficients of the electrode against ions such as Cl^- and F^- are approximately equal to those commercially available.

Other selectivity coefficients reported for previous nitrate-selectives have been compared with the proposed nitrate electrode. It is especially interesting to remark upon the coefficients data from a previous nitrate electrode based in similar ionophore (tetradodecylammonium nitrate) [25]. Similar response characteristics could be expected, but the proposed electrode presents better coefficients than the previous for all the interfering ions studied. For the other two reported nitrate electrodes [26,27] the selectivity coefficients are comparable with the presented one.

4. Conclusions

PS has proved to be useful as a potentiometric electrode membrane and nitrate-selective electrode. Furthermore, PS has a great advantage over PVC, in that its capacity to embed biological material extends the field of potentiometric biosensors. The new electrode is more selective to nitrate than to another anions studied and its performance is in the same ranges as those of commercially available electrodes. There is a great advantage of a newly developed PS electrode towards NO_3^- detection in complex matrices. The electrode can be used over a wide pH range (2.5–12) which makes it useful for measurements in different types of samples. The electrode shows good response characteristics (sensitivity, stability and lifetime) and it has been proved that PS can compete as a polymeric matrix in ion-selective potentiometric electrodes.

Acknowledgements

The authors would like to thank MCYT (Spanish Ministry of Science and Technology) (MAT2003-01253) for its financial support. We would also like to thank the Group of Separation Techniques in Chemistry (GTS) at the same department for the financial support MCYT (MAT2000-0505-P4-03).

References

- [1] G.J. Moody, R. Oke, J.D.R. Thomas, A calcium-sensitive electrode based on a liquid ion exchanger in a poly(vinyl chloride) matrix, *Analyst* 95 (1970) 910–918.
- [2] G.J. Moody, B. Saad, J.D.R. Thomas, Glass transition temperatures of poly (vinyl chloride) and polyacrylate materials and calcium ion-selective electrode properties, *Analyst* 112 (1987) 1143–1147.
- [3] S.G. Cha, D. Liu, M.E. Meyerhoff, A.C. Cantor, A.R. Mdgley, H.D. Goldberg, R.B. Brow, Electrical performance biocompatibility, and adhesion of new polymer matrices for solid state ion sensors, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1666–1672.
- [4] E. Lindner, V.V. Cosofrer, S. Ufer, R.P. Buck, J.W. Kao, M.R. Neuman, J.M. Anderson, Ion-selective membranes with low plasticizer content: electroanalytical characterization and biocompatibility studies, *J. Biomed. Mater. Res.* 28 (1994) 591–601.
- [5] T. Stachwill, D.J. Harrison, Synthesis and characterization of new polyvinyl chloride membranes for enhanced adhesion on electrodes surfaces, *J. Electroanal. Chem.* 202 (1986) 75–81.
- [6] D.J. Harrison, L.L. Cunningham, X. Li, A. Teclerian, D. Perman, Enhanced lifetime and adhesion of potassium ion-, ammonium ion-, and calcium ion-sensitives membranes on solid surfaces using hydroxyl-modified polyvinyl-chloride matrices, *J. Electrochem. Soc.* 135 (1988) 2473–2478.
- [7] E. Lindner, V.V. Cosofrer, S. Ufer, R.P. Buck, R.P. Kusy, R.B. Ash, H.T. Nagle, Design of ionophore-free H^+ -selective solvent polymeric membranes for further biomedical applications, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 89 (1993) 361–368.
- [8] L.F. Dürselen, D. Wegman, K. May, U. Oesch, W. Simon, Elimination of the asymmetry in neutral-carrier based solvent polymeric membranes introduced by proteins, *Anal. Chem.* 60 (1988) 1455–1458.
- [9] W.J. Wrasildo, Asymmetric membranes, US Patent 4,629,563, December 1986 (Brunswick).
- [10] M. Kraus, M. Heisler, I. Katsnelson, D. Velazques, Filtration membranes and method of making the same, US Patent 4,900,449, February 1990 (Gelman).
- [11] S.P. Nunes, K.-V. Peinemann (Eds.), *Membrane Technology in the Chemical Industry*, Wiley/VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2001, pp. 12–33 (Chapter 4).
- [12] W.S.W. Ho, K. Sirkar (Eds.), *Membrane Handbook*, Van Nostrand Reinhold, New York, 1992.
- [13] J. Macanás, M. Muñoz, Mass transfer determining parameter in facilitated transport trough di-(2-ethylhexyl) dithiophosphoric acid activated composite membranes, *Anal. Chim. Acta* 534 (2005) 101–108.
- [14] Y. Benmakroha, I. Christie, M. Desai, P. Vadgama, Poly(vinyl chloride), PS and sulfonated polyether-ether sulfone composite membranes for glucose and hydrogen peroxide perm-selectivity in amperometric biosensors, *Analyst* 121 (1996) 521–526.
- [15] A.M.Y. Jaber, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, Solvent mediator studies on barium ion-selective electrodes based on a sensor of the tetraphenylborate salt of the barium complex of a nonylphenoxypoly (ethylenoxyethanol), *Analyst* 101 (1976) 179–186.
- [16] R. Eugster, T. Rosatzin, B. Rusterholz, B. Aebersold, U. Pedrazza, D. Ruegg, A. Schimid, U.E. Spichiger, W. Simon, Plasticizers for liquid polymeric membranes of ion sensitive chemical sensors, *Anal. Chim. Acta* 289 (1994) 1–13.

- [17] E. Barquero, Disseny, Construcció, i Avaluació d'analitzadors per a la monitorització mediambiental, Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, 2001, p. 152.
- [18] E. Martínez-Fabregas, S. Alegret, A practical approach to chemical sensors through potentiometric transducers, *J. Chem. Educ.* 71 (1994) A60–A67.
- [19] A.A.A.S. Machado, Conductive epoxy-based ion-selective electrodes, *Analyst* 119 (1994) 2263–2274.
- [20] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992, p. 59.
- [21] J.L.F.C. Lima, M.C.B.S.M. Montenegro, A.M. Roque da Silva, Plastic membrane electrodes sensitive to some saturated aliphatic monocarboxylates without inner reference solution, *Quim. Anal.* 11 (1992) 67–78.
- [22] S. Kamata, H. Murata, Y. Kubo, A. Bhale, Copper(II)-selective membrane electrodes based on *o*-xylylene bis(dithiocarbamates) as neutral carriers, *Analyst* 114 (1989) 1029–1031.
- [23] R.P. Buck, E. Lindner, Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (IUPAC Recommendations 1994), *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2527–2536.
- [24] F.J. Saez de Viteri, D. Diamond, Determination and application of ion-selective electrode model parameters using flow injection and simplex optimization, *Analyst* 119 (1994) 749–758.
- [25] H.J. Nielsen, E.H. Hansen, New nitrate ion-selective electrodes based on quaternary ammonium compounds in nonporous polymer membranes, *Anal. Chim. Acta* 85 (1976) 1–16.
- [26] A. Hulanicki, M. Maj-Zurawska, R. Lewandoski, The effect of the solvent in the nitrate-selective electrode, *Anal. Chim. Acta* 98 (1978) 151–155.
- [27] M. Mazloum Ardakani, M. Salavati-Niasari, M. Jamshidpoor, Selective nitrate poly(vinylchloride) membrane electrode based on bis (2-hydroxyacetophenone) ethylenediimine vanadyl(IV), *Sens. Actuators B* 101 (2004) 302–307.

Biographies

Anna González Bellavista obtained her BSc degree in Environmental Sciences in 1998 from the Autonomous University of Barcelona. She obtained

her MSc degree in Analytical Chemistry from the same university in 2001 and is currently working on her thesis in “Development of new polymeric membranes for ISEs”. Her research interests include the study and characterization of new polymers used for polymeric matrices in ion-selective electrodes (ISE). She is also interested in the development of new compact biosensors that incorporate metallo thioneins inside the potentiometric membranes.

Jorge Macanás obtained his BSc degree in Chemistry in 2000 from the Autonomous University of Barcelona. He obtained his MSc degree in Analytical Chemistry from the same university in 2002, and is currently working on his thesis entitled “Development of composite membranes for metal ion separation. Transport dynamics and selectivity”. His research interests include the synthesis of solid membranes for facilitated transport, the development of potentiometric and amperometric sensors, and the preparation of stabilized metal nanoparticles for molecular recognition devices.

Maria Muñoz received her BSc in Chemistry in 1984 and her PhD in Analytical Chemistry in 1988 at the Autonomous University of Barcelona. She is professor of Analytical Chemistry at the same university. She has co-authored more than 40 research papers on development of membranes. Her research interests include development of polymeric materials for selective metal transport, development of composite materials for fuel cells, development of organic–inorganic hybrid materials, membrane development for electrochemical biosensors application, catalytic membrane development and development of hydrogen production methods based on green chemistry.

Esteve Fàbregas received his BSc in Chemistry and his PhD in Analytical Chemistry in 1989 at the Autonomous University of Barcelona. He is professor of Analytical Chemistry at the same university since 1991. To date his research interests include chemical sensors studies, especially biosensors. In the beginning he developed and applied enzymatic biosensors and in the last few years he has been working on amperometric enzymatic biosensors and immunosensors. He has co-authored more than 50 research papers on chemical sensors.

Sulfonated poly(ether ether ketone) as an alternative charged material to poly(vinyl chloride) in the design of ion-selective electrodes

Anna González-Bellavista^a, Jorge Macanás^b, María Muñoz^b, Esteve Fabregas^{a,*}

^a *Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

^b *Research Group of Separation Techniques in Chemistry (GTS), Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

Received 28 April 2006; received in revised form 9 June 2006; accepted 14 June 2006

Available online 18 June 2006

Abstract

To date, poly(vinyl chloride) (PVC) is the most used polymer in the design of ion selective electrode (ISE) membranes. This paper is focused on the use of sulfonated poly(ether ether ketone) (SPEEK) as an alternative material to PVC for the design of ISEs. SPEEK of the desired degree of sulfonation is synthesized from poly(ether ether ketone) (PEEK). An NH_4^+ -ISE has been chosen as a model electrode to study the efficiency of SPEEK as polymer matrix of the membrane. The material was evaluated in ionophore free ion exchanger membranes as well as in ion-selective electrodes membranes containing nonactine as ionophore. Analytical performance parameters of the prepared electrodes were evaluated. The electrodes show a slope between 50 and 60 mV dec^{-1} depending on both the calibration medium and the membrane composition. A linear range of response between 10^{-4} and 1.0 M and a lifetime of 1–2 months were obtained. The interferences of cations such as Ca^{2+} , Na^+ , Li^+ and K^+ over the prepared ISEs are studied as well. Although the plasticizer in the SPEEK based membrane matrix is not necessary, its presence improves the sensibility. This makes SPEEK a good potential choice over alternative membrane matrices reported in the literature and a promising platform for the establishment of membrane components.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Sulfonated polyether ether ketone; Charged membrane; Ion-selective electrode; Ammonium

1. Introduction

Traditionally, poly(vinyl chloride) (PVC) has been the polymer matrix most commonly used in membrane-based ion selective electrodes (ISEs) [1]. This is primarily due to its high tensile strength, chemical inertness and high compatibility with a great number of plasticizers. The use of plasticizers in ISE membranes has manifold reasons [2], but the most important one is that plasticizers provide a lipophilic solvent environment within the membrane, which is important for improving the solubility of the ionophore in an organic phase [3]. Although PVC has been used as a polymer matrix for more than 30 years, there are some disadvantages associated with this use, like plasticizer leaching [4] and the difficulty to embed biological recognition material. In order to improve the potentiometric membranes it is neces-

sary to develop and test new materials that eliminate, or at least reduce, the disadvantages of PVC.

Over the years, numerous polymers have been evaluated as potential ISE matrices [5–10]. However, many of these polymers were unsuitable because of incompatibility with many of the plasticizers used in PVC [5]. Due to these shortcomings, there has been a renewed interest in the field of chemical sensors to develop new polymers that are compatible with the plasticizer or that are plasticizer-free [5]. Several such polymers have been reported in the literature, including polyurethanes [6], polysiloxanes [7,8], silicon rubber [9], and polysulfone [10].

Although typical application of cation exchange membranes is electrodialysis [11], some sulfonated polymers of this type are also used as polyelectrolyte in various electrochemical devices, such as electrochromic windows or displays [12]. Nowadays, one of their most significant field of application is proton exchange membranes (PEM) in fuel cells and electrolyzers [13–15]. Some of the essential requirements for these kind of membranes coincide with those suitable for electrode mem-

* Corresponding author. Tel.: +34 935812483.

E-mail address: Esteve.fabregas@uab.es (E. Fabregas).

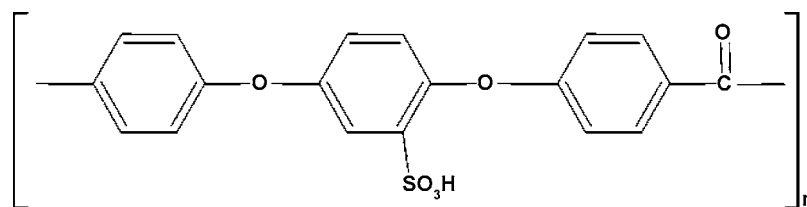


Fig. 1. Structural representation of SPEEK used as polymeric matrix.

branes preparation such as: proton conductivity; chemical stability; fast kinetics for electrode reactions; low cost and ready availability [16].

Up to now, perfluorosulfonic acid polymers (i.e. Nafion) were the most commonly used polymers for PEM but, owing to their importance in the fuel cells field, many efforts have been recently undertaken to develop other alternatives which would be less expensive [17]. In this sense, a great number of polymeric materials [18] have been prepared and functionalized as membrane electrolytes for fuel cells such as sulfonated polysulfone (SPSF), sulfonated polyethersulfone (SPES), sulfonated poly(4-phenoxybenzoyl-1,4-phenylene) (SPPBP), sulfonated polybenzimidazoles (SPBI) and sulfonated poly(ether ether ketone) (SPEEK). They appear quite attractive to be used as potentiometric membranes taking into account that the charged groups introduced to the membrane can modify its surface electrical properties. Moreover, good stability, easy preparation, and low cost of reactants are important reasons to consider this family of polymers in the potentiometric sensors field.

From the large variety of new sulfonated polymers with a diverse range of physical and mechanical properties, SPEEK (see Fig. 1) was chosen because of its easy tunable properties related to the degree of sulfonation [19]. In addition, SPEEK membranes have already been used in combination with some organic and inorganic additives [20], a fact that demonstrates its high compatibility with other compounds such as plasticizers. In this sense, incorporation of enzymes can be achieved by using SPEEK polymeric matrices. This procedure is difficult to be carried out with PVC, which is usually dissolved in tetrahydrofuran, because of the low solubility of many biological compounds and also their denaturalization.

The aim of the work is to study the efficiency of SPEEK as an alternative polymeric matrix to common PVC. SPEEK possesses the adequate physical properties to obtain potentiometric membranes. We will study the influence of the negative charges present in the matrix in the potentiometric response of the electrode, especially in relation to the effect of interfering ions. The widely used NH_4^+ -ISE has been chosen as a model electrode to study the behavior of SPEEK as polymeric matrix of the membrane because it is a good model to prepare biosensors with enzymes that render NH_4^+ as a final product (urea, etc.).

2. Experimental

2.1. Reagents and solutions

PEEK Goodfellow used as polymer matrix and *N,N*-dimethylformamide (DMF) were purchased from Panreac

(Barcelona, Spain). The plasticizers were 2-bis(1-butylpentyl) adipate (BBPA) and tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP) both from Fluka (Büchs, Switzerland). The ionophore (nonactine) was obtained from Fluka. All other reagents used were analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Distilled water (Milli-Q) (Bedford, MA, USA) was used throughout. For the preparation of the electrode, the graphite powder was obtained from Merck, epoxy ARALDIT M from Uneco (Badalona, Spain) and the hardener HY 5162 from VAN-TICO (Barcelona, Spain).

2.2. Sulphonation of SPEEK

Poly(ether ether ketone) (PEEK) was sulfonated as described elsewhere [21,22]. PEEK was dried at 70 °C overnight. Thereafter, 20 g polymer was dissolved in 1 L concentrated sulphuric acid (Merck, 95–98%, extra pure) and vigorously stirred for 72 h at room temperature. Under continuous stirring, this mixture was then precipitated in 10 L of ice-water. After overnight storage, two layers were formed, a polymer rich and a polymer poor phase. The phases were separated and again 10 L distilled water was added to the polymer rich part. Stirring was stopped after 1 h and a separation in a polymer rich and poor phase took place during one hour. This washing step was repeated until a neutral pH of the polymer poor part had been reached. The polymer rich part was filtered with a Büchner funnel. The SPEEK was ready to use after one night drying under nitrogen in an oven of 80 °C. SPEEK obtained by this procedure had a degree of sulphonation of 40% determined by titration.

2.3. Apparatus

Potentiometric measurements were performed using a digital potentiometer, Crison micropH 2002 (Alella, Spain), equipped with ± 0.1 mV resolutions and a serial communication line. Up to six electrodes could be calibrated simultaneously with the use of a home made switch. The readings were not computer-controlled. As reference electrode, a double-junction Ag/AgCl electrode from Orion Thermo (West Palm Beach, Florida, USA) 90-02-00 was used.

2.4. Preparation of ion-selective electrodes

The electrodes were of the all-solid-state kind using a solid internal contact in use in our laboratories [23]. The supporting conductor was prepared first by mixing Araldit M and the hardener in a ratio 1:0.4 by weight, respectively [24]. This epoxy resin was then mixed with graphite powder in a ratio of 1:1 by weight.

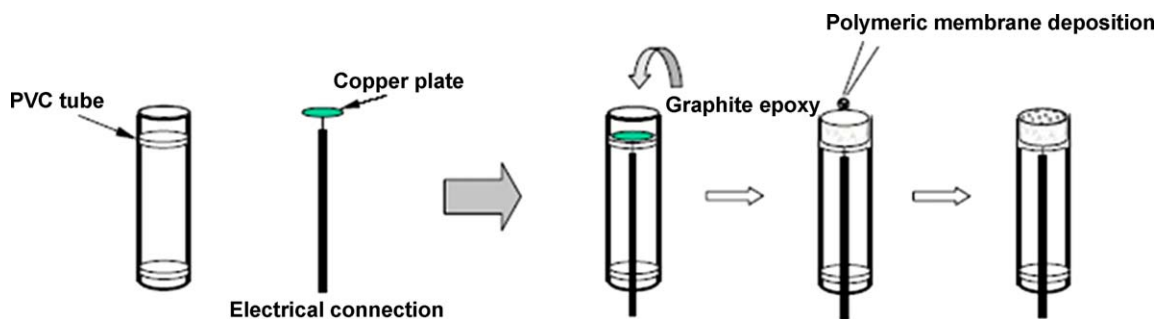


Fig. 2. Construction of the electrodes and membrane deposition.

The resulting paste is placed in the electrode body and cured at 40 °C for 24 h. After curing of epoxy-graphite, 0.3 mm from the top layer of the surface was removed mechanically so that the electrode was ready for membrane deposition (see Fig. 2).

The membrane was prepared in two steps. The first involved mixing the plasticizer and the ionophore in a ratio 68:1 w/w ratio, respectively. The second step involved the preparation a solution of SPEEK in DMF (95 mg mL⁻¹). By mixing the SPEEK solution with plasticizer and ionophore in order to reach a ratio 32% SPEEK: 66% plasticizer: 2% ionophore by mass. This cocktail was used to prepare SPEEK membranes by adding a drop on the electrode surface. Finally the ISEs were conditioned for 2 h in 0.1 M ammonium solution.

2.5. Potential measurements and calibration

The calibration experiments were carried out by mixing known additions of ammonium standards with several concentrations to a 25 mL volume of initial solution, in order to reach a working concentration range between 1.0×10^{-5} and 0.03 M. Stock solutions (1.0 M) were prepared every 2 months by direct weighing of the ammonium chloride and the standard solutions were prepared monthly by dilution of the stock. Before starting the measurements, the electrode was stabilized in stirred sample solution until a steady potential was obtained. The data was plotted as observed potential against the logarithm of the NH₄⁺ activity. Activities were calculated by the Debye-Hückel formula [25].

3. Results and discussion

Few recent works were found in the bibliography that use sulfonated polymers in the preparation of chemical sensors [26]. The majority of them report new-type membranes as a mix of polysulfone and a sulfonated polymer to improve the conductivity of the membrane in amperometric biosensors [27,28]. The present work reports the first sulfonated polymer use in ion-selective sensing membranes. A broad investigation of characteristics of the membranes was made.

3.1. SPEEK polymer as a polymeric matrix for ion-selective membranes

A preliminary study of the concentration of SPEEK in *N,N*-dimethylformamide (DMF) was carried out. The ratio

SPEEK:plasticizer:ionophore (32%:66%:2%) was kept constant. Four different concentrations of SPEEK in DMF were tested (50, 95, 130, 175 mg mL⁻¹), but amounts higher than 130 mg SPEEK mL⁻¹ DMF could not be dissolved. Therefore only the most dilute solutions (50, 95 mg mL⁻¹) were used. Membranes prepared with the most dilute SPEEK solution (50 mg mL⁻¹) present a low sensitivity (data not shown) and for this reason a concentration of 95 mg SPEEK mL⁻¹ DMF was chosen for the remainder of the experiment.

3.2. Membrane composition

As a model system, NH₄⁺-selective membrane incorporating nonactine which is one of the best ammonium ionophores [29,30] was chosen. It is well known that the sensitivity, linear dynamic range and selectivity depend not only on the nature of the ionophore used, but also on the membrane composition and the additives employed [31]. Thus, the influence of the membrane composition was investigated. Several membranes (M1, M2, M3 and M4) were prepared with different compositions testing two different plasticizers 2-bis(1-butylpentyl) adipate (BBPA) and tris(2-ethylhexyl) phosphate (TEHP). Table 1 summarizes the composition of the differently prepared membranes. M1 is the blank membrane, only made of SPEEK. M2 is a plasticizer-free polymeric membrane, made with SPEEK and nonactine. M3 and M4 are membranes made as a result of mixing the ionophore, the plasticizer and the SPEEK.

The performance characteristics of the ISEs with membranes M1, M2, M3 and M4 were studied over more than 1 month alternating calibrations in distilled water and other different ionic media. During these characterization studies, around eight calibrations per week were run for each unit. Before performing the calibration, the ISEs were left to stabilize for 15 min in the same solution where the calibration would be made. Calibration graphs were constructed by varying the ammonium concentration in the range 1×10^{-5} to 3×10^{-2} M in order to study the slope and the linear range of all membranes. Calibration curves were constructed by plotting the potential (*E*) versus the logarithm of ammonium activity. The sensitivity (*s*) of the electrode was obtained by linear regression in the linear response range. The limit of detection (LOD) was estimated as the concentration of NH₄⁺ at the point of intersection of the extrapolated linear segments of the calibration plot. Fig. 3 shows typical calibration plots obtained with the four different membranes in distilled

Table 1
Composition of the membranes and their potentiometric response properties in a ammonium-selective electrode

| Membrane | SPEEK (%) | Plasticizer (%) | Nonactine (%) | Slope (mV dec ⁻¹) | LOD (M) |
|-----------|-----------|-----------------|---------------|-------------------------------|----------------------|
| M1 | 100 | 0 | 0 | 28.6 | 7.3×10^{-5} |
| M2 | 89 | 0 | 11 | 46.3 | 8.2×10^{-5} |
| M3 (BBPA) | 33 | 63 | 4 | 58.3 | 7.0×10^{-5} |
| M4 (TEHP) | 32 | 65 | 3 | 53.8 | 6.3×10^{-5} |

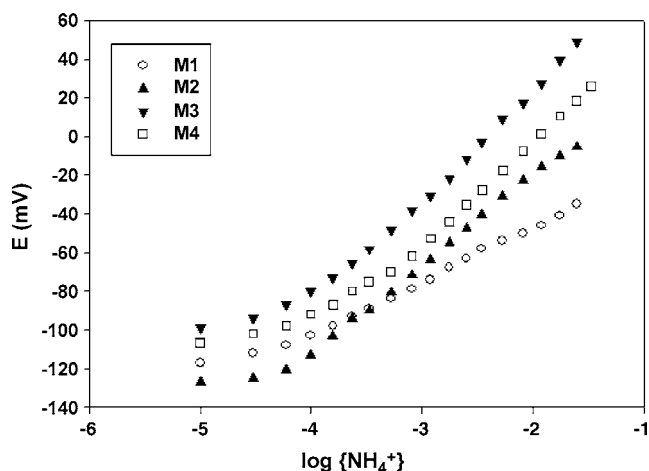


Fig. 3. Potentiometric response of the membrane based on the SPEEK matrix.

water. Results from Table 1 clearly show that the blank membrane, containing only SPEEK (M1), exhibited a weak cationic response probably due to the negative charge of the polymer. The absence of plasticizer in M2, does not affect negatively the response of M2 because it exhibited a near Nernstian slope. This suggests that SPEEK can be suitable as a plasticizer-free polymer matrix. Potentiometric response of the membrane was greatly improved by the presence of both the ionophore and the plasticizer (M3 and M4). The reason is that the plasticizer influences the dielectric constant of the membrane phase, dissolving the ionophore and giving it mobility. The best result was obtained with the sensors prepared by using BBPA (M3) as plasticizer although the differences with those prepared with TEHP are not highly significant since slope values are very similar. From this fact it follows that both plasticizers are compatible with the SPEEK polymeric matrix and that they can be used indistinctly.

Table 2
Sensitivities (mV dec⁻¹) and limit of detection (LOD) obtained with the ammonium ISE membranes in different ionic media

| Ionic medium | M2 | | M3 | | M4 | |
|--|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | mV dec ⁻¹ | LOD (M) | mV dec ⁻¹ | LOD (M) | mV dec ⁻¹ | LOD (M) |
| NaCl 1×10^{-3} M | 49.5 (2) | 5.4×10^{-4} | 52.0 (2) | 6.7×10^{-4} | 53.8 (4) | 5.1×10^{-4} |
| CaCl ₂ 1×10^{-3} M | 44.2 (6) | 7.3×10^{-4} | 59.2 (8) | 7.8×10^{-4} | 56.9 (9) | 8.5×10^{-4} |
| KCl 1×10^{-3} M | 42.4 (7) | 7.6×10^{-4} | 57.7 (5) | 3.7×10^{-4} | 49.8 (4) | 4.7×10^{-4} |
| LiCl 1×10^{-3} M | 38.2 (5) | 3.1×10^{-4} | 55.1 (5) | 3.7×10^{-4} | 58.1 (2) | 3.2×10^{-4} |

Numbers in brackets correspond to the standard deviation of the slope of three experimental calibration curves.

3.3. Response characteristics of the electrode

The calibration parameters were evaluated from repeated calibration curves with 1×10^{-5} to 3×10^{-2} M ammonium solutions using the M2, M3, M4 membranes compositions in different ionic medium backgrounds. Repeatability of the sensor response was estimated from the sensitivities of three successive calibrations with the same ionic media. Both the slopes and the corresponding LOD of M2, M3 and M4, are shown in Table 2. In the case of electrodes based on SPEEK membranes without plasticizer with 11% of ionophore (M2), it was found that the sensitivity in concentration range of all different ionic mediums studied was lower than the Nernstian slope. On the other hand, it was observed that the addition of plasticizer (BBPA in M3, and TEHP in M4) to membrane formulation improves the electrode performance. Despite the fact that the sensitivity of the electrodes was not affected for the interference ions, the LOD was larger when the electrodes were calibrated in ionic medium rather than in aqueous medium. (see Tables 1 and 2).

The observed response of the potentiometric SPEEK sensors indicated that the compatibility of the ionophore in the polymer matrix is good. Moreover, the application of a plasticizer-free polymer matrix is available not only by way of its physical and mechanical properties, but by the compatibility of the ionophores used in the membrane material.

3.4. Riley diagram

Due to the negative charge of SPEEK (given by SO_3^- groups), it is probable that the proton concentration in the medium may affect the signal of the membrane. Therefore the influence of the pH on the potentiometric response was examined at 1×10^{-3} M ammonium concentration. pH was adjusted with dilute hydrochloric acid and sodium hydroxide as required. As can be seen in Fig. 4 the response of the electrode is independent to pH changes in the range of 2–8. As from pH 8, the signal

Table 3

Potentiometric selectivity coefficients ($K_{\text{NH}_4^+, \text{B}}^{\text{pot}}$) of the proposed ammonium-selective electrode compared with several previous developed ammonium electrodes, [33–35]

| Interfering ion | M2 | M3 | M4 | [33] | [34] | [35] |
|------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Na+ | 1.4×10^{-1} | 2.1×10^{-1} | 1.4×10^{-1} | 2.3×10^{-3} | 2.1×10^{-3} | 7.9×10^{-3} |
| K+ | 2.1×10^{-1} | 1.9×10^{-1} | 2.2×10^{-1} | 1.5×10^{-1} | 1.3×10^{-1} | 3.9×10^{-2} |
| Li+ | 9.0×10^{-2} | 1.3×10^{-1} | 1.0×10^{-1} | – | 1.2×10^{-4} | 5.0×10^{-4} |
| Ca ²⁺ | 2.2×10^{-1} | 1.6×10^{-1} | 1.1×10^{-1} | 1.1×10^{-4} | 3.0×10^{-4} | 2.5×10^{-3} |

begins to decrease probably because the equilibrium $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ is being displaced to the formation of NH_3 .

3.5. Selectivity of the electrode

To select the best membrane a study of the interference effect was carried out with all sensors. The selectivity coefficients were evaluated by the fixed interference method (FIM) [32] from potential measurements of solutions prepared with a fixed concentration of the interfering ions (a_{B}) and by varying concentrations of NH_4^+ . The potential values obtained are plotted versus the logarithm of the activity of the primary ion ($a_{\text{NH}_4^+}$). The intersection of the extrapolation of the linear portions of this plot indicates the value of ($a_{\text{NH}_4^+}$) which is to be used to calculate $K_{\text{NH}_4^+, \text{B}}^{\text{pot}}$ from the Nikolsky-Eisenman equation:

$$K_{\text{NH}_4^+, \text{B}}^{\text{pot}} = \frac{a_{\text{NH}_4^+}}{a_{\text{B}}^{Z_{\text{NH}_4^+}/Z_{\text{B}}}}$$

Table 3 contains the potentiometric selectivity coefficient data of the sensor for several ions relative to ammonium. In this work, interference studies were carried out for K^+ , Li^+ , Na^+ and Ca^{2+} . Although the proposed electrode usually presents slightly more selectivity to ammonium than the other interfering cations studied, there is a notable interference of potassium, sodium and calcium. The strong interference of potassium is probably because of the similar size between the ions. The interference of calcium is probably due to the double positive charge. For all membranes studied, the less interfering ion is lithium.

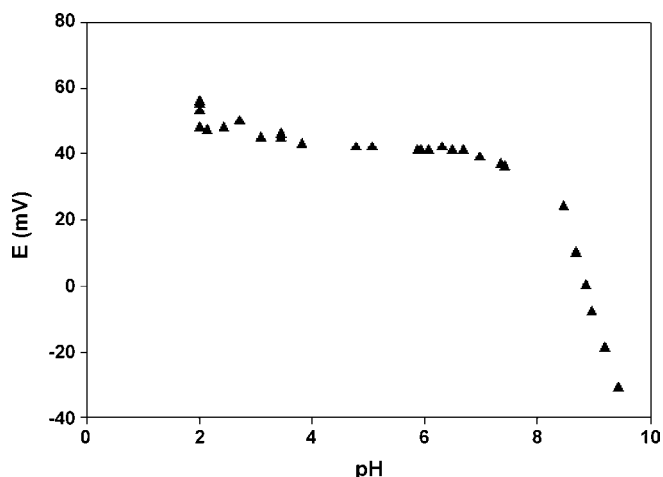


Fig. 4. Influence of pH on the potentiometric response of ammonium-selective electrode tested in a 1×10^{-3} M ammonium concentration.

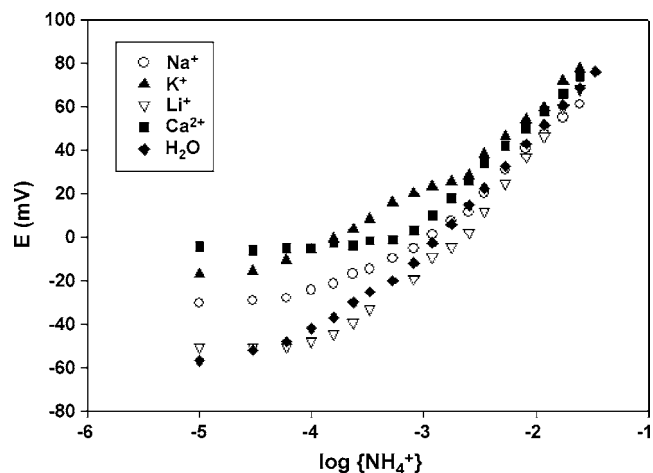


Fig. 5. Potentiometric response of M4 towards different interfering cations.

If we compare the potentiometric selectivity coefficients of each ion for all three different membranes, the values are very similar. It could be expected that the presence of plasticizer in M3 and M4 improves the selectivity of the electrodes, but these membranes (M3 and M4) still had a notable interference towards all the cations studied similar to M2. Thus, the presence or absence of the plasticizer in the membrane composition does not markedly affect the responses of the electrode when they are calibrated in an interfering medium. On the other hand, the measurements carried out using the membranes with plasticizer, especially M4, resulted in a better calibration curve (as seen in Fig. 5).

The selectivity coefficients of other ammonium electrodes [33–35] are better for all the interfering cations evaluated. The poor selectivity of the sensors with SPEEK is probably due to the negative charge of the membrane, which provokes an electrostatic interaction with cations (especially the bivalents). However, there is still a different response mechanism between ammonium ion and the rest of studied cations.

4. Conclusions

The SPEEK polymer reported here is the first sulfonated polymer to be used in ion-selective electrodes. It was proved to be useful as a polymer matrix for ion selective electrodes for that purpose. Although its good mechanical and adhesive properties make it suitable for fabricating plasticizer free ion selective membranes, the presence of plasticizer improves the characteristics of response. The new SPEEK membrane based showed Nernstian response slopes in a aqueous medium.

Although ammonium sensors developed have a poor selectivity with respect to the interfering cations studied, we have to bear in mind that the SPEEK has another advantages with respect to conventional PVC-ISE's. The most important one is that it is possible to embed enzymes and proteins inside the membrane, a fact that gives great possibilities to SPEEK as a polymeric matrix to build compact biosensors. Due to the observation of an influence of a charge in the membrane, SPEEK can be suitable for eliminating anionic interferences. That opens up a new way to prepare anionic ISE with less interference without adding anionic additives (e.g. *p*-tetraphenylborate).

Acknowledgements

Authors would like to thank MCYT (Spanish Ministry of Science and Technology) for the financial support (project references MAT2000-0505-P4-03 and MAT2003-01253).

References

- [1] G.J. Moody, R. Oke, J.D.R. Thomas, *Analyst* 95 (1970) 910–918.
- [2] U. Fiedler, J. Ruzicka, *Anal. Chim. Acta* 67 (1973) 179–193.
- [3] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3083–3132.
- [4] S. Peper, I. Tsagkatakis, E. Bakker, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 25–33.
- [5] Y. Qin, S. Peper, E. Bakker, *Electroanalysis* 14 (2002) 1375–1381.
- [6] S.Y. Yun, Y.K. Hong, B.K. Oh, G.S. Cha, H. Nam, S.B. Lee, J.I. Jin, *Anal. Chem.* 69 (1997) 868–873.
- [7] D.N. Reinhoud, J.F.J. Engeberson, Z. Brzozka, H.H. Van Der Vlekkert, G.W.N. Honing, H.A.J. Holterman, U.H. Verkerk, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3618–3623.
- [8] G. Högg, O. Lutze, K. Cammann, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 103–109.
- [9] M.E. Poplawski, R.B. Brown, K.L. Rho, S.Y. Yun, H.J. Lee, G.S. Cha, K.J. Phaeng, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 249–257.
- [10] A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, *Sens. Actuators, B* 115 (2006) 691–696.
- [11] S.P. Nunes, K.-V. Peinemann (Eds.), *Membrane Technology in the Chemical Industry*, Wiley-VCH Verlag GmbH, D-69469, Weinheim, Germany, 2001, p. 238.
- [12] S. Jung, H. Kim, M. Han, Y. Kang, E. Kim, *Mater. Sci. Eng., C* 24 (2004) 57–60.
- [13] S. Kaliaguine, S.D. Mikhailenko, K.P. Wang, P. Xing, G. Robertson, M. Guiver, *Catal. Today* 82 (2003) 213–222.
- [14] O. Savadogo, *J. New Mater. Electrochem. Syst.* 1 (1998) 47–66.
- [15] A.B. Yaroslavtsev, V.V. Nikonenko, V.I. Zabolotsky, *Russ. Chem. Rev.* 72 (2003) 393–421.
- [16] Q. Li, R. He, J.O. Jensen, N.J. Bjerrum, *Chem. Mater.* 15 (2003) 4896–4915.
- [17] K.D. Kreuer, *J. Membr. Sci.* 185 (2001) 29–39.
- [18] M. Rikukawa, K. Sanui, *Prog. Polym. Sci.* 25 (2000) 1463–1502.
- [19] P. Xing, G.P. Robertson, M.D. Guiver, S.D. Mikhailenko, K. Wang, S. Kaliaguine, *J. Membr. Sci.* 229 (2004) 95–106.
- [20] G. Alberti, M. Casciola, *Solid State Ionics* 145 (2001) 3–16.
- [21] M.C. Wijers, M. Jin, M. Wessling, H. Strathmann, *J. Membr. Sci.* 147 (1998) 117–130.
- [22] S. Vetter, B. Ruffmann, I. Buder, S.P. Nunes, *J. Membr. Sci.* 260 (2005) 181–186.
- [23] J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, *Analyst* 111 (1986) 799–802.
- [24] A.A.A.S. Machado, *Analyst* 119 (1994) 2263–2274.
- [25] S. Kamata, H. Murata, Y. Kubo, A. Bhale, *Analyst* 114 (1989) 1029–1031.
- [26] D.N. Muraviev, J. Macanás, M. Farre, M. Muñoz, S. Alegret, *Sens. Actuators, B* 118 (2006) 408–417.
- [27] Y. Benmakroha, I. Christie, M. Desai, P. Vadgama, *Analyst* 121 (1996) 521–526.
- [28] P.M. Vadgama, W.H. Mullen, G.W. Scoot, (Un)sulfonated polyarylsulfone or polyarylketone membranes for use in sensors and enzymes electrodes, *Eur. Pat. Appl. EP* 86-308918 (1987).
- [29] A. Pullman, *Inorg. Chim. Acta* 79 (1983) 11–12.
- [30] S. Alegret, E. Martínez-Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.* 4 (1989) 287–297.
- [31] M. Mazloum-Ardakani, A.A. Ensafi, M. Salavati-Niasari, S.M. Chahooki, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 25–30.
- [32] R.P. Buck, E. Lindner, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2527–2536.
- [33] O.G. Davies, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, *Analyst* 113 (1988) 497–500.
- [34] P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wroblewski, *Analyst* 108 (2003) 2830–2837.
- [35] M.S. Gauri, J.D.R. Thomas, *Analyst* 119 (1994) 2323–2326.

Sulfonated poly(ether ether ketone), an ion conducting polymer, as alternative polymeric membrane for the construction of anion-selective electrodes

Anna González-Bellavista^a, Jorge Macanás^b, Maria Muñoz^b, Esteve Fabregas^{a,*}

^a *Sensors & Biosensors Group, Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

^b *Group of Separation Techniques in Chemistry (GTS), Department of Chemistry, Autonomous University of Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain*

Received 11 October 2006; received in revised form 15 January 2007; accepted 17 January 2007

Available online 13 February 2007

Abstract

A novel arrangement for polymeric membranes used in anion-selective electrodes is presented. Sulfonated poly(ether ether ketone) (SPEEK), an ion conducting polymer has been used as a polymeric matrix to build an anion-selective electrode (ISE). A NO_3^- -ISE has been chosen as a model electrode to study the efficiency of the polymeric membrane. The effect of membrane composition and polymer compatibility with the electro-active components was investigated. The polymer matrix showed good mechanical properties and can be solvent cast in complete analogy to traditional ISE membranes. SPEEK matrix was studied in order to optimize both the potentiometric response and the selectivity of the electrode. The electrode exhibited a linear response with a slope of -51 mV per decade within the concentration range from 8.0×10^{-5} to 2.5×10^{-2} M nitrate ion. The detection limit was found to be 5.0×10^{-5} M, and electrodes could be used over a wide pH range of 4–8. Finally, the sensor showed improved selectivity in comparison to some of the previously reported nitrate-selective electrodes.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: SPEEK; Ion conducting polymer; Negatively charged membrane; Anion-selective electrode; Nitrate

1. Introduction

Ion-selective electrodes (ISE) are well-established analytical instruments used in many laboratories dealing with the environmental, agricultural and medicinal fields [1]. ISEs offer some advantages in comparison to other detection methods such as simplicity, ease of preparation, relatively fast response, selectivity, wide linear dynamic range and low cost [2]. ISEs based on polymeric membranes containing neutral or charged carriers (ionophores) are one of the most successful electrochemical sensors in routine use today [3,4], and they can be used to determine the concentration of a plethora of substances. Due to their significance, considerable effort has been placed on the development and improvement of the ISEs. Traditionally, ISEs are composed of a polymeric matrix, usually polyvinyl chlo-

ride (PVC), a plasticizer, the ionophore, and, sometimes, some lipophilic ionic additives (e.g., alkylammonium salts for anion sensing or tetraphenylborates for cation sensing).

PVC membranes have certain drawbacks relating to their poor adherence and low compatibility with biological materials [5]. To cope with these inconveniences, several polymeric matrices have been tested as alternatives to common PVC, like polysiloxanes [6] silicon rubber [7] and polysulfone [8], and recently some applications of electron conducting polymers in the design of potentiometric ion-sensors have been reviewed [9,10].

With the aim of improving the anionic potentiometric performance for ion-selective membranes, we have substituted the commonly used PVC with sulfonated poly(ether ether ketone) (SPEEK, Fig. 1) used as a polymeric matrix, to check its efficiency in a nitrate determination. This polymer has been used in the past to prepare ion exchange membranes, specially proton exchange membranes (PEM) for fuel cell applications [11,12]. Recently, it has acquired substantive importance in

* Corresponding author. Tel.: +34 935812483; fax: +34 93 5812379.
E-mail address: Esteve.fabregas@uab.es (E. Fabregas).

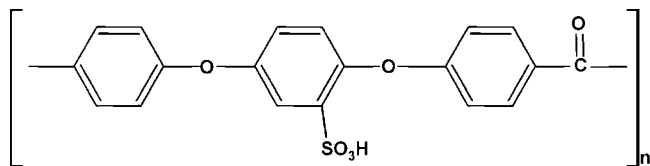


Fig. 1. Repetitive unit formula of SPEEK used as polymeric matrix.

mixed ion/electron conductive membranes due to their possible application in gas and ion sensors [13,14]. In this context, some nanoparticle-based amperometric sensors have already been prepared with the use of this polymeric material [15].

The use of this polymer, functionalized with negatively charged groups, in the design of ion selective electrodes [16] seems to be very promising since the sulfonic groups in the membrane can modify its electrical properties, improving the selectivity and decreasing the overall membrane resistance.

Being an ion-conducting polymer with sulfonic groups, it could be expected that there might be an interaction between the negative charged groups of the polymer matrix and the positive charges (cations) present in the solution. At the same time, there might be an electrostatic repulsion between these groups and the negative charges (anions). Hence, SPEEK may probably refuse the anions present in the solution. This repulsion may also affect nitrate ion, but we think that this may be counter-balanced as the presence of the selective ionophore inside the membrane might allow the analyte to approach to the membrane phase. By adding up both facts, an improvement of the selectivity is obtained. To the best of our knowledge, the use of an ion-conducting polymer has not previously been considered in the design of anion selective electrodes.

SPEEK has been previously studied in our laboratories to prepare an ISE with a different formulation for ammonium determination showing interesting results [16]. This new study has been carried out to investigate whether this new polymer can act simultaneously as a polymeric matrix for anion sensing and as a shield for anionic interferences. The widely used NO_3^- -ISE has been chosen as a model electrode to study the behavior of SPEEK as polymeric matrix of the membrane. The results obtained have been compared to those of a nitrate-selective electrode based in a polysulfone membrane [8].

According to our research group experience, the ISEs developed are all-solid-state type for a better robustness and versatility and to increase their lifetime [17]. The sensibility, the lifetime of the electrode and its selectivity against some anions have been investigated and discussed.

2. Experimental

2.1. Apparatus

Potentiometric measurements were performed using a digital potentiometer, Crison μpH 2002, with ± 0.1 mV resolution (Alella, Spain) and a serial communication line. Up to 16 electrodes could be calibrated simultaneously with the use of “switch TMI-6017 CONM16”. The readings were computer-controlled; using the serial communication line (RS232C) connected to a personal computer equipped with especially developed software. Both instrument and software were licensed by TMI (Alella, Spain). As reference electrode, a double-junction Ag/AgCl 90-02-00 electrode from Orion Thermo (West Palm Beach, FL, USA) was used.

2.2. Reagents and solutions

All reagents used were of the highest purity available and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). The plasticizer was 2-nitrophenyl octyl ether (NPOE) [18] from Fluka (Büchs, Switzerland). Poly(ether ether ketone) (PEEK) purchased from Goodfellow (United Kingdom) was used as a polymer matrix precursor and *N,N*-dimethylformamide (DMF) was obtained from Panreac (Barcelona, Spain). The ionophore, tetraoctylammonium nitrate (T8), was synthesized and used after purification [19]. All the solutions were prepared using doubly distilled deionized water. PEEK was sulfonated as described elsewhere up to a 40% of sulfonation [20,21]. For the preparation of the electrode, graphite powder was obtained from Merck, epoxy resin Araldit M from Uneco (Badalona, Spain) and the hardener HY 5162 from Vantico (Barcelona, Spain).

2.3. Preparation of ion selective electrodes

The electrodes were of the all-solid-state kind with a solid internal contact developed in our laboratories [22]. The supporting conductor was prepared first by mixing Araldit M and the hardener in a 1:0.4 (w/w) ratio, respectively [23]. This epoxy resin was then mixed with graphite powder in a 1:1 (w/w) ratio. The resulting paste was placed in the electrode body and cured at 40 °C for 24 h. After curing of epoxy-graphite, a band of 0.3 mm from the top layer of the surface was removed mechanically so that the electrode was ready for membrane deposition (see Fig. 2).

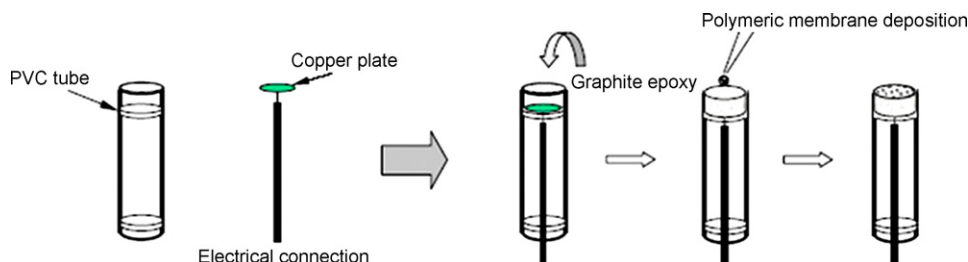


Fig. 2. Construction of the electrodes and membrane deposition.

The membrane was prepared in two steps. The first involved mixing the plasticizer and the ionophore in a ratio 15:1 (w/w) ratio, respectively. The second step implied the preparation of a SPEEK solution in DMF (95 mg/ml). By mixing this SPEEK solution with the former mixture of plasticizer and ionophore it is possible to reach a final ratio of 30% SPEEK, 65% plasticizer, and 5% ionophore by mass. This mixture was used to prepare sensing SPEEK membranes by adding a drop on the electrode surface. Finally, the electrodes were submerged in a 0.1 M nitrate solution for at least 2 h before use. In all cases, three electrode units were constructed and evaluated simultaneously.

2.4. Potential measurements and calibration

The calibration experiments were carried out by addition of known aliquots of nitrate standards to a 25.00 ml volume of initial solution in order to reach a working concentration range between 1.0×10^{-6} and 2.5×10^{-2} M. Before starting the measurements, the electrode was preconditioned in a stirred sample solution until a steady potential was obtained. Data was plotted as potential versus logarithm of the NO_3^- activity. Activities were calculated by the Debye–Hückel formula [24].

3. Results and discussion

In order to check the membrane characteristics, various operational parameters were investigated: sensitivity, lifetime, working range of the electrode at different concentrations of nitrate, pH, selectivity and the effect of the membrane composition.

The previous research performed in our laboratories concerning both SPEEK polymer for cation sensing [16] and tetraoctylammonium ionophore for a nitrate selective electrode [8] allowed us to avoid the optimization of several known working parameters. On the one hand, SPEEK has been used as a polymeric matrix for NH_4^+ -ISE and a concentration of 95 mg SPEEK/ml DMF was considered optimal for membrane preparation [16]. On the other hand, the same ionophore was applied to a polysulfone membrane for a nitrate sensor [8] and we have taken advantage of the know-how choosing a membrane which contained NPOE as a plasticizer, and a final composition of 30% SPEEK, 65% plasticizer and 5% ionophore.

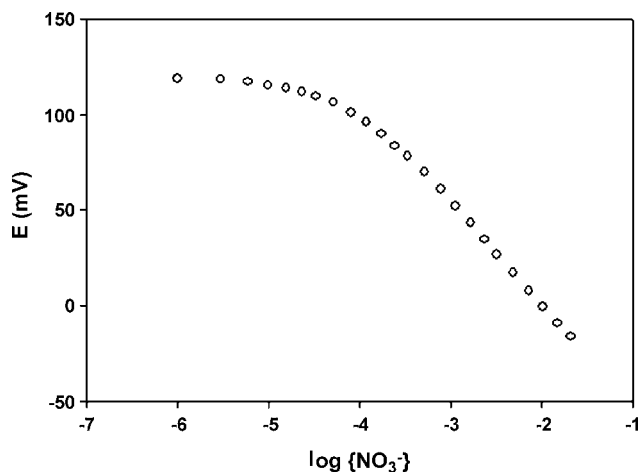


Fig. 3. Potentiometric response of the membrane based on the SPEEK matrix (medium: distilled water).

3.1. Response characteristics of the electrode

A typical nitrate calibration curve obtained for this electrode in distilled water is shown in Fig. 3. As it can be observed, the nitrate selective electrode exhibited a linear response to the activity of nitrate ions within the concentration range of 8.0×10^{-5} to 2.5×10^{-2} M NaNO_3 with an average slope close to -51 (-50.8 , S.D. = 1.1, $n = 5$) mV per decade of activity of nitrate performed during the first month with a weekly calibration. The limit of detection calculated as two extrapolated segments of the calibration curve, was 5.0×10^{-5} M.

As a summary, Table 1 lists the slope, linear range and detection limit of some of the previous nitrate-selective electrodes [8,26] and compares it to the proposed electrode. Although the corresponding sensitivities of both polysulfone-ISE and PVC-ISE are a little bit higher than that of the proposed SPEEK-ISE, all detection limits are approximately the same.

The stability and reproducibility of the new electrodes were also tested. The electrodes were periodically recalibrated and the response slope was calculated for a period of 2 months. During this time, the linear dynamic range and slope of the electrode remained almost constant during the first month, but probably due to the leaching of the ionophore, they drifted apart after this time elapsed (Table 2). In this sense, the life-time of a polymeric liquid membrane is fundamentally affected by the loss of one

Table 1
Sensitivities (mV/dec), linear range and limit of detection (LOD) obtained with the proposed SPEEK-ISE compared with other previous nitrate-electrodes with the same ionophore, and different polymeric matrices

| Response of nitrate-selective electrodes | SPEEK NO_3^- ISE | Polysulfone NO_3^- ISE ^a [8] | PVC NO_3^- ISE ^b [26] |
|--|---|--|---|
| Slope (mV/dec) | -50.8 (1.1) | -57.2 (3.3) | -57.5 (0.2) |
| Linear range (M) | 8×10^{-5} to 2.5×10^{-2} | 5×10^{-5} to 3×10^{-2} | 6.5×10^{-5} ^c |
| LOD (M) | 5.0×10^{-5} (1.5×10^{-5}) | 3.0×10^{-5} (1.0×10^{-5}) | 1.9×10^{-5} |

Numbers in brackets correspond to the standard deviation of the slope and the LOD of successive experimental calibration curves performed during 1 month.

^a Ref. [8] describes a liquid/liquid ion-exchanger/polysulfone membrane. The ionophore salt used was exactly the same as the proposed electrode: tetraoctylammonium nitrate (T8).

^b Ref. [26] describes a liquid/liquid ion-exchanger/PVC membrane. The ionophore salt used was tetraoctylammonium bromide.

^c This is the lower limit of linear range. Ref. [26] does not show the upper limit linear range.

Table 2
Stability and reproducibility of the nitrate-selective electrode

| Time (day) | Sensitivity (mV/dec) | Linear range (M) |
|------------|----------------------|--|
| 1 | -51.3 (1.9) | 8.0×10^{-5} to 2.5×10^{-2} |
| 7 | -50.4 (1.5) | 8.0×10^{-5} to 2.5×10^{-2} |
| 14 | -52.4 (1.2) | 8.0×10^{-5} to 2.5×10^{-2} |
| 21 | -50.6 (1.8) | 1.0×10^{-4} to 2.5×10^{-2} |
| 28 | -49.4 (1.5) | 1.0×10^{-4} to 2.5×10^{-2} |
| 35 | -44.3 (2.0) | 5.0×10^{-4} to 2.5×10^{-2} |
| 42 | -40.2 (2.3) | 5.0×10^{-4} to 2.5×10^{-2} |
| 49 | -35.2 (1.9) | 5.0×10^{-4} to 2.5×10^{-2} |
| 56 | -30.8 (1.6) | 5.0×10^{-4} to 2.5×10^{-2} |

Numbers in brackets correspond to the standard deviation of the slope of five experimental calibration curves.

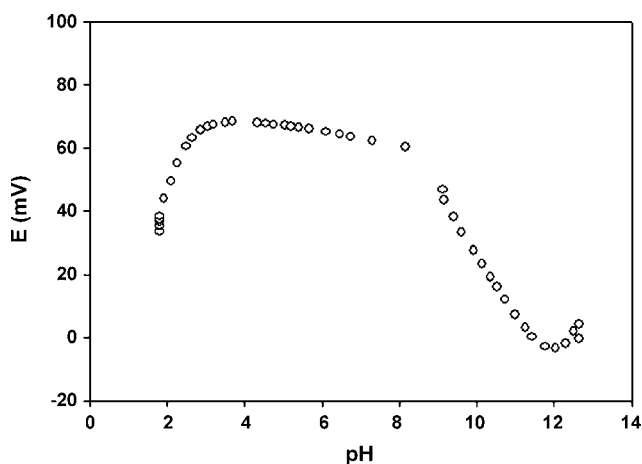


Fig. 4. Influence of pH on the potentiometric response of nitrate-selective electrode ($[\text{NO}_3^-] = 1 \times 10^{-3}$ M).

or more components with the consequence of the loss of its response [27].

3.2. pH effect

The effect of pH on the electrode potential response was studied at 1×10^{-3} M nitrate concentration where the pH was adjusted with dilute hydrochloric acid or sodium hydroxide solution and measured with a combined glass-pH electrode. When pH values were plotted against potential (mV), it was observed that the potential is almost independent from pH in the range of 4–8.0 (Fig. 4). Therefore, this interval can be chosen as the working range of the electrode.

Table 3

Comparison of the potentiometric selectivity coefficients ($\log K_{\text{NO}_3^-,A}^{\text{pot}}$) of the proposed nitrate-selective electrode with several commercial electrodes and some previous developed nitrate electrodes [8,26]

| Interfering ion | SPEEK NO_3^- ISE | Orion 93-07 | Beckam 39618 | Polysulfone NO_3^- ISE [8] | PVC NO_3^- ISE [26] |
|---------------------|---------------------------|-------------|--------------|-------------------------------------|------------------------------|
| F^- | -3.06 | -2.72 | -2 | -2.62 | -2.25 |
| HPO_4^{2-} | -3.72 | - | - | -2.95 | - |
| SO_4^{2-} | -3.5 | - | - | -2.90 | -3.36 |
| HCO_3^- | -2.66 | - | - | -2.73 | - |
| Cl^- | -2.28 | -2.25 | -2 | -2.14 | -1.4 |

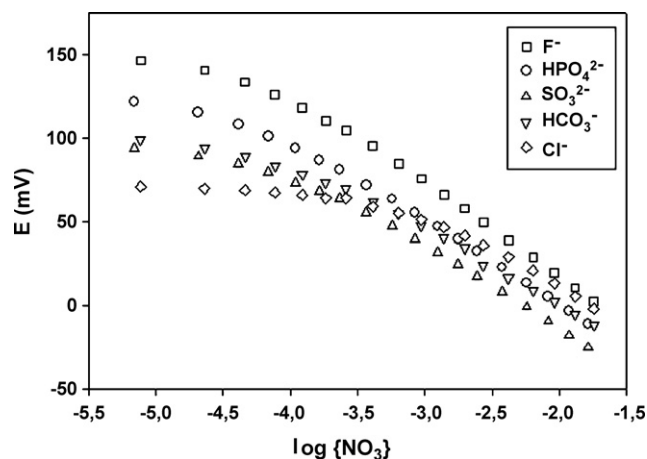


Fig. 5. Potentiometric response of nitrate-ISE towards different interfering anions. Nitrate concentration varied from 1×10^{-5} to 2.5×10^{-2} M whereas interfering anions (F^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , HCO_3^- , Cl^-) concentration was fixed to 1×10^{-2} M.

3.3. Selectivity of the electrode

The most important characteristic of any ion-selective electrode is its selectivity against the relevant analyte ion over other ions present in the solution, which is usually expressed in terms of the potentiometric selectivity coefficient $K_{A,B}^{\text{pot}}$. These coefficients of nitrate-selective electrode were determined by the Fix Interference Method (FIM) [25] from potential measurements of a solution prepared with a fixed concentration of the interfering ions (a_B) and by varying concentrations of (NO_3^-). The potential values obtained are plotted versus the logarithm of the activity of the primary ion ($a_{\text{NO}_3^-}$). The intersection of the extrapolation of the linear portions of this plot indicates the value of ($a_{\text{NO}_3^-}$) which will be used to calculate $K_{\text{NO}_3^-,B}^{\text{pot}}$ from the Nikolsky–Eisenman equation:

$$K_{\text{NO}_3^-,B}^{\text{pot}} = \frac{a_{\text{NO}_3^-}}{Z_{\text{NO}_3^-} / Z_B a_B}$$

The potentiometric selectivity coefficients of the proposed electrode are summarized in Table 3 whereas the corresponding interference curves are shown in Fig. 5. By observing this data, it is possible to conclude that the electrode based on a SPEEK membrane is more selective to nitrate than to the other anions studied which have been selected because they are usually present in those media where nitrate is present (in drinking water, waste waters,

industrial effluents, soils, etc.) [28]. The selectivity pattern of the electrode for these interfering anions goes along with the Hoffmeister series as follows: nitrate > chloride > hydrogen carbonate > fluoride > sulfate > hydrogen phosphate.

Considering the values of the selectivity coefficients of the nitrate-selective electrode prepared in this study, it can be stated that the new sensor improves what is found for several commercially available electrodes (compared with the tabulated data in Table 3). Moreover, it is especially interesting to remark that these coefficients found are even better than those corresponding to previous nitrate electrodes based either on a polysulfone polymeric matrix [8] or a PVC membrane [26] by using exactly the same ionophore (tetraoctylammonium).

These remarkable results can be explained considering the repulsion between the sulfonic groups of SPEEK with the interfering anions present in the solution. This effect might also happen for nitrate anions but because of the presence of the nitrate-selective ionophore, they undergo a higher affinity to the membrane. As a result, an increased selectivity should occur, as confirmed by the results obtained.

Keeping in mind that a PVC-membrane electrode which uses exactly the same ionophore (tetraoctylammonium nitrate) [26], presents worse selectivity coefficients than the ISEs based on a SPEEK polymeric matrix, it is reasonable to think that in future research works it may be possible to reach even better results if we use other more selective ionophores (such as those found in the literature [29,30]).

Then, the use of SPEEK as a polymeric matrix for anion-selective electrodes with other carriers, represents a goal because it reduces the anion interferences.

4. Conclusions

It has been interesting to demonstrate that SPEEK can be used as a polymer matrix in the development of both cation [16] and anion selective electrodes. In the previous research work using an ammonium selective electrode as a model for cation sensing, the efficiency of SPEEK showed good electrode sensibilities but poor selectivities.

In the present work, for anion sensing, nitrate anion has been selected as a model and the results are quite different: we obtained an improvement in the selectivity. On the basis of these results, SPEEK can also be regarded as a satisfactory polymeric matrix for the construction of novel ISEs for anion detection with enhanced selectivity.

In addition, the obtained results are in accordance with the postulated hypothesis of ion interaction with the sulfonic groups of the membrane that makes SPEEK suitable for considerably eliminating anionic interferences by electrostatic repulsions. That opens up a new way to prepare anionic ISEs with less anionic interferences without adding cationic additives just by selecting the appropriate ionophore.

Thus, despite the novelty of SPEEK potentiometric electrodes in comparison with PVC ones, well established for the last 30 years, the performance parameters are globally satisfactory and they can be considered as a good material for anion ISEs design.

Acknowledgements

The authors would like to thank MCYT (Spanish Ministry of Science and Technology) (MAT2003-01253) for its financial support. We would also like to thank the Group of Separation Techniques in Chemistry (GTS) at the same department for the financial support MCYT (MAT2000-0505-P4-03).

References

- [1] A.K. Singh, A. Panwar, S. Kumar, S. Banivwal, Chromium(III)-selective electrode based on a macrocyclic compound, *Analyst* 124 (1999) 521–526.
- [2] M.M.G. Antonisse, D.N. Reinhoudt, Potentiometric anion selective sensors, *Electroanalysis* 11 (1999) 1035–1048.
- [3] A. Lewenstam, M. Maj-Zurawska, A. Hulanicki, Application of ion-selective electrodes in clinical analysis, *Electroanalysis* 3 (1991) 727–734.
- [4] E. Bakker, D. Diamond, A. Lewenstam, E. Pretsch, Ion sensors: current limits and new trends, *Anal. Chim. Acta* 393 (1999) 11–18.
- [5] S.G. Cha, D. Liu, M.E. Meyerhoff, A.C. Cantor, A.R. Mdgley, H.D. Goldberg, R.B. Brow, Electrochemical performance, biocompatibility, and adhesion of new polymer matrices for solid-state ion sensors, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1666–1672.
- [6] D.N. Reinhoudt, J.F.J. Engebensen, Z. Brzozka, H.H. Van Der Vlekkert, G.W.N. Honing, H.A.J. Holterman, U.H. Verkerk, Development of durable K^+ selective chemically modified field effect transistors with functionalized polysiloxane membranes, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3618–3623.
- [7] M.E. Poplawski, R.B. Brown, K.L. Rho, S.Y. Yun, H.J. Lee, G.S. Cha, K.J. Phaeng, One-component room temperature vulcanizing-type silicone rubber-based sodium-selective membrane electrodes, *Anal. Chim. Acta* 355 (1997) 249–257.
- [8] A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, Polysulfone as an alternative material to PVC in the design of ion-selective electrodes, *Sens. Actuators B* 115 (2006) 691–696.
- [9] T.V. Shishkanova, I. Sapurina, J. Stejskal, V. Král, T. Volf, Ion-selective electrodes: polyaniline modification and anion recognition, *Anal. Chim. Acta* 553 (2005) 160–168.
- [10] J. Bobacka, A. Ivaska, A. Lewenstam, Potentiometric ion sensors based on conducting polymers, *Electroanalysis* 15 (2003) 366–374.
- [11] S.D. Mikhailenko, S.M.J. Zaidi, S. Kaliaguine, Sulfonated polyether ether ketone based composite polymer electrolyte membranes, *Catal. Today* 67 (2001) 225–236.
- [12] S. Ren, C. Li, X. Zhao, Z. Wu, S. Wang, G. Sun, X. Yang, Surface modification of sulfonated poly (ether ether Ketone) membranes using Nafion solution for direct methanol fuel cells, *J. Membr. Sci.* 247 (2005) 59–63.
- [13] J. Roeder, V. Zucolotto, S. Shishatskiy, J.R. Bertolino, S.P. Nunes, A.T.N. Pires, Mixed conductive membrane: aniline polymerization in an acid SPEEK matrix, *J. Membr. Sci.* 279 (2006) 70–75.
- [14] J. Roeder, H. Silva, S.P. Nunes, A.T.N. Pires, Mixed conductive blends of SPEEK/PANI, *Solid State Ionics* 176 (2005) 1411–1417.
- [15] D.N. Muraviev, J. Macanás, M. Farre, M. Muñoz, S. Alegret, Novel routes for inter-matrix synthesis and characterization of polymer stabilized metal nano-particles for molecular recognition devices, *Sens. Actuators B* 118 (2006) 408–417.
- [16] A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, Sulfonated polyether ether ketone as an alternative charged material to polyvinyl chloride in the design of ion-selective electrodes, *Anal. Chim. Acta* 577 (2006) 85–90.
- [17] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, New materials for electrochemical sensing I. Rigid conducting composites, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 296–304.
- [18] R. Eugster, T. Rosatzin, B. Rusterholz, B. Aebbersold, U. Pedrazza, D. Ruegg, A. Schimid, U.E. Spichiger, W. Simon, Plasticizers for liquid polymeric membranes of ion sensitive chemical sensors, *Anal. Chim. Acta* 289 (1994) 1–13.

- [19] E. Barquero, Disseny, Construcció, i Avaluació d'analitzadors per a la monitorització mediambiental, Ph.D. thesis, Universitat Autònoma de Barcelona, 2001, p. 152.
- [20] M.C. Wijers, M. Jin, M. Wessling, H. Strathmann, Supported liquid membranes modification with sulphonated poly(ether ether ketone) permeability, selectivity and stability, *J. Membr. Sci.* 147 (1998) 117–130.
- [21] S. Vetter, B. Ruffmann, I. Buder, S.P. Nunes, Proton conductive membranes of sulfonated poly(ether ketone ketone), *J. Membr. Sci.* 260 (2005) 181–186.
- [22] E. Martínez-Fabregas, S. Alegret, A practical approach to chemical sensors through potentiometric transducers, *J. Chem. Educ.* 71 (1994) A60–A67.
- [23] A.A.A.S. Machado, Conductive epoxy-based ion-selective electrodes, *Analyst* 119 (1994) 2263–2274.
- [24] S. Kamata, H. Murata, Y. Kubo, A. Bhale, Copper(II)-selective membrane electrodes based on *o*-xylylene bis(dithiocarbamates) as neutral carriers, *Analyst* 114 (1989) 1029–1031.
- [25] R.P. Buck, E. Lindner, Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes (IUPAC Recommendations 1994), *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2527–2536.
- [26] R. Pérez-Olmos, A. Rios, J.R. Fernández, R.A.S. Lapa, J.L.F.C. Lima, Construction and evaluation of ion selective electrodes for nitrate with a summing operational amplifier. Application to tobacco analysis, *Talanta* 53 (2001) 741–748.
- [27] P. Buhlmann, P. Umezawa, S. Rondinini, A. Vertova, A. Pigliucci, L. Bertezago, Lifetime of ion-selective electrodes based on charged ionophores, *Anal. Chem.* 72 (8) (2000) 1843–1852.
- [28] S.-J. Cho, S. Sasaki, K. Ikebukuro, I. Karube, A simple nitrate sensor system using titanium trichloride and an ammonium electrode, *Sens. Actuators B* 85 (2002) 120–125.
- [29] M. Mazloum Ardakani, A. Dastanpour, M. Salavati-Niasari, A highly selective nitrate electrode based on a tetramethyl cyclotetra-decanato-nickel(II) complex, *J. Electroanal. Chem.* 568 (2004) 1–6.
- [30] A.R. Asghari, M.K. Amini, H.R. Mansour, M. Salavati-Niasari, A tetra-coordinate nickel(II) complex as neutral carrier for nitrate-selective PVC membrane electrode, *Talanta* 61 (2003) 557–563.

Biographies

Anna Gonzalez Bellavista obtained her BSc degree in environmental sciences in 1998 from the Autonomous University of Barcelona. She obtained her MSc degree in analytical chemistry from the same University in 2001 and is currently working on her thesis in “Development of new polymeric membranes for ISEs”. Her research interests include the study and characterization of new polymers used for polymeric matrices in ion selective electrodes (ISE). She is also interested in the development of new compact biosensors that incorporate metallo thioneins inside the potentiometric membranes.

Jorge Macanás obtained his BSc degree in chemistry in 2000 and his PhD in analytical chemistry in July 2006 from the Autonomous University of Barcelona. His research interests include the synthesis of solid membranes for facilitated transport, the development of potentiometric and amperometric sensors, and the preparation of stabilized metal nanoparticles for molecular recognition devices.

Maria Muñoz received her BSc in chemistry in 1984 and her PhD in analytical chemistry in 1988 at the Autonomous University of Barcelona. She is professor of analytical chemistry at the same University. She has co-authored more than 40 research papers on development of membranes. Her research interests include development of polymeric materials for selective metal transport, development of composite materials for fuel cells, development of organic–inorganic hybrid materials, membrane development for electrochemical biosensors application, catalytic membrane development and development of hydrogen production methods based on green chemistry.

Esteve Fàbregas received his BSc in chemistry in 1984 and his PhD in analytical chemistry in 1989 at the Autonomous University of Barcelona. He is professor of analytical chemistry at the same University since 1991. To date his research interests include chemical sensors studies, especially biosensors. In the beginning, he developed and applied enzymatic biosensors and in the last few years he has been working on amperometric enzymatic biosensors and immunosensors. He has co-authored more than 50 research papers on chemical sensors.



Novel potentiometric sensors based on polysulfone immobilized metallothioneins as metal-ionophores

Anna González-Bellavista^a, Silvia Atrian^{b,c}, Maria Muñoz^d, Mercè Capdevila^{e,*}, Esteve Fàbregas^a

^a Sensors & Biosensors Group, Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, BCN, Spain

^b Genetics Group, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028-Barcelona, Spain

^c Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^d Separation Techniques Group, Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, BCN, Spain

^e Bioinorganic Chemistry Group, Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, BCN, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 July 2008

Received in revised form

18 September 2008

Accepted 21 September 2008

Available online 27 September 2008

Keywords:

Metallothionein

Polysulfone membrane

Potentiometric biosensor

Ion-selective electrode

Silver detection

ABSTRACT

We show here the use of immobilized metal-binding biomolecules for metal analysis by using novel potentiometric sensors. To this end and as a model, Ag⁺-ISEs were developed using polysulfone matrix embedding metallothioneins as ionophores (mouse MT1 (P1) or sea urchin SpMTA (P2)). Polysulfone, a porous polymer that was not used until the present in potentiometric biosensors, has the advantage of being compatible with biological materials. Also, the phase inversion procedure allows protein incorporation into the membrane with minima alterations, since it always remains in the aqueous phase. Construction of these biosensors required small amounts of protein; they can be dry-stored and have long lifetimes. They exhibited linear responses with slopes of ca. 61 mV per decade within the 10⁻⁵ to 10⁻² M Ag⁺ concentration range, detection limits of about 10⁻⁵ M, and worked in the 2-to-8 pH range. Except for Hg²⁺, the Pb²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ cations do not interfere with Ag⁺ determination. Significantly, different affinities of Pb²⁺ and Zn²⁺ towards P1- and P2-ISE were found, in good correlation with the higher affinity of these cations towards SpMTA than to MT1. Consequently, the distinct metal-binding features of each MT are conserved and determine the differential properties of their biosensors. These results open a broad range of possibilities for the use of proteins as ionophores in what could be considered a new type of potentiometric biosensor if their response mechanism is taken into account.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

To date, many ion-selective electrodes (ISE) have been reported for metal ions. Most of them are based either on fixed sites (glass, crystalline, and ion-exchange resin membranes) or on mobile sites (liquid membranes with mobile carriers) [1]. Crystalline membranes can be solely constituted by the insoluble salt itself (homogeneous membranes) [2,3] a strategy that has enabled the development of several commercial potentiometric sensors [4] or with the solid salt dispersed in a polymeric matrix (heterogeneous membranes) [5]. In both cases, the recognition mechanism is based on solubility equilibria between the ions of the solution and the solid salt. In the case of the less common ion-exchange resins dispersed in a matrix [6], this mechanism is only based on electrostatic interactions. Conversely, the recognition mechanism in liquid membranes with mobile carrier is based on liquid-liquid extraction equilibria between an aqueous and an organic phase (mediator

solvent). The aqueous phase contains a type of ion (analyte) that is also present in the organic phase bound to the ionophore [7]. Here, the ionophore is a lipophilic species with a high capability for extracting ions from aqueous to organic phases. Normally, the components of the membrane are supported by an inert lipophilic matrix where the mediator solvent behaves as a plasticizer conferring the required final features to the membrane [8]. Among the reported matrixes (polyurethanes, polysiloxanes silicon rubber, etc.) [9–12] PVC [13] is the most used.

Incorporation of biological material into PVC membranes is not an easy task basically due to the use of organic solvents (normally tetrahydrofuran), into which protein macromolecules dissolve poorly usually altering their subsequent activity [14]. Consequently, the construction of potentiometric biosensors has mainly been achieved by a biomembrane superposition on the ISE. Our research group has recently overcome this drawback by using a matrix of polysulfone (PS), a porous polymer that had not been used until the present in sensor construction but whose stability makes it an attractive material. PS makes it possible to incorporate enzymes [15–17] and antibodies [18–20] for the construction of amperometric biosensor compact membranes, i.e. those includ-

* Corresponding author. Tel.: +34 935813323; fax: +34 935811013.
E-mail address: merce.capdevila@uab.cat (M. Capdevila).

ing all the required elements for the recognition without the need of superposing layers. This has been achieved by incorporating the biological material to the membrane during the phase inversion process, which is when water penetrates into the polysulfone and induces its precipitation by displacement of the dimethylformamide where it was dissolved [15–21]. Among other advantages, this immobilization procedure maintains the protein practically intact throughout the process as it always remains in an aqueous media and at controlled pH. It is also noticeable that by this procedure the amount of required protein is greatly reduced, as it remains mainly bound to the outer membrane layers. Furthermore, PS not only provides a suitable environment to embed hydrophilic components but also hydrophobic ones too, and accordingly we have developed a potentiometric sensor for nitrates [22].

Our next aim was to incorporate biological material into PS for the construction of potentiometric biosensors based on the use of a protein as a metal ion ionophore and to this end we have assayed the use of metallothioneins (MTs). Metallothioneins are low molecular weight metalloproteins (6–10 kDa) present in almost all living organisms. They were discovered nearly 50 years ago and although their physiological function is still a matter of debate, they are well-known for the high metal-binding capability that arises from their high cysteine content (30% of the amino acid sequence). From all known MTs, for this study we have chosen two structurally related MTs: mouse MT1 [23] and sea urchin SpMTA [24] that however show distinct metal-binding features [25]. By this strategy we have explored the possibility of using hydrosoluble proteins, which are immobilized in a membrane that does not inhibit their capability of interaction with metal ions and that gives rise to potentiometric responses.

In recent years, some MTs and other metal-interacting polypeptides have been used for the construction of metal ion biosensors by taking advantage of their coordinating features, but these have been mainly used for capacitance sensors [26–29], which show poor selectivity and require EDTA regeneration after each use. On the contrary, the results we report in this work open a broad range of new possibilities for the use of proteins for potentiometric sensors, as the biosensors we have developed show a better selectivity and neither require incubation nor regeneration processes. As a model, we have chosen a Ag^+ -ISE to study the behaviour of the MT1 and SpMTA metallothioneins as ionophores in a PS matrix due to the high affinity of this cation towards these proteins. While the standard Ag_2S -based solid-state electrodes are well known, the design of mobile carrier-based Ag^+ -ISEs is gaining ground because of their better selectivity [30–32].

2. Experimental

2.1. Materials

Polysulfone BASF 3010 natur (Frankfurt, Germany) was used as a polymer matrix and N,N-dimethylformamide (DMF) was purchased from Panreac (Barcelona, Spain). All other reagents used were of analytical grade and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q (Bedford, MA, USA) was used throughout. For the preparation of the electrode, graphite powder was obtained from Merck, epoxy resin ARALDIT M from Uneco (Badalona, Spain) and the hardener HY 5162 from VANTICO (Barcelona, Spain).

2.2. Metallothionein biosynthesis

The P1 (mouse MT1) and P2 (sea urchin SpMTA) metallothioneins used in this report as ionophores, were recombinantly synthesized as Zn-complexes in *E. coli* following a GST-fusion strat-

egy that, after a thrombin cleavage step, renders homogeneous preparations of independent MT [33]. MT concentration and Zn-to-protein ratios of the final preparations were assessed by atomic absorption ICP-AES measurements of S and Zn sample content, as previously described [34]. In the current study, the two MTs have been embedded as Zn-complexes of the independent polypeptides, which directly prevented oxidation in contact with air.

2.3. Electrode construction

The electrodes were of all-solid-state type using a solid internal contact commonly used in our laboratories [35–37]. The supporting conductor was prepared by mixing Araldit M and the hardener at a 1:0.4 (w/w) ratio. This epoxy resin was then mixed with graphite powder at a 1:1 (w/w) ratio [38]. The resulting paste was placed in the electrode body and cured at 40 °C for 24 h. After curing of epoxy-graphite, 0.3 mm thickness from the top layer of the surface was removed mechanically so that the electrode was ready for membrane deposition. A solution of 100 mg polysulfone/ml DMF was used to prepare the membrane in accordance with preliminary studies [22]. A drop of this PS solution was deposited on the epoxy-graphite electrode surface using a pipette. Immediately after, it was precipitated by the phase inversion technique [15,18,39], which was achieved by immersing the electrode in the protein solution. This gave rise to the formation of membranes of 100–200 μm thick [40]. Finally, the ISEs were conditioned for 2 h in a 0.1 M Ag^+ solution, this implying a Zn(II)/Ag(I) replacement in all the metal-binding sites of the protein [34].

2.4. Measurements

Potentiometric measurements were performed using a digital potentiometer, Crison pH 2002, with ± 0.1 mV resolution (Alella, Spain) and a serial communication line. Up to sixteen electrodes could be calibrated simultaneously through the use of “switch TMI-6017 CONM16”. The readings were computer-controlled; using the serial communication line (RS232C) connected to a Pentium 4 computer with specially developed software. Both instrument and software were made by TMI (Alella, Spain). As a reference electrode, a double-junction Ag/AgCl electrode from Orion Thermo (West Palm Beach, Florida, USA) 90-02-00 was used.

Calibration parameters were obtained from the construction of multiple calibration curves in the 1.0×10^{-7} to 2.0×10^{-2} M Ag^+ range and using the constructed P1- and P2-ISE. Calibration experiments were carried out by performing known additions of silver standard solutions to a fixed volume of initial solution in order to reach a working concentration range between 1.0×10^{-7} and 2.0×10^{-2} M. Data was plotted as potential versus logarithm of the Ag^+ activity, calculated by the Debye–Hückel formula. The limit of detection was calculated as the concentration of Ag^+ at the intersection point of the extrapolated linear segments of the calibration plots.

3. Results and discussion

Here we report the construction and study of Ag^+ selective electrodes embedding either a mouse (mammalian MT1, P1) or a sea urchin (equinodermata SpMTA, P2) metallothionein (Fig. 1) into the membrane using polysulfone as a polymeric matrix. Although the use of MT polypeptides to construct biosensors has been previously reported [26,29], it has usually been restricted to the bacterial SmtA protein in the GST-fused form. However, in our case we have used the independent proteins.

As a first step, it was considered interesting to study the influence of the concentration of the MT solution to be embedded in

MT1 MDPNCSCTGGSCTCTSSCACKNCKTSCCKSCCCPVGCSKCAOGCVCGAADKCTCCA
 SpMTA MPDVKVCCCTEGKECACFGODCCVTGECCKDGTCCGICTNAACKANGCKGSGCSCTEGNCAC

Fig. 1. Amino acid sequences of MT1 (P1) and SpMTA (P2). The 20 cysteine residues that each MT uses for heavy metal binding are underlined.

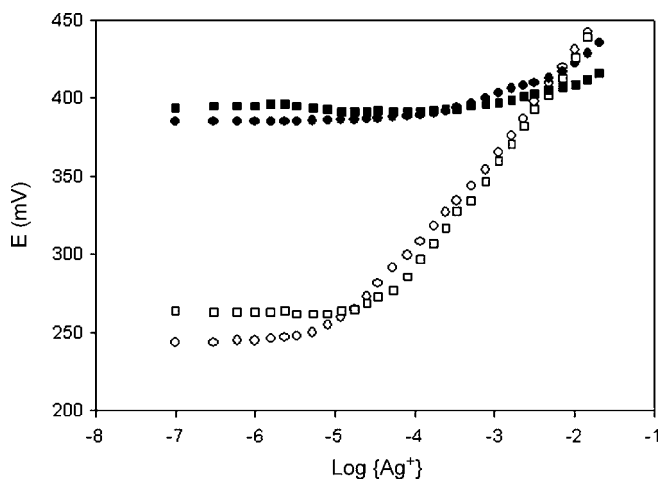


Fig. 2. Potentiometric response of the P1- and P2-ISE stored in different conditions: (O) dry-stored and (●) soaked for P1-ISE, (□) dry-stored and (■) soaked for P2-ISE.

the membrane on the performance of the electrodes. As shown in Table 1, the sensitivity, the linear range and the limit of detection (LOD) values of the P1- and P2-based electrodes remain practically invariant and thus the different MT concentrations assayed are apparently not a key factor in the response of the corresponding electrodes. Consequently, electrodes constructed with MT concentrations of 5.0×10^{-5} M for the sake of protein economy, were used in this work. Furthermore, and due to the costs of the recombinant production of proteins, we also investigated whether there were differences between ISEs that were successively constructed using the same initial MT mother solution. If the DMF released to the aqueous solution during the process of deposition of the membrane on the electrode surface had altered the MT initial solution, differences in the electrode features could have been observed. To this end, several units were successively constructed, calibrated and their sensitivities and limits of detection compared but no differences between them were observed leading to the conclusion that this variable had no influence on their performance. Under these conditions, 100 μ l of the MT solution are enough to prepare at least three ISEs by the phase inversion technique.

Contrarily, some differences in the performance of these ISEs were observed depending on their storage conditions. Although always kept at 4–5 °C, the response of the electrodes stored in dry is much better than that of the electrodes stored soaked in a 0.01 M Ag^+ solution. In fact, soaked electrodes showed a 30, 60 and 100% sensitivity decrease after 4, 6 and 10 days of storage, respectively (data corresponding to 10 days of storage is shown in Fig. 2). This

contrasts with the general belief that MTs are oxidized in contact with air and that it is therefore necessary to keep them in an inert atmosphere [26]. Probably, in dry-stored electrodes, PS is able to create adequate conditions inside the membrane that prevent the oxidation of the cysteine MT residues. Additionally, the shorter lifetime of the soaked versus the dry-stored electrodes described in this work could be rationalized by considering that in the hydrated PS the MT backbone would have a higher mobility that could favour the oxidation of cysteines to cystines by formation of S–S bonds. Some authors have proposed that either the water saturation of the membranes or the loss of their permselectivity can be the origin of the observed potential drifts and changes in the response slopes and in the selectivity coefficients [41,42]. In our opinion this two processes, although possibly also exerting some effects, are probably not decisive in the studied electrodes. This last statement is based on previous results found by this group where we reported that soaked-stored nitrate electrodes with PS matrixes showed lifetimes of at least 3 weeks [22], this indicating that chemical rather than physical modifications are responsible of the observed changes. Consequently, all constructed electrodes were stored in dry.

Typical calibration plots were obtained for both types (P1- and P2-ISE) of dry-stored electrodes depicting linear ranges from ca. 10^{-5} to 10^{-2} M, the latter being the greater working silver concentration assayed. They gave slopes of ca. 61 mV per decade of concentration indicating their Nernstian nature and the limits of detection were of ca. 10^{-5} M. Consequently, as also shown in Table 1, the nature of the protein does not have a significant influence in these three features of these ISEs.

Both the P1- and P2-ISE, showed good reproducibility and a long lifetime. Reproducibility was determined by successive calibrations over consecutive days ($n=10$) giving rise to LOD and sensitivity values of respectively 3.1×10^{-5} M (S.D. = 1×10^{-6}) and 60 mV/dec (S.D. = 4) for P1-ISE and of 2.5×10^{-5} M (S.D. = 8×10^{-6}) and 62 mV/dec (S.D. = 3) for P2-ISE. Both types of electrode were used periodically and dry-stored at 4 °C as stated before. After 3 months no significant changes in their performance were observed. These features together with the good repeatability results obtained for a whole day (Fig. 3) enable their applicability as silver sensors after a daily calibration.

To ascertain the functional pH range of the optimized P1- and P2-ISE, we studied their response to the pH of the solution at Ag^+ concentrations of 1.00×10^{-3} , 1.00×10^{-2} and 1.00×10^{-1} M. The pH of the solution was adjusted by appropriate additions of nitric acid or sodium hydroxide. The potentiometric responses were independent of the pH in the 3.0-to-7.5 range (Fig. 4), which may be taken as the functional pH range of these biosensors. It should be noted that the observed potentiometric decrease of over pH 8 is attributable to the formation of silver oxide.

Table 1
Sensitivity, linear range and logarithm of the limit of detection (logLOD) values recorded for dry-stored, P1- and P2-based electrodes as a function of the concentration of the MT solution used. The standard deviations corresponding to three ISEs and three experimental calibration curves each are shown in brackets.

| [MT] ($\times 10^{-4}$ M) | Sensitivity (mV/dec) | | Linear range (M) | | LogLOD | |
|----------------------------|----------------------|--------|---------------------------|---------------------------|------------|------------|
| | P1-ISE | P2-ISE | P1-ISE | P2-ISE | P1-ISE | P2-ISE |
| 0.5 | 61 (4) | 61 (5) | $2 \times 10^{-5} - 0.02$ | $5 \times 10^{-5} - 0.02$ | -4.8 (0.2) | -4.4 (0.2) |
| 1.0 | 58 (2) | 61 (4) | $5 \times 10^{-5} - 0.02$ | $4 \times 10^{-5} - 0.02$ | -4.4 (0.3) | -4.5 (0.3) |
| 5.0 | 62 (5) | - | $5 \times 10^{-5} - 0.02$ | - | -4.4 (0.2) | - |

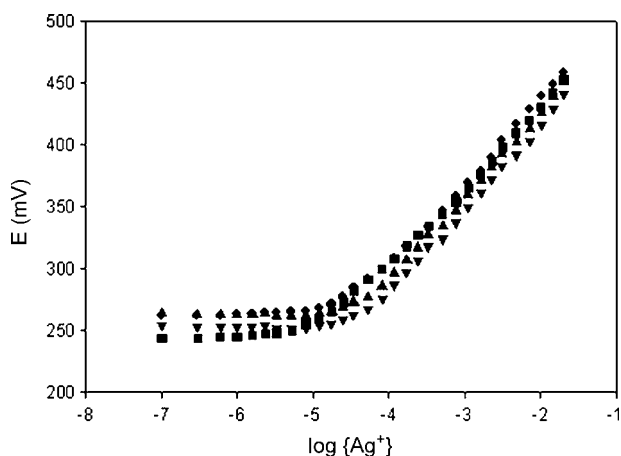


Fig. 3. Successive calibration plots, made in 2 h intervals, to check the repeatability of the P1-based electrode. (■) 1st, (▼) 2nd, (●) 3rd, and (▲) 4th calibration plots.

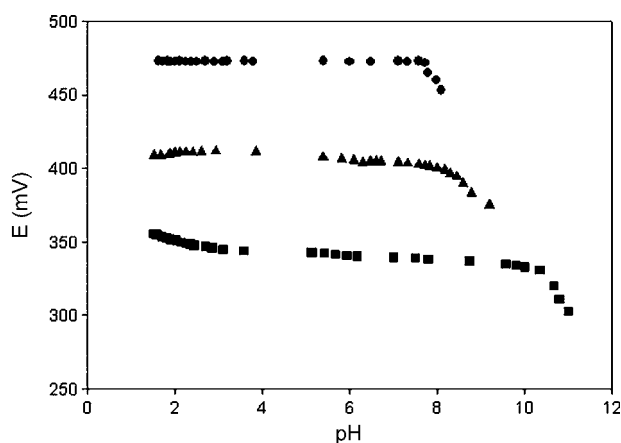


Fig. 4. Effect of the pH on the potentiometric response of the Ag^+ -selective electrode based on P1, tested at (■) 1.00×10^{-3} , (▲) 1.00×10^{-2} and (●) 1.00×10^{-1} M Ag^+ concentration.

3.1. Selectivity of the electrodes

One of the main features of any ion-selective electrode is its response to the primary ion in presence of other ions. In our case, some interferences between Ag^+ and other metal ions could also be envisaged due to the well-known order of affinity of heavy metal ions for thiolates ($\text{Hg(II)} \gg \text{Cu(I)} \approx \text{Ag(I)} \gg \text{Cd(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Zn(II)}$),

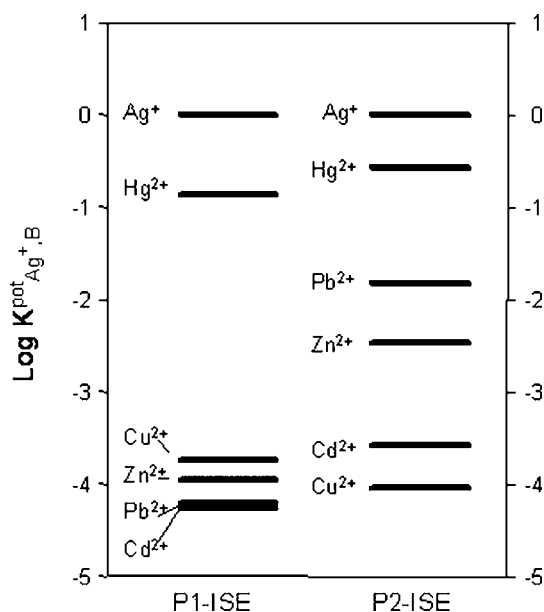


Fig. 5. Potentiometric selectivity coefficients ($\log K_{\text{Ag}^+,\text{B}}^{\text{pot}}$) of the proposed silver-selective electrode based on P1 and P2 metalloproteins.

which is very close to that of MTs [43]. The selectivity of ISEs is usually expressed in terms of the potentiometric selectivity coefficient, $K_{\text{A},\text{B}}^{\text{pot}}$, where A and B respectively are the main and the interfering ions. Here, the selectivity coefficients have been determined by the Fix Interference Method (FIM) [44], a methodology that implies carrying out potentiometric measurements on solutions prepared with a fixed concentration of the interfering ions and by varying the Ag^+ concentrations. Consequently, we conducted the study of the interferences in our P1- and P2-based electrodes with some of the possible competitors of Ag^+ in the following background concentrations: 1×10^{-3} and 1×10^{-2} M for Hg^{2+} ; and 1×10^{-3} , 1×10^{-2} and 1×10^{-1} M for Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} .

From this study, it is concluded that Hg^{2+} is the most interfering ion for both types of electrode (Fig. 5 and Table 2). This is in good correspondence with literature data regarding electrodes of different nature [45–48] and with the higher affinity of this metal ion for the Cys residues if compared with that of the other metal ions studied (Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+}). However, although Hg^{2+} shows a higher affinity than Ag^+ for the binding sites of an MT, both P1- and P2-based electrodes respond in a more selective way to Ag^+ than to Hg^{2+} . Both the sensitivity and the LOD of the P1-based electrode showed only small differences if compared with the results

Table 2

Sensitivities (mV/dec) and log of Limit of Detection (log LOD) obtained with the Ag^+ -ISE based on P1 and P2 in different interference medium. Numbers in brackets correspond to the standard deviation of the slope of three experimental calibration curves.

| MT | Ionic medium | 10^{-3} | | 10^{-2} | | 10^{-1} | |
|----|----------------------------|----------------------|------------|----------------------|------------|----------------------|------------|
| | | Sensitivity (mV/dec) | Log LOD | Sensitivity (mV/dec) | Log LOD | Sensitivity (mV/dec) | Log LOD |
| P1 | NaNO_3 | 63 (4) | −4.3 (0.9) | – | – | 61 (3) | −3.7 (0.4) |
| | $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ | 60 (3) | −4.3 (0.3) | 63 (4) | −4.4 (0.3) | 65 (5) | −4.7 (0.4) |
| | $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ | 59 (2) | −4.2 (0.4) | 59 (5) | −4.9 (0.5) | 60 (5) | −4.7 (0.3) |
| | $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ | 59 (4) | −4.0 (0.6) | 63 (4) | −3.5 (0.4) | 61 (6) | −4.4 (0.7) |
| | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ | 55 (1.4) | −4.1 (0.2) | 58 (1.3) | −4.5 (0.3) | 59 (1.6) | −4.2 (0.2) |
| | $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ | 28 (2) | −2.2 (0.1) | 24 (2) | −1.9 (0.1) | – | – |
| P2 | NaNO_3 | 69 (0.8) | −5.1 (0.3) | – | – | 66 (0.5) | −3.6 (0.8) |
| | $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ | 62 (1.6) | −3.4 (0.1) | 70 (0.5) | −3.3 (0.6) | 79 (5) | −2.3 (0.3) |
| | $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ | 67 (1.3) | −3.4 (0.1) | 60 (0.1) | −3.6 (0.4) | 59 (2) | −4.1 (0.2) |
| | $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ | 64 (0.2) | −3.3 (0.1) | 66 (4) | −4.6 (0.5) | 66 (0.9) | −3.2 (0.1) |
| | $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ | 63 (0.2) | −4.7 (0.5) | 61 (0.1) | −4.8 (0.3) | 65 (0.2) | −4.5 (0.7) |
| | $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ | 22 (0.2) | −3.7 (0.5) | 18 (4) | −1.6 (0.2) | – | – |

obtained in a water background. On the other hand, a weak interference of lead and zinc and therefore an increase in LOD were observed in these ionic backgrounds for the P2-based electrodes.

Concerning the P1-based electrode, Fig. 5 presents the low K^{pot} values obtained for the metal ions other than Hg^{2+} here studied, and it can consequently be stated that they would not cause any interference even when present at high concentration. With regards to the P2-based electrode, Fig. 5 also highlights the interferences of Pb^{2+} and Zn^{2+} (weaker), which did not interfere with the P1-based electrode. These differential Pb^{2+} interferences can be rationalized on the basis of the coordinating features of the two MTs employed. MT1 is a positively charged (+5) peptide of 61 amino acid residues with a isoelectric point (IP) of 8.38 and two O-donor amino acids, while SpMTA, which has 64 residues is a neutral peptide with a IP of 6.06 and seven O-donor amino acids (Fig. 1). Considering O-donor ligands are more common in the coordination environments of Pb^{2+} than those of Ag^+ , a peptide richer in Asp and Glu residues (SpMTA) should show a higher affinity for this cation than other peptides with a lower content of O-donor ligands. On the other hand, it has been described that the inner lower stability of the Zn-S bond makes Zn-binding about 3000 times weaker in mammalian than in equinodermata MTs [25], this explaining the major interfering role of this cation in the P2-based electrodes. Here, it is interesting to note that although embedded in a polymeric matrix the two MT polypeptides used retain their differential metal-binding affinities.

4. Conclusions

In this work we have constructed potentiometric Ag^+ selective biosensors by using metalloproteins, in particular MTs, as ionophores embedded in a polysulfone matrix. This demonstrates the feasibility of preparing potentiometric biosensors that include polymeric hydrophilic ionophores. The phase inversion procedure used for the construction of the membrane requires small amounts of protein that ensure its low cost in case of non-commercial proteins that have to be recombinantly synthesized or obtained from their native sources. Furthermore, the constructed ISEs have long lifetimes. This is not only related to the physical properties of the membrane and the lack of leaking processes due to the polymeric nature of the ionophore but also to the fact that the use of fully metallated metalloproteins ensures their resistance to air oxidation, the latter probably determining the low durability of other biosensors described (affinity MT sensors [26,29]). These, in comparison with the potentiometric sensors here described, can show lower detection limits, as a function of the incubation time, but contrarily show poor selectivity and require regeneration processes.

More interestingly, from the point of view of biosensors classification, the Ag-ISE described here probably provides a new kind of sensor as it cannot be considered to be based either on crystalline membranes with fixed sites, or on membranes with mobile sites. Therefore, their response mechanism could be closer to that described for ion-exchange resin membranes but differing in the fact that the interaction between the ionophore and the analyte responds to a complexation process, this latter feature conferring a higher selectivity to these biosensors.

Here, two types of electrodes embedding two structurally similar metalloproteins (*i.e.*, mouse MT1 and sea urchin SpMTA) have been developed. Both types of ISEs show high sensitivity, wide linear and working pH ranges, and good selectivity towards silver ion. Interference studies were carried out for several metal ions, and, except for Hg^{2+} , which has a strong interfering effect on both types of electrodes, Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} do not cause important interferences with Ag^+ . However, a different affinity of Pb^{2+} and Zn^{2+} towards P1- and P2-ISE was found that interestingly correlates

well with the higher affinity of SpMTA (P2-ISE) than MT1 (P1-ISE) towards these metal ions. Thus, the use of different MT isoforms has allowed us to make a comparative study whose results reveal that the distinct metal-binding features of each MT are reflected in the different properties of the biosensors constructed with them. To our understanding this provides a large number of possibilities regarding the incorporation of other water-soluble metalloproteins as ionophores for the construction of potentiometric sensors.

Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología grants CTQ2006-15681-C02-01 for E. Fàbregas, BIO2006-14420-C02-01 for S. Atrian and BIO2006-14420-C02-02 for M. Capdevila. We are grateful to Montserrat Dalmau for MT synthesis and Alexandra Pereira for collaboration in the experiments.

References

- [1] G.J. Moody, J. Biomed. Eng. 7 (1985) 183.
- [2] E. Santos, M. Conceição, B.S.M. Montenegro, C. Couto, A.N. Araújo, M.F. Pimentel, V. Lins Da Silva, Talanta 63 (2004) 721.
- [3] Y.E. Ermolenko, V.V. Kolodnikov, S. Al-Marok, Y.G. Vlasov, Sens. Actuators B 26–27 (1995) 369.
- [4] Handbook of Electrode Technology, Orion Research, Inc., Cambridge, MA, 1982.
- [5] S. Alegret, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, E. Martínez-Fàbregas, J.M. Paulis, Química Analítica 6 (1987) 176.
- [6] A. Jyo, T. Imato, H. Kohno, N. Ishibashi, Bull. Chem. Soc. Jpn. 56 (1983) 3177.
- [7] E. Bakker, M. Willer, M. Lerchi, K. Sella, E. Pretsch, Anal. Chem. 66 (1994) 516.
- [8] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, Chem. Rev. 97 (1997) 3083.
- [9] S.Y. Yun, Y.K. Hong, B.K. Oh, G.S. Cha, H. Nam, S.B. Lee, J.I. Jin, Anal. Chem. 69 (1997) 868.
- [10] D.N. Reinhoud, J.F.J. Engebiersen, Z. Brzozka, H.H. Van Der Vlekkert, G.W.N. Honing, H.A.J. Holterman, U.H. Verkerk, Anal. Chem. 66 (1994) 3618.
- [11] M.E. Poplawski, R.B. Brown, K.L. Rho, S.Y. Yun, H.J. Lee, G.S. Cha, K.J. Phaeng, Anal. Chim. Acta 355 (1997) 249.
- [12] E. Pungor, K. Toth, M.K. Papay, L. Polos, H. Malissa, M. Grasserbauer, E. Hoke, M.F. Ebel, K. Persy, Anal. Chim. Acta 109 (1979) 279.
- [13] G.J. Moody, R. Oke, J.D.R. Thomas, Analyst 95 (1970) 910.
- [14] S.G. Cha, D. Liu, M.E. Meyerhoff, A.C. Cantor, A.R. Mdgley, H.D. Goldberg, R.B. Brown, Anal. Chem. 63 (1991) 1666.
- [15] B. Prieto-Simon, E. Fàbregas, Biosens. Bioelectron. 22 (2006) 131.
- [16] B. Prieto-Simon, E. Fàbregas, A. Hart, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 2663.
- [17] B. Prieto-Simón, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, Talanta 71 (2007) 2102.
- [18] S. Sanchez, E. Fàbregas, Biosens. Bioelectron. 22 (2007) 965.
- [19] S. Sanchez, M. Pumera, E. Cabruja, E. Fàbregas, Analyst 132 (2007) 142.
- [20] S. Sanchez, M. Pumera, E. Fàbregas, Biosens. Bioelectron. 23 (2007) 332.
- [21] S.P. Nunes, K.V. Peinemann (Eds.), Membrane Technology in the Chemical Industry, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany, 2001, pp. 12–33.
- [22] A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz, E. Fàbregas, Sens. Actuators B 115 (2006) 691.
- [23] A.H. Robbins, D.E. McRee, M. Williamson, S.A. Collett, N.H. Xuong, W.F. Furey, B.C. Wang, C.D. Stout, J. Mol. Biol. 221 (1991) 1269.
- [24] R. Riek, B. Prêcheur, Y. Wang, E.A. Mackay, G. Wider, P. Güntert, A. Liu, J.H.R. Kägi, K. Wüthrich, J. Mol. Biol. 291 (1999) 417.
- [25] Y. Wang, E.A. Mackay, M. Kurasaki, J.H.R. Kägi, Eur. J. Biochem. 225 (1994) 449.
- [26] I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csöregi, B. Mattiasson, J.R. Lloyd, K.J. Kenneth, J. Jakeman, N.L. Brown, Anal. Chem. 70 (1998) 4162.
- [27] I. Bontidean, J. Ahlqvist, A. Mulchandani, W. Chen, W. Bae, R.K. Mehra, A. Mortari, E. Csöregi, Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 547.
- [28] P. Corbisier, C. Van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. De Lorenzo, N.L. Brown, J.R. Lloyd, J.L. Hobman, E. Csöregi, G. Johansson, B. Mattiasson, Anal. Chim. Acta 387 (1999) 235.
- [29] I. Bontidean, J.R. Lloyd, J.L. Hobman, J.R. Wilson, E. Csöregi, B. Mattiasson, N.L.J. Brown, Inorg. Biochem. 79 (2000) 225.
- [30] R.K. Mahajan, O. Parkash, Talanta 52 (2000) 691.
- [31] M.K. Ammini, M. Ghaedi, A. Rafi, I. Mohamadpoor-Baltork, K. Niknam, Sens. Actuators B 96 (2003) 669.
- [32] K. Kimura, S. Yajima, K. Tatsumi, M. Yokohama, M. Oue, Anal. Chem. 72 (2000) 5290.
- [33] N. Cols, N. Romero-Isart, M. Capdevila, B. Oliva, P. González-Duarte, R. González-Duarte, S. Atrian, J. Inorg. Biochem. 68 (1997) 157.
- [34] O. Palacios, K. Polec-Pawlak, R. Lobinski, M. Capdevila, P. González-Duarte, J. Biol. Inorg. Chem. 8 (2003) 831.
- [35] E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, J. Chem. Educ. 71 (1994) A67.
- [36] J.L.F.F. Lima, A.A.F.C. Machado, Analyst 111 (1986) 799.
- [37] F. Céspedes, E. Martínez-Fàbregas, S. Alegret, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 296.
- [38] S. Alegret, F. Florido, Analyst 116 (1991) 473.

- [39] M. Mulder, *Basic Principles of Membrane Technology*, Kuwer Academic Publishers, Dordrecht, 1992, p. 59.
- [40] S. Sánchez, M. Roldán, S. Pérez, E. Fàbregas, *Anal. Chem.* 80 (2008) 6508.
- [41] E. Pretsch, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 46.
- [42] R. De Marco, J.-P. Veder, G. Clarke, A. Nelson, K. Prince, E. Pretsch, E. Bakker, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10 (2008) 73.
- [43] M. Vasak, *Methods Enzymol.* 205 (1991) 452.
- [44] R.P. Buck, E. Lindner, *Pure Appl. Chem.* 66 (1994) 2527.
- [45] D. Siswanta, K. Nagatsuka, H. Yamada, K. Kumakura, H. Hisamoto, Y. Shichi, K. Toshima, K. Suzuki, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4166.
- [46] W. Wróblewski, Z. Brzozka, *Sens. Actuators B* 24-25 (1995) 183.
- [47] D. Xu, T. Katsu, *Anal. Chim. Acta* 43 (2001) 235.
- [48] L. Chen, X. He, B. Zhao, Y. Liu, *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 51.

The first isoform-selective protein biosensor: a metallothionein potentiometric electrode

Mercè Capdevila,^{†**a} Anna González-Bellavista,^{‡a} Maria Muñoz,^{§a} Sílvia Atrian^b and Esteve Fàbregas^{‡a}

Received (in Cambridge, UK) 26th October 2009, Accepted 1st February 2010

First published as an Advance Article on the web 12th February 2010

DOI: 10.1039/b922284g

The construction of a biosensor membrane by embedding mammalian Zn₇-MT1 complexes as ionophores in a polysulfone matrix resulted in precise, accurate and, significantly, selective electrodes for MT1 quantification, so that the presence of other mammalian MT isoforms did not interfere in MT1 measurement.

Since their discovery in 1957,¹ metallothioneins (MTs), the ubiquitous, polymorphic metal-binding peptides,² have been the subject of wide-ranging multidisciplinary scientific interest.^{3,4} The composition, structure and function(s) of the physiologically relevant metal–MT complexes are still matters of debate.^{5–7} Concomitantly, the peculiar features and abilities of MTs have triggered many biotechnological applications, mainly aimed at bioremediation and/or biosensor construction. In particular, their metal-binding capacity, together with the inducibility of their encoding genes in response to heavy metals, confers on them a great potential for monitoring metal contamination in health and environment surveillance rationales.⁸ As a rule-of-thumb, it is widely accepted that the amount of metal-loaded MT in an organism is a good indicator of its exposure to heavy metals, and thus of the level of contamination of its habitat. However, the accurate quantification of MTs from biological samples still remains a challenge, with a large variety of methodologies, usually suboptimal, to choose from (reviewed in ref. 9). In most cases, quantification of MT protein requires total MT isolation from crude samples (*i.e.* cell cultures, biological fluids or tissues, organism homogenates) followed by MT isoform purification, overall encumbering in practice the use of MTs as efficient and easy to handle biological markers.

MT quantification usually relies on conventional indirect or direct methods coupled to different detection techniques. Indirect methods are based on electroanalytical or spectrometric measurement of the metal ions (usually Ag(I),¹⁰ Hg(II)^{11,12} or Cd(II)¹³) bound to an MT after its saturation (*i.e.* metal-saturation assays). However, a precise knowledge of the metal–MT stoichiometry for each MT isoform is essential

to apply this method, and this information is not always reliable, available or unanimous.⁹ Conversely, direct methods aimed at protein quantification have been developed, mainly by immunological approaches (radioimmuno- (RIA) or enzyme-linked immunosorbent- (ELISA) assays).¹⁴ Nevertheless, accuracy in this case requires suitable standards of the different MTs, not always available, and, significantly, isoform-specific antibodies, which have not been obtained for the vast majority of known MT isoforms. Finally, at gene level, the determination of the levels of MT mRNA in biological samples has also been proposed,⁹ on the basis of ion presence in the medium. Latest developments of electrochemical methods yielded the most significant advances in the field. Hence voltammetry, chronopotentiometry and polarography applications have lowered the detection range to as low as 10^{−7} to 10^{−10} M,⁹ and recently even zeptomolar sensitivity has been reported.¹⁵ Despite these attractive perspectives, electrochemical approaches entail high preparation purity, due to the interference caused by different compounds in the sample.¹⁶ In this scenario, we consider it to be of noteworthy relevance to communicate the construction and features of the first reported MT isoform-selective sensor, a potentiometric electrode for the direct quantification of mammalian MT1. We show that other MTs, specifically MT4, another mammalian MT isoform, do not interfere in the quantification of MT1, as revealed by the results of calibrations of this new electrode performed in its presence.

The mouse MT1 and MT4 isoforms are homologous, highly similar proteins (Table 1), whose metal binding features have been extensively compared.^{17–19} For this study they were recombinantly (*E. coli*) synthesized as Zn₇-MT complexes following a previously reported GST-fusion strategy that, after a thrombin cleavage step, renders notably homogeneous preparations of the MT portion, in 50 mM Tris-HCl buffer.^{17,20} MT concentration and Zn-to-protein ratios of the final preparations were assessed by atomic emission spectroscopy (ICP-AES) measurement of the S and Zn content. Also, the molecular mass of the Zn₇-MT species obtained was confirmed by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) following already described procedures.⁵

The electrodes designed in this work were of all-solid-state type using a solid internal contact commonly used in our laboratories²¹ and for the assembly of these sensors we used polysulfone as matrix. This material allows potentiometric membrane preparations²² and is hydrophilic enough to contain substances of biological origin such as enzymes,²³ antibodies²⁴ or, as in this case, MTs. MT1 was embedded into the matrix as Zn₇-MT1, which directly prevented oxidation of

^a Departament de Química, Facultat de Ciències, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: merce.capdevila@uab.cat; Fax: +34 935813101; Tel: +34 935813323

^b Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona and Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 645, E-08028, Barcelona, Spain

[†] Bioinorganic Chemistry Group.

[‡] Sensors & Biosensors Group.

[§] Separation Techniques Group.

Table 1 Amino acid sequence of the mouse MT1 and MT4 isoforms, showing their conserved cysteines, which are the residues responsible for the metal ion coordination through thiolate bonds

| | |
|-----|--|
| MT1 | MDP-NCSCTSTGGSCCTCTSSCACKNKCKTSCCKSCCSPVGCSSKCAQGCVCCKGAADKCTCCA |
| MT4 | MDPGECTCMSGGICICGDNCKCTTCSCKTCRKSCCPCPPGCAKARGCICKGGSDKSCCP |

the protein in contact with air. Hence, an electrode with a membrane containing the Zn_7 -MT1 species in one of its ends was constructed following the procedure we recently applied for metal ion-measuring MT-based electrodes²⁵ (Fig. 1). The membranes were prepared by placing a drop of a solution of 100 mg polysulfone/ml DMF in the tip of the electrode, which was put in contact with an aqueous and fairly diluted (*ca.* 5×10^{-5} M) solution of Zn_7 -MT1. This causes the coagulation of the membrane due to a phase inversion process, *i.e.* the substitution of the organic phase by water, in which polysulfone is not soluble. Concomitantly, during the coagulation process, the aqueous phase sweeps away the Zn_7 -MT1 complexes so that they become trapped in the polysulfone matrix. By these means, the Zn_7 -MT complexes go directly from the aqueous phase to the membrane, without any contact with organic solvents that could alter them.

The ability of the obtained electrodes to quantify MT1 protein was mainly characterized through potentiometric measurements on multiple calibration curves in the 5.0×10^{-8} to 5.0×10^{-6} M Zn_7 -MT1 range. All determinations were performed at least in triplicate, which ensures their reproducibility and statistical accuracy. Measurements were achieved by adding different volumes of a standard Zn_7 -MT1 solution to a fixed volume of MilliQ water (mixed solutions method),²⁵ and the corresponding data were plotted as potential *vs.* logarithm of the MT1 concentration (Fig. 2). The limit of detection was calculated as the MT1 concentration at the intersection point of the extrapolated linear segments of the calibration plots. The results of these measurements, which could be performed within a few seconds, showed good sensitivities (53 mV/dec), extremely low detection limits (1.0×10^{-7} M MT concentration) and linear ranges for MT1 concentrations above 10^{-6} M. Long lifetimes could also be ensured for dry-stored electrodes at 4 °C and in an open atmosphere after the observation that their periodic use for one month did not lead to significant changes in their

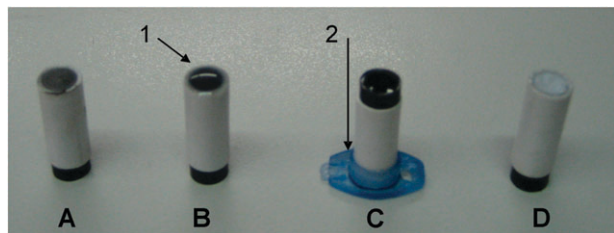


Fig. 1 Preparation process of the polysulfone membranes in the MT selective electrodes. (A) Body of the electrode with the conductive surface. (B) Addition of the solution of polysulfone in DMF; (1) drop of polysulfone in DMF. (C) Immersion of the electrode in the ionophore solution; (2) the blue container encloses the Zn_7 -MT1 solution. (D) Polysulfone membrane deposited on the end of the electrode.

performance, as occurred when they were used for metal ion measurements.²⁵ The functional pH range of these biosensors was established to be between pH 2.0 and pH 7.0, by determining their response to the presence of Zn_7 -MT1 in solutions of different pH (Fig. 3), adjusted by appropriate additions of nitric acid or sodium hydroxide. Taking into account that pK_a values for mammalian Zn-MTs have been determined to be around 5.0,²⁶ these results reveal that the method also works for partially metalated and apo-MTs, which according to some authors²⁷ are emerging as major players in MTs speciation.

Last but significantly not least, and because the main drawback of electrochemical methods is the response to the primary analyte in presence of other electroactive compounds, we also evaluated the possible interferences between MT1 and other proteins. The selectivity of the electrodes, *i.e.* the capacity of discrimination between the analyte and the interferences, has been studied by the Fix Interference Method (FIM),²⁸ a methodology that implies carrying out potentiometric measurements on solutions prepared with a fixed concentration of the interfering proteins and by varying the analyte (here MT1) concentrations. To this end, we have repeated the previous calibrations in the presence of a 10^{-6} M solution of the MT4 isoform (Table 1), which has been taken as a model for interfering molecules in view of its similarity to other mammalian MT isoforms, and the fact that it could represent a real interference in biological samples. Analysis of the results revealed that there is a clear selectivity of MT1 *vs.* MT4, as for MT1 concentrations higher than 3×10^{-6} M, the presence of background 10^{-6} M MT4 did not affect the corresponding measurement (*cf.* practical coincidence of the two curves in Fig. 2).

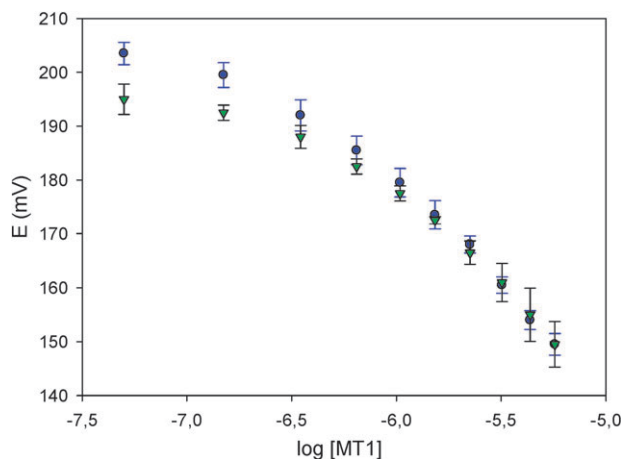


Fig. 2 Calibration of the MT1 selective electrode in water (circles) and in an aqueous solution of MT4 10^{-6} M (triangles). Bars indicate the standard deviation.

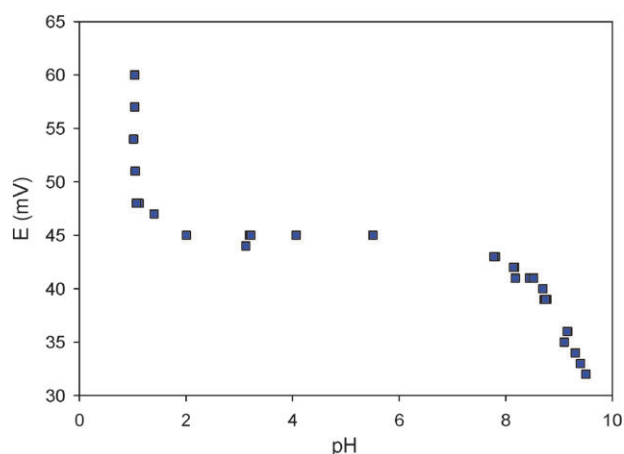


Fig. 3 Effect of the pH on the potentiometric response of the MT-selective electrode, tested at 4.0×10^{-6} M MT1 concentration.

It is true that several MTs, and other metal-interacting polypeptides, have been extensively used for the construction of biosensors, but all of them are capacitance sensors, requiring a regeneration process after each use^{29–31} and, most particularly, they are all metal-ion-sensors that make use of the coordinating features of the proteins. However, in no case has a protein-sensor been reported. Thus, to our knowledge, no previous report on the feasibility of using a protein (in this case a metal–MT complex) as its own ionophore is available. Furthermore, this and the Ag-ISE previously reported²⁵ would form a new type of sensors whose response mechanism could be close to that described for ion-exchange resin membranes but differing in the fact that the interaction between the ionophore and the analyte responds to a complexation process, which confers on them a higher selectivity depending on the different affinities of the analyte and the interferent for the ionophore. In our case, the fact that MT4 is less effective than MT1 for Zn(II) coordination¹⁷ provides a reasoning for the observed selectivity of the MT1-ISE against MT4.

Therefore, the new analytical device here presented, based in ISEs, where the ion is the MT protein, opens new perspectives for developing useful and straightforward MT determination rationales. It shows a patent selectivity and requires neither incubation nor regeneration processes. It is inexpensive because of the small amounts of protein required, it can be dry-stored in an open atmosphere, and is robust and has long lifetimes. Furthermore, its speed of response, simplicity and flexibility together with its portability make this sensor convenient for automated methodologies that can be applied for in-line analysis. Finally, if miniaturization processes are considered for these electrodes, attractive applications concerning direct measurements in tissues or cells are immediately suggested.

Overall data presented here support the hypothesis that small proteins or metalloproteins can be used in polysulfone matrixes as ionophores and open up a broad range of new possibilities in the use of MTs, and perhaps other proteins, for potentiometric sensors.

This work was financially supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (grants CTQ2009-13873

to E. Fàbregas, BIO2009-12513-C02-01 to S. Atrian and BIO2009-12513-C02-02 to M. Capdevila).

Notes and references

- M. Margoshes and B. Vallee, *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 4813.
- <http://www.unizh.ch/~mtpage/classif.html>.
- Metal ions in Life Sciences, Vol. 5: Metallothioneins and Related Chelators*, ed. A. Sigel, H. Sigel and R. K. O. Sigel, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2009, pp. 1–514.
- P. Gonzalez-Duarte, in *Comprehensive Coordination Chemistry II, Vol. 8*, ed. J. A. McCleverty and T. J. Meyer, Elsevier-Pergamon, Amsterdam, 2003, pp. 213–228.
- M. Capdevila, J. Domènech, A. Pagani, L. Tío, L. Villarreal and S. Atrian, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2005, **44**, 4618.
- R. Palmeter, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1998, **95**, 8428.
- P. Coyle, J. C. Philcox, L. C. Carey and A. M. Rofe, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, **59**, 627.
- J. C. Gutierrez, F. Amaro and A. Martin-Gonzalez, *BioEssays*, 2009, **31**, 805, and references therein.
- M. Dabrio, A. R. Rodriguez, G. Bordin, M. J. Bebianno, M. De Ley, I. Sestáková, M. Vasák and M. Nordberg, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **88**, 123, and references therein.
- J. del Ramo, A. Torreblanca, M. Martínez, A. Pastor and J. Díaz-Mayans, *Mar. Environ. Res.*, 1995, **39**, 121.
- J. F. Klaverkamp, K. Wautier and C. L. Baron, *Aquat. Toxicol.*, 2000, **50**, 13.
- P. Shaw-Allen, M. Elliot and C. H. Jagoe, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2003, **22**, 2005.
- J. P. Valles Mota, A. R. Linde Arias, M. R. Fernández de la Campa, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *Anal. Biochem.*, 2000, **282**, 194, and references therein.
- M. M. Chu, Z. Q. Guo, N. Muto, N. Itoh, K. Tanaka and H. W. Ren, *Front. Biosci.*, 2006, **11**, 2113.
- V. Adam, J. Baloun, I. Fabrik, L. Trnkova and R. Kizek, *Sensors*, 2008, **8**, 2293.
- J. Petřlova, S. Krizkova, O. Zitka, J. Hubalek, R. Prusa, V. Adam, J. Wang, M. Beklova, B. Sures and R. Kizek, *Sens. Actuators, B*, 2007, **127**, 112.
- L. Tío, L. Villarreal, S. Atrian and M. Capdevila, *J. Biol. Chem.*, 2004, **279**, 24403.
- B. Cai, Q. Zheng and Z.-X. Huang, *Protein J.*, 2005, **24**, 327.
- G. Meloni, K. Žovo, J. Kazantseva, P. Palumaa and M. Vasak, *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 14588.
- N. Cols, N. Romero-Isart, M. Capdevila, B. Oliva, P. González-Duarte, R. González-Duarte and S. Atrian, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **68**, 157.
- S. Alegret and E. Martínez-Fàbregas, *Biosensors*, 1989, **4**, 287.
- A. González-Bellavista, J. Macanás, M. Muñoz and E. Fàbregas, *Sens. Actuators, B*, 2006, **115**, 691.
- B. Prieto-Simon and E. Fàbregas, *Biosens. Bioelectron.*, 2006, **22**, 131.
- S. Sanchez, M. Roldan, S. Perez and E. Fabregas, *Anal. Chem.*, 2008, **80**, 6508.
- A. González-Bellavista, S. Atrian, M. Muñoz, M. Capdevila and E. Fabregas, *Talanta*, 2009, **77**, 1528.
- L.-J. Jiang, M. Vasak, B. L. Vallee and W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2000, **97**, 2503.
- Y. Yang, W. Maret and B. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, **98**, 5556.
- R. P. Buck and E. Lindner, *Pure Appl. Chem.*, 1994, **66**, 2527.
- I. Bontidean, J. Ahlqvist, A. Mulchandani, W. Chen, W. Bae, R. K. Mehra, A. Mortari and E. Csöregi, *Biosens. Bioelectron.*, 2003, **18**, 547.
- I. Bontidean, C. Berggren, G. Johansson, E. Csoregi, B. Mattiasson, J. R. Lloyd, K. J. Kenneth, J. Jakeman and N. L. Brown, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4162.
- P. Corbisier, C. Van der Lelie, B. Borremans, A. Provoost, V. De Lorenzo, N. L. Brown, J. R. Lloyd, J. L. Hobman, E. Csoregi, G. Johansson and B. Mattiasson, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **387**, 235.

