



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

 Facultat de Química

Programa de Doctorado
en Química



**ESTUDIO DE NUEVOS (NANO)MATERIALES
PARA EL DESARROLLO DE METODOLOGÍAS
ANALÍTICAS SOSTENIBLES**

Tesis Doctoral: NEUS JORNET MARTÍNEZ

Directores: Pilar Campíns Falcó, Jorge Verdú Andrés, Yolanda Moliner Martínez

AGRAÏMENTS

A Pilar per creure amb mi i estar al meu costat durant cadascuna de les etapes d'aquest bonic viatge que ha sigut la realització de la Tesis. Per fer-me veure que sempre hi ha una manera diferent d'arribar a bon port, inclús quan ningú més ho veu. Perquè és el meu exemple a seguir en la il·lusió, la dedicació i en les maneres de fer ciència.

A Lisa per el meravellós temps passat a Cambridge i per la seu passió per la ciència. No oblidaré mai les seues paraules: "Neus, remember always to explore the impossible"

A Yolanda, Carmen, Rosa i Jorge per la seua ajuda plena en tot moment. Especialment a Yolanda, per les seues hores dedicades a la "causa" i els seus bons consells.

Al meus companys, amb ells he compartit la majoria del temps, no sols en el laboratori sinó també fora d'ell; viatges, sopars, congressos, son moltes les aventures viscudes junts. Amb ells, cada dia em dic a mi mateixa la sort que tinc de tenir-los.

Al meu germà per els seus consells tecnològics i als meus pares que són els meus guies, el meu gran suport, per la seua motivació en aquest projecte i per la seua saviesa demostrada en cadascuna de les seues decisions.

A Miquel per recolzar-me en les meues eleccions i estar sempre a prop meu.

I als meus iaies que tan me'ls estime!

A tots ells els agraeix que formen part de la meua vida i per a tots ells els hi dedique aquest treball de ciència que també porta un poc de mi mateixa.

Espere que us agrade

El desarrollo de la humanidad es consecuencia del descubrimiento y la utilización de nuevos materiales. La importancia de los materiales en la evolución humana es tal que las primeras edades de la Historia, han sido clasificadas según los materiales utilizados en cada momento; edad de la Piedra y de los Metales (Cobre, Bronce, Hierro) en la Prehistoria, el carbón y hierro en la Revolución Industrial (s.XVIII-XIX) y en la actualidad, el petróleo. Las tecnologías actuales continúan siendo el resultado del estudio de nuevos materiales y nuevas propiedades. Este es un campo multidisciplinar donde tanto la Física, como la Química y la Ingeniería tiene una contribución destacable [1].

La aplicación de una nueva tecnología en la sociedad tiene como objetivo mejorar el bienestar de la población, sin embargo conlleva necesariamente una modificación considerable del entorno. La contaminación y el agotamiento de los recursos naturales que sufre el planeta son la consecuencia directa de ello. Es por eso que, es cada vez más imprescindible apostar por un progreso responsable que preserve la naturaleza.

Dentro de la Química, la Química Analítica trata de utilizar nuevos materiales que contribuyan no solo al desarrollo humano, sino que también consigan la preservación del medioambiente. A través de la Química Analítica Verde, disciplina constituida como tal hace no más de veinte años, se persigue como objetivo un desarrollo sostenible y respetuoso con el medio ambiente. Para ello incide en el desarrollo e implementación de procedimientos y dispositivos de análisis *in situ*, propuesta de reactivos no contaminantes, reciclado y minimización de residuos, miniaturización de procedimientos e instrumentación, reducción de costes energéticos, entre otros [2].

En la presente Tesis, nuevos (nano)materiales como las nanopartículas de oro y los nanotubos de carbono y también polímeros biocompatibles como el PDMS o biodegradables como la zeína, se han utilizado para proponer nuevas metodologías analíticas con aplicaciones tanto en el campo biomédico como medioambiental. Todas estas metodologías han sido desarrolladas siguiendo los principios de la Química Analítica Verde anteriormente mencionados y se han aplicado a muestras reales. Esto demuestra que los estudios realizados tienen una aplicación directa y pueden solventar problemas del día a día. La transferencia de los conocimientos científicos a la sociedad es el fin último de la investigación.

Progress in new technologies and advancements on material research have a deep impact on the recent developments in Analytical Chemistry. This Thesis aims to study how the introduction of these new materials has led to notable improvements in sensing, separation and extraction techniques.

Nanoscience is a growing area of research in general, and in particular in Analytical Nanotechnology. We focus on Gold Nanoparticles (AuNPs) and Carbon Nanotubes (CNTs), one of the most studied nanomaterials in Analytical Chemistry; in fact a huge number of works have been reported dealing with this issue. In this Thesis AuNPs, which is a highly sensitive material for sensing application, were studied as a plasmonic sensor for biomarker detection (spermine) in urine samples. The CNTs have been reported to be a good adsorbent in SPE. In an attempt to advance in the knowledge of the potential use of CNTs as extractive phase, in this work, CNTs have been used to functionalize capillary columns for IT-SPME. The proposed approach gave rise to an efficient extractive phase that integrates on-line extraction and pre-concentration.

Polymer materials should not be overlooked because of their versatile properties and low cost. The use of PDMS in Analytical Chemistry gained importance with its applications as stationary phase in GC, in SPME and in miniaturized sensing devices. We studied PDMS in IT-SPME coupled with CapLC-DAD for dialkyl phthalates, their degradation products and metabolites at trace level. As above mentioned, the capillary columns functionalized with CNTs for IT-SPME have been proposed as a potential alternative to conventional phases in IT-SPME for the determination of different important pollutants (PAHS, triazines, pyrethroids, and organophosphorous). One of the main applications of PDMS is their use as embedding or encapsulation agent of electronic components in the circuit chips. This Thesis, studies PDMS as encapsulation and delivery systems for several derivative reagents. There is an increasing demand to develop in situ sensors for environment pollutant monitoring. For this aim, optical sensing devices for in situ estimation of amino compounds (volatile amines, amphetamines compounds and ammonium) have been developed. Moreover, another approach using zein as an alternative biodegradable polymeric has been proposed for on-site analysis. In particular, a biodegradable device based on enzyme immobilization on solid support which has been synthesized using a biopolymer from agricultural origin (zein, protein of corn) has been successfully developed for phosphate sensing in waters.

Green aspects of sample-pretreatment and analytical methods have been the guidelines of this Thesis. Obviously, Analytical Chemistry must be close to the ecological concerns and in this scenario, the need of developing green and safe alternative methodologies is mandatory to guarantee a sustainable environment management for future generation.

INDICE

CAPÍTULO 1. OBJETIVOS	13
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	21
2.1 Metodologías sostenibles de análisis	23
2.2 Los Materiales	26
2.3 Análitos y técnicas de determinación	54
2.3.1 Ftalatos	54
2.3.2 Triazinas, hidrocarburos aromáticos, organofosforados y piretroides .	57
2.3.3 Aminas	59
2.3.4 Drogas sintéticas: AMP, MAMP, MDMA, MDA	63
2.3.5 Amonio	66
2.3.6 Aminas biogénicas	69
2.3.7 Fosfatos	72
CAPÍTULO 3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	75
3.1 Reactivos y materiales	77
3.2 Instrumentación y montajes	80
3.3 Síntesis de AuNPs	86
3.4 Preparación de sensores	88
3.4.1 Sensor de PDMS-NQS y PDMS/TEOS-NQS.....	88
3.4.2 Sensor de PDMS/TEOS-NQS-SiO ₂ NPs	89
3.4.3 Sensor de PDMS-timol	90
3.4.4 Sensor de zeína/glicerol-ALP y zeína/glicerol-OMFP	90
3.5 Procedimientos y condiciones experimentales	91
3.5.1 Obtención de la respuesta del sensor AuNPs.....	91
3.5.2 Procedimiento IT-SPME- CapLC.....	91
3.5.3 Obtención de la respuesta de los sensores poliméricos	93
3.5 Muestras.....	96
CAPÍTULO 4. LAS AuNPs COMO SENSOR PLASMÓNICO	99

4.1 Sensor plasmónico para la determinación de espermina en orina humana ..	101
4.1.1 Síntesis de AuNPs	101
4.1.2 Desarrollo del ensayo	106
4.1.3 Parámetros analíticos	113
4.1.4 Aplicación a muestras de orina	116
4.1.5 Conclusiones	124
CAPÍTULO 5. EL PDMS COMO FASE EN IT-SPME	125
5.1 Determinación en línea de productos de degradación de DEHP en aguas por microextracción en fase sólida en tubo y cromatografía líquida capilar con detector de fila de diodos (IT-SPME-CAP-LC-DAD).....	127
5.1.1 Optimización de la separación cromatográfica	127
5.1.2 Optimización de IT-SPME	128
5.1.3 Parámetros analíticos	130
5.1.4 Aplicación a muestras reales	130
5.1.5 Conclusiones	132
5.2 Determinación de ftalatos en orina humana por IT-SPME-Cap-LC-DAD ..	134
5.2.1 Optimización de IT-SPME	134
5.2.2 Parámetros analíticos	135
5.2.3 Aplicación a muestras reales	137
5.2.4 Conclusiones	139
5.3 IT-SPME modificado con CNTs para estimar contaminantes en aguas	141
5.3.1 Funcionalización de la columna capilar	141
5.3.2 Caracterización de los c-CNTs y la columna capilar	141
5.3.3 Estudio de la capacidad de adsorción de los capilares	142
5.3.4 Conclusiones	147
CAPÍTULO 6. EL PDMS COMO ENCAPSULANTE DE REACTIVOS PARA SU DISPENSACIÓN Y EL DESARROLLO DE SENSORES	149
6.1 Sensor para la determinación in situ de aminas volátiles	151
6.1.1 Preparación del sensor	152

6.1.2	Caracterización del sensor	155
6.1.3	Respuesta del sensor y parámetros analíticos	159
6.1.4	Aplicación a muestras reales	164
6.1.5	Conclusiones	165
6.2	Sensor para la determinación in situ de anfetaminas	167
6.2.1	Preparación del sensor	167
6.2.2	Estudio de la estabilidad del NQS en el sensor	168
6.2.3	Respuesta del sensor y parámetros analíticos	170
6.2.4	Aplicación a muestras reales: éxtasis	172
6.2.5	Conclusiones	175
6.3	Dispositivo dispensador de reactivos para la estimación colorimétrica de amonio	177
6.3.1	Preparación del dispositivo	177
6.3.2	Optimización del dispositivo.....	180
6.3.3	Respuesta del dispositivo dispensador en la estimación colorimétrica de amonio y parámetros analíticos	180
6.3.4	Aplicación a muestras reales	182
6.3.5	Comparación con otros métodos ópticos	183
6.3.6	Conclusiones	187
CHAPTER 7. ZEIN AS ENCAPSULANT/DELIVERY FILM OF CHEMICALS AND ENZYMES		187
7.1	Inorganic phosphate sensor base on ALP immobilization	189
7.1.1	Preparation of the bio-device and procedures.....	191
7.1.2	Study of glycerol effect on zein film.....	193
7.1.3	Study of the ALP inhibition by phosphate.....	197
7.1.4	Application in water samples	202
7.1.5	Conclusions	204
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES.....		205
BIBLIOGRAFIA.....		215
ANEXO.....		233
A1.	Listado de Figuras.....	235

A2. Listado de Tablas	243
A3. Listado de Abreviaturas.....	245
Articulos incluidos en la Tesis Doctoral	247

CAPÍTULO 1.
OBJETIVOS

El **objetivo general** de la Tesis es demostrar cómo nuevos (nano)materiales pueden mejorar de forma significativa los métodos analíticos establecidos, así como crear otros nuevos y también nuevas herramientas que contribuyan al desarrollo de metodologías más eficientes en su operatividad y sostenibilidad.

Los materiales base elegidos han sido materiales introducidos en Química Analítica en los últimos años para el desarrollo de nuevas metodologías y procesos de análisis. El número de publicaciones científicas sobre el tema en los últimos cinco años refuerza esta afirmación. Los nanotubos de carbono y las nanopartículas de oro son quizá los más estudiados desde el punto de vista de la Química Analítica y ocupan sendos capítulos de la Tesis. Así mismo tienen presencia en la misma, los polímeros sintéticos como las siliconas, concretamente el polidimetilsiloxano (PDMS). Son muchas las publicaciones científicas en las que aparece este material biocompatible y de bajo coste que ofrece múltiples posibilidades. Es por ello que se ha querido dedicar parte de la Tesis, al estudio de sus características y a desarrollar o mejorar aplicaciones en base a ellas. En este sentido, se ha utilizado como material de partida modificándolo con nanotubos de carbono y además se han sintetizado nuevas materias de base PDMS y características hidrofílicas, con el propósito de embeber reactivos para su posterior uso en ensayos o para desarrollar sensores. Sin embargo, los polímeros sintéticos no son biodegradables, por lo que en este trabajo se han explorado además las posibilidades de un polímero natural, la zeína, una proteína del maíz, para desarrollar nuevos dispositivos de análisis in situ.

Un segundo **objetivo** se ha centrado en determinar la elección de los materiales a través del conocimiento de sus características físico-químicas, para su aplicación en técnicas tanto de separación, extracción o detección. Concretamente, esta Tesis aborda dos puntos clave del proceso analítico: la extracción y la detección y en menor medida, la separación. De esta forma se estudian materiales que presenten alta sensibilidad y reproducibilidad para ser aplicados en los procesos de detección in situ de analitos y por otro lado, materiales con buenas propiedades de partición y afinidad para ser empleados en técnicas de extracción en línea. Las metodologías y técnicas propuestas en esta Tesis se han basado en todo momento en el principio de sostenibilidad:

1. El proceso de extracción se ha realizado mediante microextracción en fase sólida (SPME) que supone una alternativa a otras técnicas de extracción como la extracción líquido-líquido o la extracción en fase sólida (SPE). La SPME fue propuesta en 1989 por Pawliszyn [3] y actualmente es una de las técnicas más utilizadas en Química Analítica [4], es una miniaturización de la SPE, no requiere de volúmenes grandes de muestra y evita la utilización de disolventes orgánicos y además, es de destacar su sencillez y efectividad. En la Tesis se ha profundizado en la SPME en tubo (IT-SPME) propuesta una década después, acoplada a cromatografía líquida miniaturizada.

Capítulo 1. Objetivos

2. La cromatografía líquida miniaturizada acoplada en línea a IT-SPME es un método sostenible de análisis en cuanto que además de cumplir las características de miniaturización y automatización, reduce considerablemente las cantidades de disolventes necesarias y etapas de preconcentración que requieren un consumo energético y de tiempo de realización en muchos casos elevado. En esta Tesis se ha utilizado la cromatografía líquida capilar de alta resolución (Cap-LC) acoplada en línea a IT-SPME que permite automatizar el procedimiento analítico [5].

3. Se han desarrollado dispositivos de análisis in situ con autonomía propia y que no requieren de fuentes de energía externa.

Por otra parte, *la monitorización del medioambiente es muy importante para controlar y prevenir la contaminación, este ha sido otro **objetivo planteado***. Es por ello que la aplicación de las metodologías desarrolladas en esta Tesis se han enfocado a este fin.

Desde esta perspectiva, los **objetivos específicos** desarrollados han sido:

1. Estimar por microextracción en fase sólida en tubo y cromatografía líquida capilar con detector de fila de diodos (IT-SPME-Cap-LC-DAD) contaminantes en aguas y orina. Se ha perseguido: minimizar o evitar el pre-tratamiento de la muestra y modificar el capilar IT-SPME con el fin de mejorar la recuperación de analitos.

2. Desarrollar nuevos sensores para la detección colorimétrica de amino-compuestos que permitan su estimación in situ en matrices acuosas, atmosferas y sólidos, adecuados para evaluar el cumplimiento de la legislación correspondiente.

3. Proponer dispositivos dispensadores de reactivos para la estimación de amonio y fosfato por métodos ópticos, aportando la sensibilidad adecuada para la monitorización en aguas.

Esta Tesis se encuadra en el marco de los siguientes **Proyectos** concedidos al grupo de investigación **Miniaturización y Métodos Totales de Análisis** (MINTOTA) del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia:

- **Proyecto CTQ2011-26760:** concedido por Ministerio de Economía y Competitividad. Proyectos de Investigación Fundamental no Orientada: “Nuevas estrategias de análisis en técnicas cromatográficas miniaturizadas que incorporan la microextracción en fase sólida en tubo con nuevos (nano)materiales”. Duración 3 años.

- **Proyecto CTQ2014-53916-P:** concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad. Programa Estatal de Fomento de la Investigación

Científica y Técnica de Excelencia Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento: "Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de técnicas de cromatografía líquida miniaturizada en línea: nanopartículas, contaminación secundaria". Duración: 3 años.

- **Proyecto PROMETEO 2012/045:** concedido por la Generalitat Valenciana a grupos de investigación de excelencia de la Comunidad Valenciana (2012/2015). "Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ". Dentro del programa Prometeo, *contrato predoctoral Personal Investigador en Formación Neus Jornet Martínez*: "Estudio de Nuevos Materiales para el Desarrollo de Metodologías de Análisis Sostenibles" Desarrollado en el Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia. Duración: 3 años.

- **Proyecto traslacional PROGRAMA VLC-BIOMED:** Utilidad de un ensayo con nanopartículas de oro para la identificación de marcadores de cáncer renal en orina. Convocatoria de ayudas 2014 para la realización de actividades preparatorias de proyectos coordinados entre investigadores de la Universitat de València e investigadores del Hospital Universitari i Politécnic/Instituto de Investigación Sanitaria La Fe. Duración: 1 año.

- **Programa BEFPI:** concedido a *Neus Jornet Martínez* por la Generalitat Valenciana. Becas para estancias de becarios y contratados predoctorales en centros de investigación fuera de la Comunidad Valenciana. "Desarrollo de sensores para la detección de analitos de interés biológico y/o medioambiental". *Estancia en el Institute of Biotechnology, Department of Chemical Engineering and Biotechnology, University of Cambridge*. Dirigida por **Prof. Elizabeth Hall**. Duración: 6 meses.

Las **Publicaciones y Patentes** desarrolladas en esta Tesis han sido:

- **Patente ES248247B1:** P. Campins-Falcó, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Lagua, J. Verdú-Andrés, N. Jornet-Martínez. Dispositivo Pasivo Para la Detección y/o Determinación In situ de Aminas en Gases. Concesión con examen previo (5/03/2015) y solicitud de extensión internacional PCT/ES2014/000077. Integrada en el *banco de patentes* de la Generalitat Valenciana y en el programa *Pioneer into practice 2014 Climate KIC*.

Capítulo 1. Objetivos

- N. Jorner-Martínez, M. González-Béjar, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, Julia Pérez-Prieto. *Sensitive and Selective Plasmonic Assay for Spermine as Biomarker in Human Urine*. **Analytical Chemistry**. 2014, 86, 1347.
- N. Jorner-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó. *On-line In-tube Solid Phase Microextraction-Capillary Liquid Chromatography Method for Monitoring Degradation Products of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate in Waters*. **Journal of Chromatography A**. 2014, 1347, 157.
- M.C. Prieto-Blanco, N. Jorner-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, J. Verdú Andrés, P. Campíns-Falcó. *Development of a Polydimethylsiloxane–thymol/nitroprusside Composite Based Sensor Involving Thymol Derivatization for Ammonium Monitoring in Water Samples*. **Science of Total Environment**. 2015, 503, 105
- N. Jorner-Martínez, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés and P. Campíns-Falcó. *Designing Solid Optical Sensors for In Situ Discrimination of Volatile Amines Based on One-step Hydrophilic PDMS Preparation*. Artículo enviado a **Sensors and Actuator B**.
- N. Jorner-Martínez, C. Antón-Soriano, P. Campíns-Falcó. *Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method*. **Science of Total Environment** (en prensa).
- N. Jorner-Martínez, P. Serra-Mora, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó. *Evaluation of Carbon Nanotubes Functionalized Polydimethylsiloxane Based Sorbent Phases for In-tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography*. **Chromatography** — Open Access Separation Science Journal Special Issue "Solid Phase Micro-Extraction" Guest Editor Dr Mary Boyce. (En espera de Aprobación).
- A. Argente-García, N. Jorner-Martínez, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez, and P. Campíns-Falcó. *On-site Screening of Amphetamine and Ecstasy Type Drugs by Using a Rapid and Low-cost Colorimetric Kit*. Artículo enviado a **Talanta**.
- N. Jorner-Martínez, P. Campíns-Falcó, E.A.H. Hall. *A biodegradable zein test kit for phosphate sensing in water*. Artículo enviado a **Biosensors and Bioelectronics**.

Los **Congresos Internacionales y Nacionales** donde se han presentado los diferentes estudios realizados en esta Tesis han sido:

- VII Workshop NyNA (Salamanca) en 2015. Registrada y abstract aceptado: *Colorimetric Sensing of Urinary Spermine based on Gold Nanoparticles Aggregation* Neus Jornet-Martínez, M. González-Béjar, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, J. Pérez-Prieto.
- 42th International Symposium On High Performance Liquid Phase Separation And Related Techniques (Ginebra, Suíza) en 2015. Registrada y abstract aceptado: *IT- Cap-LC method for the study of phthalates in whole human urine*. N. Jornet-Martínez, C. Antón-Soriano, P. Campíns-Falcó.
- 16TH International Symposium on Advances in Extraction Technologies (Chania, Grecia) en 2014. Presentación de Poster: *In-Tube Solid Phase Microextraction Coupled On-Line to Capillary Liquid Chromatography for Di-ethylhexylphthalate Degradation Products in Waters*. C. Molins-Legua, N. Jornet-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, J. Verdí-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó.
- 39th International Symposium On High Performance Liquid Phase Separation And Related Techniques (Amsterdam, Países Bajos) en 2013. Asistencia y Presentación de Poster: *Fast Analysis of Phthalates And Degradation Products in Waters using In-Tube Solid Phase Microextraction Coupled On-Line to Capillary Liquid Chromatography*. N. Jornet-Martínez, P. Campíns-Falcó, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, N. Jornet-Martínez.
- 4TH SCARCE International Conference: Towards A Better Understanding of the Links Between Stressors, Hazard Assessment And Ecosystem Services Under Water Scarcity (Cadiz) en 2013. Asistencia y Presentación de Poster: *Development of New Supports for In Situ Estimation of Nitrogen Containing Compounds in Atmospheres of Wastewater Treatment Plants*. N. Jornet-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, A. Argente-García, P. Campíns-Falcó.
- ChemH₂O 2013. Leading-Edge Conference on Sustainable Water Management: Chemical Industry setting the place (Madrid) en 2013. Presentación de Poster: *In-Situ Test For Ammonium in Waters Based on Berthelot Reaction and Employing Reagents Embedded in PDMS*. P. Campíns-Falcó, M.C. Prieto-Blanco, N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua.

Capítulo 1. Objetivos

- 3RD. SCARCE International Conference. Bridging toxicants stressors and risk-based management under water scarcity (Valencia) en 2012. Asistencia. N. Jornet-Martínez.
- ERC Grantees Conference 2012: Frontier Research in Chemistry. (Estrasburgo, Francia) en 2012. Presentación de Poster. *Gold Nanoparticles-based colorimetric sensors for detection of amino compounds*. Y. Moliner-Martínez, M. González-Béjar, Neus Jornet-Martínez, Eduardo Pino, P. Campíns-Falcó, J. Pérez-Prieto.

CAPÍTULO 2.
INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la Química Analítica desde mitad del siglo XX ha estado muy marcado por el desarrollo de la tecnología y la incorporación de nuevos (nano)materiales [5]. La tecnología ha evolucionado considerablemente debido a la informática y esta a su vez, ha contribuido muy significativamente a la automatización de los procedimientos. Este hecho, ha permitido analizar un número importante de datos en un período breve de tiempo y sin necesidad de la presencia del operador en todo momento en el proceso. La miniaturización ha sido el siguiente paso en la evolución de la tecnología. El diseño de sistemas cada vez más pequeños supone utilizar cantidades menores tanto de reactivos como de disolventes así como generar menos residuos, lo que influye positivamente en la sostenibilidad del análisis. Además pueden proporcionar mejor sensibilidad y selectividad en algunos casos. Los avances y estudios realizados sobre materiales y sus propiedades, es otro de los factores clave en el desarrollo de la Química Analítica. Los materiales que se han utilizado a lo largo de la historia han cambiado la manera de entender e interactuar con el entorno.

Actualmente, los nanomateriales están suponiendo toda una revolución. La nanociencia ha experimentado una expansión increíble en un período relativamente breve de tiempo. Esto se debe principalmente a que el estudio de nanomateriales ha afectado a casi todas las disciplinas experimentales, es por lo que supone una auténtica revolución científica. Los nanomateriales también se han introducido en la Química Analítica, presentan propiedades muy diferentes a las que presentan los materiales a escala macroscópica.

Los polímeros sintéticos son también materiales muy importantes en la sociedad actual. Uno de los ejemplos más destacados son los plásticos, invento del siglo XX que ha sustituido al vidrio y metales en muchos de los ámbitos de uso. Sus propiedades elásticas, biocompatibilidad, estabilidad, entre otras son las responsables de un uso tan extendido. Sin embargo, teniendo en cuenta que cada vez más se apuesta por materiales más ecológicos, muchos de los polímeros sintéticos como los plásticos poseen como desventaja que no son biodegradables. Además, se obtienen a partir de una fuente de energía natural que no es renovable, el petróleo. Tanto en el presente como en un futuro próximo es necesario apostar por materiales más ecológicos y biodegradables. Los polímeros biodegradables serán probablemente los sustitutos ecológicos de los actuales plásticos.

2.1 METODOLOGÍAS SOSTENIBLES DE ANÁLISIS

La **Química Verde** surge a principio de los noventa como un movimiento entre la comunidad química que apuesta por evitar la utilización de productos y disolventes dañinos para el medio ambiente y generar menos residuos, con el fin de desarrollar

Capítulo 2. Introducción

métodos más limpios y respetuosos con el medio [6]. La Química **Analítica Verde** se configura como tal a principio de siglo XX y su objetivo es analizar y validar las nuevas metodologías y tecnologías desde un punto de vista de la eficiencia ecológica en los procesos y su repercusión medioambiental. La Química Analítica tiene una característica destacable que es su carácter práctico, una parte importante de la Química Analítica trata de mejorar la aplicabilidad de un proceso experimental de análisis, es por tanto muy importante que el químico analítico tome una especial concienciación por el impacto que el desarrollo de nuevas tecnologías puede suponer para las generaciones futuras y la conservación del medio ambiente [7].

El desarrollo de métodos analíticos sostenibles significa básicamente desarrollar procedimientos en los que se utilicen a) productos y disolventes no tóxicos en cantidades pequeñas de forma que se generen los menores residuos posibles que serán convenientemente tratados, b) automatizar y reducir etapas en el proceso, y también c) reducir al máximo el consumo de energía, d) garantizar la seguridad del operador y su entorno en todo momento y en algunas ocasiones, e) controlar el problema in situ. **Los 12 principios de la Química Verde** son [8]:

1) **Prevención:** es mejor evitar la producción de residuos que limpiar o tratar los residuos creados.

2) **Economía atómica:** los métodos sintéticos deben ser diseñados de forma que incorporen al máximo, en el producto final, todos los materiales utilizados durante el proceso.

3) **Síntesis menos perjudiciales:** siempre que sea posible, los métodos sintéticos deben ser diseñados para utilizar y generar sustancias que tengan poca o ninguna toxicidad para la salud humana y el medio ambiente.

4) **Reactivos químicos seguros:** Se deben elegir los reactivos químicos que además de cumplir con su función en el proceso, posean la menor toxicidad.

5) **Disolventes y otros productos auxiliares seguros:** El uso de sustancias auxiliares (por ejemplo, disolventes, agentes de separación, etc.) debe evitarse siempre que sea posible y ser inocuos cuando se utilice.

6) **Eficiencia energética:** La energía utilizada en los procesos químicos debe ser analizada según su impacto ambiental y económico, y debe ser minimizada. Si es posible, los métodos sintéticos deben llevarse a cabo a temperatura y presión ambiente.

7) **Utilizar materias primas renovables:** Los materiales utilizados han de provenir de una fuente renovable en vez de agotable, siempre que sea técnica y económicamente factible.

8) **Reducir derivatizantes:** La derivatización innecesaria (uso de grupos de bloqueo, protección / desprotección, modificación temporal de los procesos físico / químicos) debe reducirse al mínimo o evitarse si es posible, debido a que estas medidas requieren reactivos adicionales y pueden generar residuos.

9) **Catálisis:** Los catalizadores (lo más selectivos posibles) son superiores a los reactivos estequiométricos.

10) **Degradación:** Los productos químicos utilizados serán elegidos de manera que al final de su función se descompongan en productos de degradación inocuos y no persistentes en el medio ambiente.

11) **Análisis en tiempo real para la Prevención de la Contaminación:** Las metodologías analíticas deben desarrollarse todavía más para permitir el proceso de seguimiento y control en tiempo real antes de la formación de sustancias peligrosas.

12) **Química segura para la Prevención de Accidentes:** Las sustancias y la forma en que las sustancias son utilizadas en un proceso químico deben ser elegidas para minimizar la posibilidad de accidentes químicos, incluyendo las emanaciones, explosiones e incendios.

De la lectura e interpretación de estos 12 principios se pueden derivar algunas consideraciones directamente relacionadas con la Química Analítica, a tener en cuenta:

- 1) **Evitar la generación de residuos y tratar los residuos generados.**
- 2) **Integrar los procesos en-línea y reducir etapas.**
- 3) **Elegir procesos de análisis que contaminen lo menos posible.**
- 4) **Evitar utilizar reactivos tóxicos.**
- 5) **Utilizar menores cantidades de reactivos y disolventes.**
- 6) **Evitar la utilización de fuentes de energía externa o reducir su consumo.**
- 7) **Utilizar materiales que provengan de fuentes renovables.**
- 8) **Desarrollar métodos automatizado y miniaturizados y de determinación multianalito.**
- 9) **Desarrollar metodologías para el análisis in situ.**
- 10) **Garantizar la seguridad del operador.**

2.2 LOS MATERIALES

Existen muchos tipos de materiales y diferentes criterios para clasificarlos, una posible clasificación atiende a sus propiedades. Tres grandes grupos se pueden considerar: materiales metálicos, cerámicos y poliméricos. Con el fin de obtener una visión más bien amplia de nuevos materiales y sus aplicaciones, en esta Tesis se contemplan los tres tipos: las nanopartículas de oro (AuNPs) como material metálico, los nanotubos de carbono (CNTs) como material cerámico y el polidimetilsiloxano (PDMS) y la zeína como materiales poliméricos. Las AuNPs y los CNTs presentan propiedades muy específicas consecuencia de su tamaño nanométrico, propiedades características que son diferentes a las propiedades del material a escala macroscópica, con lo que estos materiales también se pueden clasificar dentro del amplio grupo de los nanomateriales.

Materiales metálicos

Los metales se han utilizado desde la prehistoria. Su conocimiento y utilización ha marcado las diferentes etapas de la evolución de la humanidad (Edad del bronce y Edad del Hierro). Actualmente se siguen descubriendo nuevas propiedades de metales conocidos como el oro, la plata, el hierro, el cobre o el estaño. Como principal característica de los metales cabe destacar que son conductores del calor y de la electricidad. Esto se debe a que poseen electrones capaces de moverse libremente a través del material. Otra característica resaltante es que son reflejantes, el metal en presencia de luz absorbe todas las longitudes de onda de luz incidente, esto provoca la excitación de los electrones a niveles superiores no ocupados, produciéndose una corriente y descarga rápidamente, y emitiendo luz. El resultado es el color característico con el que fácilmente se puede identificar el material como material metálico.

Las nanopartículas de oro

A escala nanométrica, el proceso de reflexión y conducción del metal es diferente, los electrones libres (son los electrones d en el oro y la plata) también se mueven a través de la superficie metálica, pero en presencia de una radiación electromagnética que posee un tamaño mayor al de la nanopartícula como es la luz, entran en condiciones de resonancia, **Figura 1** [9].

De esta manera se produce la oscilación de los electrones libres (pero confinados en la superficie) de la nanopartícula metálica, provocados por el efecto de la onda electromagnética incidente. La nanopartícula se polariza y los electrones oscilan en resonancia con la frecuencia de la onda electromagnética. Los electrones en las nanopartículas a diferencia de en los metales no se pueden mover libremente sino que su movilidad queda confinada al tamaño nanométrico de la partícula. Se generan

oscilaciones de cargas eléctricas que tienen como consecuencia una dispersión de la onda incidente, *scattering*.

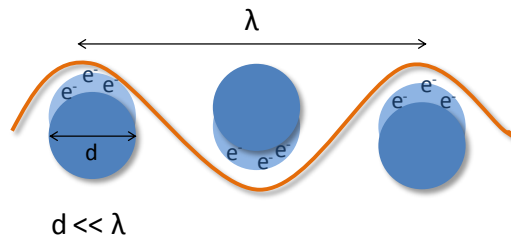


Figura 1. Ilustración esquemática de la superficie plasmónica localizada a partir de una esfera metálica mostrando el desplazamiento de la nube de carga electrónica respecto al núcleo. El diámetro de la esfera es d y la longitud de onda de la luz es λ .

El color de las nanopartículas es diferente al color del metal a escala macroscópica, la luz ya no es completamente re-emitida, en este caso el color es el resultado de la combinación de la luz absorbida y la dispersión. Aparece una nueva banda de absorción en el espectro UV-visible cuya posición y características dependen de la absorción y el scattering espectroscópico, pero además de la forma, el tamaño y la constante dieléctrica de la nanopartícula metálica [10]. Esta es la banda de superficie plasmónica (PBS; Surface Plasmon Band”) (**Figura 2**).

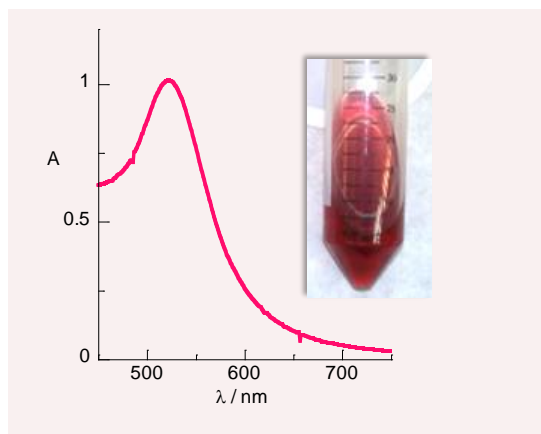


Figura 2. Banda de superficie plasmónica para AuNPs esféricas de entre 15-20 nm y fotografía del color de las AuNPs.

Capítulo 2. Introducción

Las AuNPs son uno de los nanomateriales de mayor relevancia [11] Desde el año 2000 el número de publicaciones ha ido creciendo (Ver la **Figura 3**) siendo más de 51.000 en los últimos cinco años las que utilizan AuNPs en diferentes disciplinas como la Química y también en Medicina, según se extrae de la base de datos *web of science*.

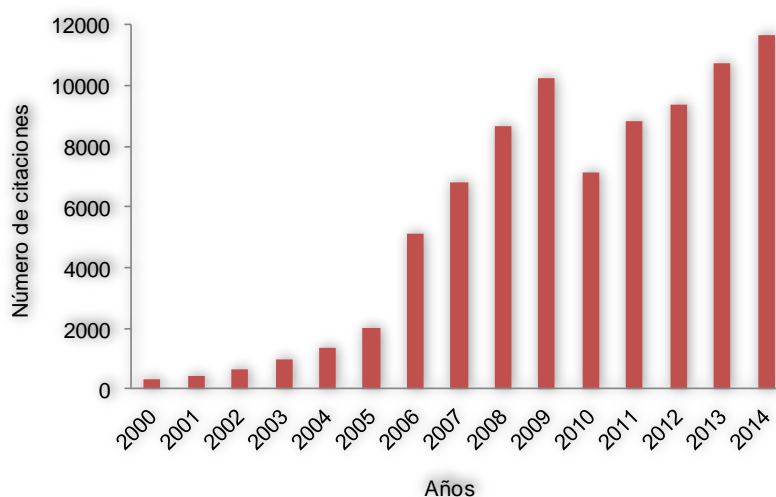


Figura 3. Evolución en el número de citaciones sobre AuNPs des del año 2000. Fuente Web of Science (Mayo 2015).

En general, la síntesis de nanopartículas, se basa principalmente en la reducción del metal en forma de sal en disolución con un estabilizador apropiado que controle su crecimiento y evite su agregación con otras nanopartículas [11]. Los estabilizadores (normalmente ligandos orgánicos, surfactantes ácidos orgánicos, polímeros y también iones) se absorben o coordinan en la superficie de la nanopartícula inhibiendo la repulsión Coulombica [12] y/o impedimento estérico [13].

Normalmente, la síntesis de AuNPs se realiza a partir de Au^{+3} y el crecimiento de las nanopartículas sigue la teoría de Maduración de Ostwald (**Figura 4**) [14]. En cuanto al proceso de crecimiento y formación de AuNPs puede describirse en tres etapas. La primera de ellas, es la etapa de nucleación, donde a partir del Au^{+3} se forman núcleos de Au^0 por reducción. Estos se forman debido a que las AuNPs de menor tamaño están favorecidas cinéticamente. La siguiente, es la etapa de crecimiento, donde los núcleos de Au^0 se adicionan unos con otros. Esta etapa se encuentra favorecida termodinámicamente, puesto que las AuNPs de mayor tamaño son más energéticas. La tercera y última, es la etapa de coagulación, en ella se produce un crecimiento rápido de las AuNPs por adición de varias de ellas [15] (**Figura 4**). El control de esta etapa es determinante para el tamaño

final de las AuNPs. Para ello, se utilizan diferentes estabilizantes que son capaces de delimitar el crecimiento. En la **Tabla 1** se muestran diferentes tipos de síntesis, entre las más utilizadas se encuentran la síntesis de AuNPs con citrato (Ver **Tabla 1** [16]) y utilizando tioles como estabilizante (Ver **Tabla 1** [17]). En esta Tesis se presenta una nueva síntesis de AuNPs que consigue nanopartículas semi-desnudas, es decir, que no están estabilizadas por ligandos, surfactantes o polímeros sino que están estabilizadas por aniones como Cl^- de la sal metálica o HO^- del agua (Ver **Tabla 1** [18]). Son las llamadas AuNPs ultralimpias (Ver **Sección 3.3**).

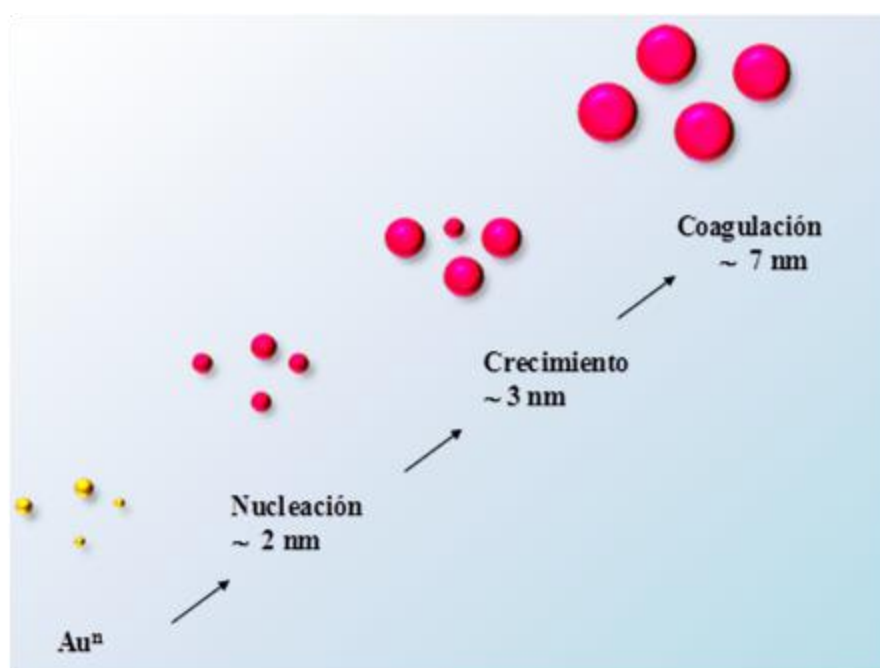


Figura 4. Proceso de formación de nanopartículas por etapas: nucleación, crecimiento y coagulación.

Sensores Plasmónicos

Las AuNPs pueden sintetizarse de forma sencilla (**Tabla 1**) y presentar gran estabilidad (son unas de las nanopartículas metálicas más estables) poseen características optoelectrónicas únicas y una gran relación superficie-volumen con excelente biocompatibilidad utilizando ligandos apropiados. Además, la mayoría de sus propiedades dependen de su tamaño y forma que puede modificarse utilizando diferentes

Capítulo 2. Introducción

procesos sintéticos. Estas cuatro características hace que las AuNPs sean unos excelentes materiales para el desarrollo de (bio)sensores [19].

Desde el descubrimiento del fenómeno de la superficie plasmónica en 1980, el desarrollo de sensores plasmónicos para detectar tanto especies químicas como biológicas, ha experimentado un gran crecimiento. En solo los últimos 5 años existen más de 6.600 publicaciones en las que se utilizan las nanopartículas de oro como sensores plasmónicos (Base de datos Web of Science). En las **Tabla 2** se muestran sensores plasmónicos representativos que utilizan AuNPs esféricas, clasificados según el tipo de compuesto analizado.

Un sensor plasmónico es aquel que tiene como señal analítica cambios en la banda de superficie plasmónica (SPB). Estos cambios pueden medirse por espectroscopía UV-vis monitorizando la banda de plasmón, ya sea por ensanchamiento o por desplazamiento de la misma. La superficie de resonancia de las AuNPs esféricas y monodispersadas da lugar a disoluciones de un color rojo brillante (~520 nm), sin embargo cuando se producen cambios en la morfología de las AuNPs, provocados en la mayoría de los casos por una agregación de las AuNPs, el color de la disolución cambia. La agregación de las AuNPs de un tamaño apropiado ($d > 3.5\text{nm}$) induce a un acoplamiento entre partículas de la superficie de resonancia de las AuNPs resultando en un cambio de color del rojo al azul (~650 nm) a niveles nanomolares. El cambio de color durante la agregación AuNP (o redispersión de un agregado) proporciona una estrategia práctica para la detección colorimétrica por absorción de cualquier analito que directa o indirectamente desencadene la agregación de las AuNPs [20,21] (Ver **Figura 5**). Por tanto, teniendo en cuenta que la agregación depende de la concentración del analito, es posible cuantificar la concentración de analito presente a partir de los cambios observados en la SPB.



Figura 5. Cambio de color de las AuNPs consecuencia de una agregación progresiva (del rosa al azul) según la cantidad de analito añadido.

Una de las ventajas más destacables de este tipo de sensores es la alta sensibilidad, se pueden detectar analitos en concentraciones nM o incluso pM (Ver **Tabla 2** [18, 22, 23] y [24-26]). Además su detección es sencilla por inspección visual, no se requieren equipos complejos ni fuentes de energía externas. La utilización de ligando unidos a la AuNPs permite una detección selectiva de moléculas pequeñas y dianas biológicas. Una de las principales desventajas de estos sistemas es la reproducibilidad de las síntesis. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos sintéticos que permiten la obtención de AuNPs cada vez más reproducibles (Ver **Tabla 1** [18]).

Tabla 1. Síntesis de AuNPs esféricas

Método de síntesis	Tipos de estabilizantes	Reactivos más comunes	Etapas generales	Ventajas de la síntesis	Inconvenientes de la síntesis	Aplicación	Ref.
Método Turkevich	Citrato	Citrato y HAuCl ₄	1. El Au (III) se reduce con citrato a temperaturas cercanas a la ebullición. El citrato, también actúa como estabilizante.	-1 sola etapa -Simple -Pocos reactivos -Medio acuoso	-T° ebullición	Sensores	15
Método Brust-Briffrin	Dodecatiol	NaBH ₄ , dodecatiol bromuro de tetraoctil-amonio y HAuCl ₄	1. El AuCl ₄ se transfiere del tolueno a la fase acuosa utilizando el surfactante bromuro de tetraoctilamonio y 2. Se reduce el oro con bromuro de sodio (NaBH ₄) en presencia de dodecatiol.	-T° ambiente -Alta estabilidad T° -Redisolución sin dispersión -Fácil funcionalización y modificación del ligando	-2 etapas -Más reactivos -Medio inicial es tolueno	Sensores	16
Con productos naturales	Quitosano	NaBH ₄ , Quitosano y HAuCl ₄	1. Se mezclan el quitosano y HAuCl ₄ en agua (1h). 2. Se añade el NaBH ₄ .	-Biocompatible - Medio acuoso	-Polidispersidad -Baja estabilidad (pH, T°, sales) -Requiere un reductor NaBH ₄ .	Sensores Catálisis Biomedicina	27
	Extractos naturales	HAuCl ₄ y extracto natural	1. Se añade el extracto natural a una disolución de HAuCl ₄ a temperatura de ebullición	-Biocompatible -Medio acuoso -Algunos casos no necesitan de reductor	Polidispersidad Baja estabilidad (pH, T°, sales)	Medicina Biología	28

Con polímeros	Polietilenglicol Polivinilalcohol otros	NaBH ₄ , HAuCl ₄ , polímero	1. Se prepara una disolución que contenga HAuCl ₄ , NaBH ₄ , polímero.	-Gran estabilidad con el tiempo -Se puede modificar su solubilidad -Mayor compatibilidad y procesabilidad	-Menor accesibilidad a la NP	Catálisis Óptica Biología Medicina	29
Fotoquímico	-	HAuCl ₄ , H ₂ O ₂	1. Se prepara una disolución de HAuCl ₄ , H ₂ O ₂ en agua 2. Se somete a ablación láser gota a gota	- Síntesis de AuNPs sin ligando -Posibilidad de elegir el ligando - Controlar el tamaño según el ligando	-Se requiere de un dispositivo específico: Láser - Se necesita una fuente de energía - Proceso lento (gota a gota)	Catálisis (TiO ₂ -AuNP) Sensor Biología Medicina Ópticos	30
Térmico	-	HAuCl ₄ , H ₂ O ₂	1. Se prepara una disolución de HAuCl ₄ , H ₂ O ₂ en agua 2. Se somete a ablación laser	-Síntesis de AuNPs sin ligando -Posibilidad de elegir el ligando - Mayor accesibilidad a la AuNPs	Se requiere de un dispositivo específico: Láser - Se necesita una fuente de energía	Sensores Ópticos	18 *

* En esta Tesis

Tabla 2. Sensores plasmónicos colorimétricos con AuNPs

Tipos de Analitos		Tipo AuNP	Estrategia de detección	Sensibilidad	Selectividad	Respuesta	Muestras	Ref
Cationes	Hg ⁺²	Timina-AuNP	Agregación AuNP por la coordinación Timina-Hg-Timina	50 nM	-	<ul style="list-style-type: none"> Rosa a violeta Inmovilización en papel de celulosa Tiempo 40 min 	Aguas de estanque y aguas de río	22
	Pb ⁺²	Glutación -AuNPs	Agregación AuNP-glutación por la formación de un complejo Pb (II)-glutacion	0.1 nM	No interferentes: Mg ⁺² , Ca ⁺² , Hg ⁺² , Mn ⁺² , Fe ⁺² , Cu ⁺² , Ni ⁺² , Co ⁺² , Zn ⁺² , Cd ⁺²	<ul style="list-style-type: none"> Rosa a violeta Respuesta instantanea pH 8 	Plásticos, juguetes de plásticos y en agua	24
Aniones	CN ⁻	Au@Ag Nucleo/ exterior	Formación de AuNP por la liberación Ag ⁺ para formar AgCN	1200 µM (200-100.000M)	Interferente: Iodo No interferentes SCN ⁻ , IO ₃ ⁻ , PO ₄ ²⁻ (2mM), SO ₄ ²⁻ , SO ₃ ²⁻ , AcO ⁻ , BO ₃ ⁻ , CO ₄ ²⁻ , HCO ₄ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , NO ⁻ , BrO ₄ ⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , F ⁻ (4mM), I ⁻ (80µM)	<ul style="list-style-type: none"> Amarillo a rosa Sensor agarosa gel (8-80 µM) 	Aguas (Conc. Máx. permitida en aguas 1.9 µM)	31
	F ⁻	Ácido tiobarbuti co-AuNPs	La formación de enlaces H-F entre AuNP-ácido tiobarbúrico provoca agregación masiva y pérdida de color	10 · 10 ⁶ nM	No interferentes: AcO ⁻ , NO ₃ ⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , Cl ⁻ , Br ⁻ , I ⁻ (10 mM)	<ul style="list-style-type: none"> Rosa a incolora pH=7-8 Tiempo 40 s 	-	32

Moléculas orgánicas pequeñas	TNT	Citrato-AuNP	Agregación AuNPs por la formación complejo Meisenheimer	10 nM (0.1- 100 nM)	No interferentes: ácido picric, ni el DNT	<ul style="list-style-type: none"> • Incolora a rosa • 15 min 	-	22
	Cocaína	Adaptador anti cocaína-AuNP	Agregación AuNP de consecuencia de tres fragmentos de adaptamero anti-cocaína y cocaína con la T ^o	2000 µM (2-200·10 ⁻³ nM)	-	<ul style="list-style-type: none"> • Rosa a violeta • No se puede realizar el ensayo en presencia de ATP, UTP, CTP 	Orina humana y serum filtrado	32
	Spermina	AuNPs	Agregación AuNPs consecuencia de la afinada de las AuNPs por las aminas	72 nM (72-250 nM)	No interferentes: urea, ácido úrico, creatinina, GSH, BSA	<ul style="list-style-type: none"> • Rosa a violeta 	Orina humana voluntarios sanos/ paciente con cáncer	18*
	Oligo nucleotido	Citrato-AuNP	Agregación AuNPs por la hibridación de las cadenas antiparalelas de DNA	0.050 nM (0-0.5nM)	Altamente selectivo al DNA complementario	<ul style="list-style-type: none"> • Rosa/violeta • Tiempo 60 min • Detección visual 100pM 	-	24
Proteínas	Ricina	Citrato-AuNP	Agregación de las AuNPs por el daptador de peroxidasa y la ricina	0.3 nM (0.3-11nM)	No interferentes: Trombina, peroxidasa del rábano, lisosoma, albumina bovina, glucoxidasa.	<ul style="list-style-type: none"> • Rosa/violeta • 5 min 	Pepsi Cola y leche en polvo	25

*En esta Tesis

Materiales poliméricos

El PDMS y la zeína son materiales poliméricos. Los compuestos poliméricos se caracterizan por estar formados por la unión covalente de moléculas más pequeñas. Suelen formar cadenas largas donde las moléculas pueden rotar alrededor de los enlaces covalentes otorgando a la estructura gran flexibilidad. También, suelen unirse las cadenas largas entre sí mediante fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. Los polímeros presentan diferentes clasificaciones, una de ellas está basada en su procedencia; polímeros sintéticos o polímeros de origen natural. Los polímeros sintéticos del siglo XX por excelencia son los plásticos [1].

Los plásticos son utilizados en amplios sectores de la sociedad debido principalmente a su bajo coste y a sus propiedades como elasticidad y flexibilidad, y su impermeabilidad, estabilidad a la corrosión y temperaturas ambientales entre otras. Algunos de los plásticos o polímeros sintéticos como el PDMS son biocompatibles, es decir, que no interfieren ni degradan el medio biológico, son farmacológicamente inertes, con lo que se utilizan para prótesis e implantes en medicina.

Los polímeros naturales, como la zeína, son polímeros procedentes de plantas y animales como la madera, el caucho, la lana y el algodón, entre otros. También son polímeros naturales, las macromoléculas como las proteínas (fibrinas, colágeno), los polisacáridos (celulosa, alginatos) y los ácidos nucleicos (ADN, ARN). Los polímeros naturales, a diferencia de la gran mayoría de los polímeros sintéticos más utilizados, son materiales biodegradables; no solo no interfieren en el entorno sino que se descomponen en sus componentes químicos por la acción de agentes biológicos como microorganismos, animales o plantas en su ambiente natural en un periodo de tiempo razonable (menos de 5 años). De esta manera no se evitan problemas de contaminación, liberación de toxinas (**Sección 5.1 y 5.2**) y gestión de residuos, su presencia en el medio ambiente es inocua.

El polidimetilsiloxano (PDMS)

Las siliconas poseen innumerables aplicaciones en diferentes áreas de la vida cotidiana. Este hecho se ve reflejado en el número de citaciones sobre el PDMS que se ha incrementado desde 2000 (Ver **Figura 6**). Las siliconas están formadas básicamente por carbono, hidrógeno y silicio. El polidimetilsiloxano (PDMS) es una clase de silicona, de una cadena muy flexible de unidades $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ [34]. Normalmente las siliconas son sintetizadas a través de una reacción de hidrosilación catalítica y son bastante utilizadas en dispositivos eléctricos [35]. Debido a sus características (Ver **Tabla 3**): transparente [36] no es tóxico [37], ni reactivo con la mayoría de productos químicos, ni

bioacumulable [38], también se ha utilizado ampliamente en medicina (implantes, sondas, marcapasos, siliconas de agujas y jeringas, lubricación de dispositivos médicos). Son materiales algo permeables a ciertos disolventes [39] y bastante permeables a gases [40]. La gran flexibilidad de la cadena junto con las interacciones relativamente débiles de los segmentos individuales de PDMS permiten una permeabilidad mayor que otras siliconas. Es estable a la temperatura en un amplio rango (50–200°C) [41] pudiendo proteger diferentes componentes, normalmente componentes electrónicos encapsulados [35] o embebidos en su interior, a los cambios ambientales y golpes.

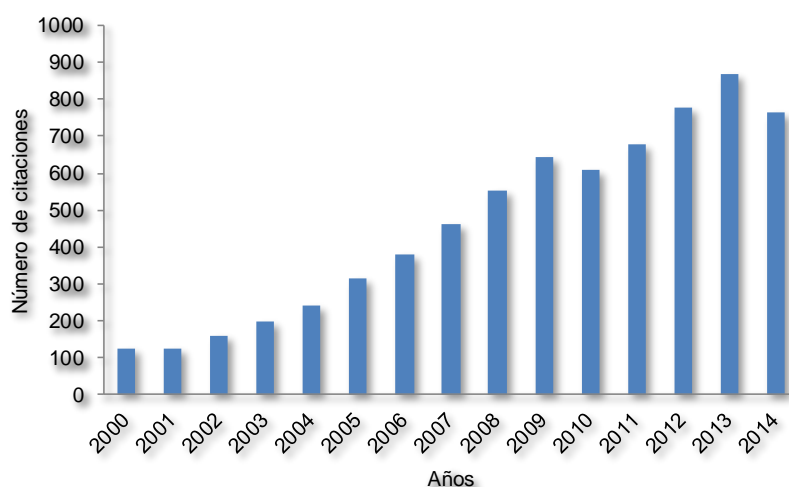


Figura 6. Evolución en el número de citaciones sobre PDMS desde el año 2000. Fuente Web of Science (Mayo 2015).

El PDMS es un material hidrofóbico que cuando es expuesto a disolventes hidrofóbicos absorbe el disolvente y se hincha mientras que con disolventes hidrofílicos como el agua, acetonitrilo, dimetilsulfoxido, nitrometano y etilenglicol, utilizados frecuentemente en Química Analítica, el PDMS los absorbe muy poco y apenas se hincha. Esta propiedad hace posible utilizar el PDMS para extraer analitos de medios acuosos, para su análisis y cuantificación. A partir del parámetro de solubilidad de diferentes disolventes; polar, polar moderado y apolar, es posible conocer el grado de absorción del polímero por el disolvente. [39]

La hidrofobicidad del PDMS puede ser una limitación en su aplicación en diferentes áreas como es el diseño de microfluidos, para imprimir su superficie o embeber cromóforos o moléculas biológicas, también para facilitar el crecimiento celular en su interior o para mejorar su biocompatibilidad. Los mecanismos que se proponen para impartir hidrofiliidad son en la mayoría de los casos son tratamientos químico-físicos complejos, se necesita un equipamiento específico con el que se realiza un tratamiento

Capítulo 2. Introducción

físico con UV/ozono [42] o con plasma de oxígeno [43], y químicos laboriosos; requieren diferentes etapas para 1) activación y 2) la funcionalización [44]. En todos los casos se consigue hacer más hidrofílica la superficie del polímero, sin modificar su interior.

El proceso de sorción es un fenómeno de absorción/adsorción donde las moléculas de analito se difunden en el polímero homogéneo [10]. Este se basa en el principio de búsqueda del equilibrio, si existe una diferencia en el potencial químico de una especie entre dos fases en contacto, se producirá un movimiento neto de esta especie hacia una fase con el fin de llevar el sistema al equilibrio. Las propiedades de sorción del polímero hacia un compuesto químico se miden a través de la concentración relativa del analito entre el PDMS y la matriz en contacto con el polímero y suelen ser descritas a través de dos parámetros termodinámicos fácilmente convertibles utilizando la ecuación para gases ideales. Los parámetros son la solubilidad (S) y el coeficiente de partición (K), aunque es este último el más utilizado en química analítica. El coeficiente de partición (K) se define como el coeficiente entre la concentración del analito en la fase vapor o líquida y la concentración en el equilibrio (**Ecuación 1**).

$$K = \frac{C_m}{C_g}$$

Ecuación (1)

La permeabilidad es la propiedad por la cual un material permite que un flujo lo atraviese sin modificar su estructura interna. La permeación se basa en el principio de restauración del equilibrio, cuando hay una diferencia entre las concentraciones de un analito soluble a cada lado de una membrana del polímero, se produce un flujo neto de la sustancia química de un lado de la membrana para el otro. La permeabilidad (P) es el producto entre el coeficiente de partición (K) y el coeficiente de difusión (D) del polímero (**Ecuación 2**).

$$P = DK$$

Ecuación (2)

La difusión es el transporte de moléculas en una membrana a favor del gradiente de concentración. Matemáticamente se describe con la ley de Fick; donde J es el flujo de una especie química a través de una membrana por unidad de área y tiempo, es proporcional al gradiente de concentración entre las dos superficies de la membrana. La constante D es el coeficiente de difusión de la sustancia química en el material (**Ecuación 3**).

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x}$$

Ecuación (3)

La permeabilidad de las moléculas de vapor en el PDMS está gobernada principalmente por el coeficiente de partición frente a la difusión en el polímero [45].

Aplicaciones analíticas

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de extracción consolidada debido a su simplicidad, rapidez y amplia aplicación. Combina extracción y preconcentración en una sola etapa (evitando la utilización de disolvente) con lo que contribuye a la Química Analítica Verde.

La microextracción en fase sólida (SPME) se puede decir que deriva de la miniaturización de la SPE, se basa en la extracción de analitos de la matriz para posterior desorción mediante temperatura o disolvente orgánico. El dispositivo de SPME consiste en una fibra corta de sílice fundida recubierta de un polímero o sorbente sólido. La sección recubierta de la fibra es de 1 cm de largo [4] y se encuentra dentro de una aguja de acero. Uno de los primeros polímeros o fase de extracción propuesta fue el PDMS y actualmente sigue siendo uno de los más utilizados.

Cuando el PDMS se expone a la matriz de la muestra, se produce un transporte de analitos desde la matriz al PDMS hasta que se alcanza el equilibrio. Es en este momento cuando la extracción se considera completa. La ecuación que describe el proceso dinámico de adsorción es el siguiente (Ecuación 4):

$$n = \frac{K_{fs} C_0 V_s V_f}{V_s + K_{fs} K_f} \quad \text{Ecuación (4)}$$

donde K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre el aire/disolución y la fase de extracción, V_f es el volumen de la fase de extracción, V_s es el volumen de la muestra y C_0 es la concentración del analito [4]. Cuando el volumen de la muestra es muy grande en comparación con el volumen de la fase de extracción, la cantidad de analito (n) recogida por la fibra en equilibrio está dado por la **ecuación 5**.

$$n = K_{fs} C_0 K_f \quad \text{Ecuación (5)}$$

La utilización de SPME en fibra supone un problema en cuanto a la fragilidad mecánica de las fibras, la pequeña dimensión de los recubrimientos para acoplarla a los sistemas de cromatografía líquida. Es por ello, que el SPME en tubo (IT-SPME) se desarrolló como alternativa al uso de SPME en fibra. En el IT-SPME el material utilizado más comúnmente como revestimiento es el PDMS (**Figura 7**). El PDMS es inerte, térmicamente estable y soporta muchos ciclos de temperaturas durante su tiempo de uso, de ahí su aplicación en columnas capilares de CG [46]. Además, se ha demostrado que la

Capítulo 2. Introducción

utilización de columnas de gases dan muy buenos resultados al ser acopladas a equipos de cromatografía líquida [45]. Las ventajas de utilizar IT-SPME en CL residen en que en una sola etapa tienen lugar la extracción, preconcentración, limpieza de muestra y también separación de analitos. Se reduce el tiempo de análisis y se reducen también problemas de contaminación de la muestra así como también se mejora en resolución, precisión y reproducibilidad. La IT-SPME, como extracción en fase sólida que es, cuenta con las ventajas de la SPME, el consumo de disolventes es mínimo y también la generación de residuos. Se trata por tanto de una técnica sostenible de preparación de muestra.

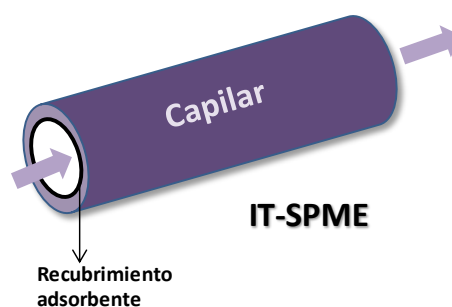


Figura 7. Esquema representativo del capilar IT-SPME.

Existen dos modalidades de IT-SPME; la modalidad *draw/eject* es decir de carga/expulsión y el IT-SPME en válvula.

- *IT-SPME carga/expulsión*: la muestra es procesada utilizando un inyector automático y el capilar se incluye en el propio inyector [47]. Se programan repetitivos ciclos de carga/expulsión (**Figura 8A**). Una vez la etapa de extracción esta completa, los analitos son desorbidos con un disolvente adecuado y son transferidos a la columna para su separación.
- *IT-SPME en válvula*: En esta modalidad la muestra se suele procesar manualmente si el acoplamiento es en la válvula de inyección, o automáticamente a través de un sistema de conmutación [47], utilizando un capilar de extracción que actúa como loop de inyección (**Figura 8B**). Los analitos son extraídos en el proceso mismo de carga. Al girar la válvula desde la posición de carga inicial a la posición de inyección los analitos son transferidos por la fase móvil hasta la columna de LC para su separación si el proceso es dinámico. La desorción puede llevarse a cabo de forma estática con un disolvente adecuado [48].

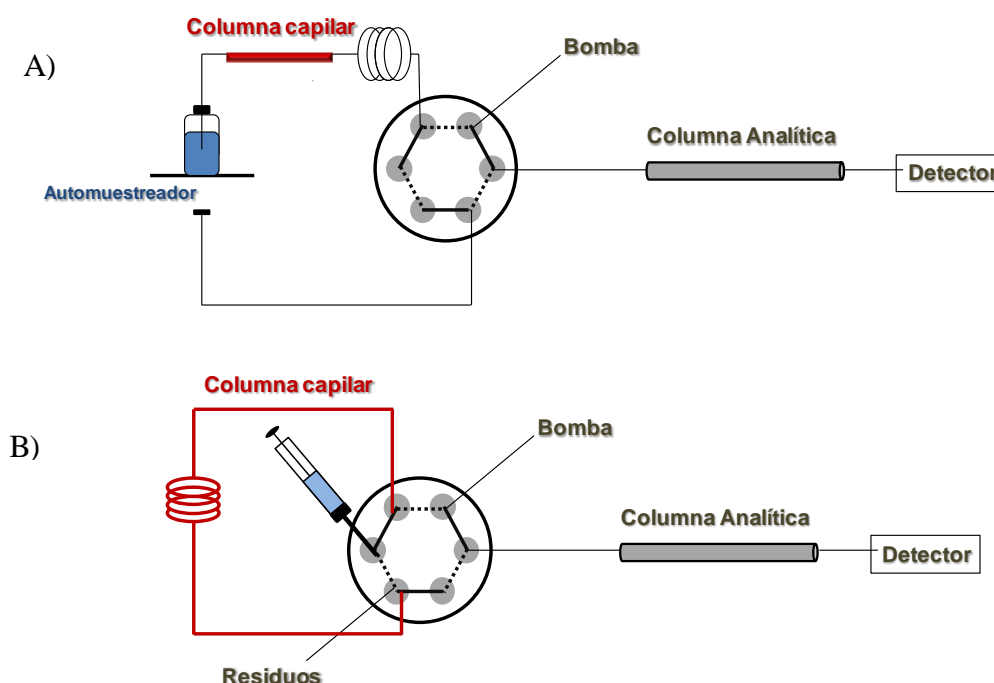


Figura 8. Esquema del sistema IT-SPME-LC para A) carga/expulsión y B) en válvula.

El acoplamiento IT-SMPE a LC permite automatizar todo el proceso analítico con lo que se cumple así con otro de los principios de la Química Analítica Verde.

El primer acoplamiento SPME-LC fue diseñado en 1995 por Chen y Pawliszyn utilizando fibra de PDMS (Ver **Tabla 4.** [49]), dos años después Pawliszyn y su colaborador Eisert plantearon el primer sistema IT-SPME (**Tabla 4.** [50]). En 2004, Bagheri y Salemi utilizaron IT-SPME fuera de línea con 100% PDMS para analizar PAHs en el agua (Ver **Tabla 4.**). Detectaron los analitos en concentraciones de 0.001-0.006 $\mu\text{g/L}$ (**Tabla 4.** [51]). Por otro lado, Globig y Weickhardt utilizaron un dispositivo completamente automatizado y cuantificaron PAHs en agua de río [52]. Una recuperación de analito de 50 veces mayor que la observada con una fibra de SPME fue obtenida por Wang y colaboradores, utilizaron una columna capilar de 5 m, y diámetro interno de 0.53 mm con un espesor 1.2 μm de película de PDMS para analizar PAHs y plaguicidas clorados. A pesar de que el volumen de PDMS en la configuración en tubo fue sólo 10 veces superior se obtuvo una recuperación 50 veces mayor (**Tabla 4.** [52]). La metodología IT-SPME acoplada a LC convencional y miniaturizada ha sido estudiada por este grupo de investigación Miniaturización y Métodos Totales de Análisis (MINTOTA) desde 2006, algunos trabajos se reseñan en la **Tabla 4** [53-59] y en la **Sección 5.1 y 5.2.**

Capítulo 2. Introducción

Uno de los primeros trabajos [53] compara diferentes métodos de extracción y preconcentración de la muestra: SPME en fibra, fase C₁₈ y IT-SPME para la detección de triazinas en agua. Los resultados obtenidos mostraron una muy buena sensibilidad para IT-SPME (LODs de 25-150 µg/L para SPME en fibra, y LODs de 0.1-0.5 µg/L para IT-SPME). MINTOTA ha propuesto la formación de derivados en línea [54-56] y propuesto nuevas fases que incrementan la eficiencia de extracción de los analitos marcadamente. También ha propuesto una nueva técnica la microextracción en fase sólida magnética [58] que permite la extracción exhaustiva de los analitos ensayados.

La búsqueda de nuevos materiales extractivos en IT-SPME es un área actualmente en desarrollo que pretende incrementar las eficiencias de extracción, selectividad o resistencia en los capilares empleados para IT-SPME. Estos materiales además de ser buenos adsorbentes, deben ser estables y reutilizables, para su uso en línea. Muchos de los nanomateriales cumplen estas características. Es por ello, que en los últimos años se han introducido nuevas fases o se han modificado las columnas capilares comerciales incorporando NPs. Ejemplos se pueden ver en la **Tabla 4**, como las NPs Fe₂O₃ (Ver **Tabla 4**. [57]), SiO₂ (**Tabla 4**. [58]), y también CNTs (**Tabla 4**. [59], [60]) (Ver **Sección 5.3 y Tabla 6**).

Otras de las múltiples aplicaciones del PDMS se derivan de sus propiedades impermeables y es, su uso en el desarrollo de muestreadores pasivos de compuestos orgánicos tanto en agua y aire. Alguno de estos dispositivos de muestreo son muestreador de membrana Waterloo (MWS) [61], el GUT [62] y extracción en membrana de silicona (SMSE) en el que se utilizó PDMS con acetato de etilo para mejorar su polaridad y se aplicó a la cuantificación de atrazinas y tres metabolitos [63].

El PDMS es uno de los polímeros más utilizados para la fabricación de dispositivos *lab-on-chip* y sistemas microelectrónicas, es ópticamente transparente (por debajo de 300 nm), isotrópico y homogéneo, inerte y muy fácil de procesar. Además es un material biocompatible, estable y muy económico. Sin embargo, su hidrofobicidad es un problema para la utilización de microchips con microcanales en los que deben circular disoluciones acuosas [45].

En esta Tesis a partir de las propiedades anteriormente comentadas, se pretende evaluar el PDMS como encapsulante de colorantes y otros reactivos para el desarrollo de sensores, portátiles y resistentes (**Sección 6**).

Tabla 3. PDMS

	Características	Observaciones	Aplicaciones	Ref
Peso molecular	10.000-60.000 g mol ⁻¹	-	-	-
Formula química	Unidades Si(CH ₃) ₂ O	-	-	34
Síntesis	Reacción de hidrosililación catalítica: Hidruro de silicio + grupo vinilo + Pt catalizador	No requieren de disolventes y no producen subproductos de forma que no se pueden crear defectos en la estructura provocando fracturas dieléctricas	Dispositivos eléctricos	35
Ópticas	Transparente	Transparente por debajo de los 300 nm	Lentes intraoculares, films, soportes para ensayos colorimétricos	36
Toxicidad	No tóxico	Biocompatible Y no biodegradable	Implantes, sondas, lubricación de dispositivos médicos, marcapasos etc.	37
Reactividad	Inerte	No reacciona con muchos químicos	Litografía	38
Solubilidad	<i>Swell</i> (hinchamiento)	Disolventes poco solubles: $\delta \geq 9.9 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$ Disolventes muy soluble: $\delta = 9.9-7.3 \text{ cal}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$	Microfluidos, SPME	39
Mecánicas	Permeabilidad	Permeable a gases y disolventes orgánicos poco polares e impermeable a agua	Membranas de PDMS en muestreadores pasivos de compuestos volátiles	40
Térmicas	Aislante	Estable entre -50 a 200°C	Columnas de cromatografía de gases	41
Costes	Dow Corning Sylgard 184	118.7€/kg. Costes bajos	-	41
Fabricación	Kit	Mezclar elastomer base: curing (10:1) y dejar a T° ambiente 2 días	Microfluidos, microchips, soportes etc.	41

Tabla 4. IT-SPME acoplado a LC

Año	Inventión	Columna CG como SPME	Estudio	Aplicación	Ref
1995	Sistema SPME acoplado HPLC	Fibra de PDMS	Estudio Sistema SPME-HPLC	Analysis of PAHs	49
1997	Sistema SPME-HPLC on-line	- Omegax 250: Polietilen glycol - SPB 5: 95%PDMS, 5% difenilo - SPB 1: 95%PDMS, 5% difenilo	Estudio teórico del IT-SPME	Análisis de pesticidas de fenilurea	50
2004	Estudio de la factibilidad IT-SPME-HPLC	-CP-Sil 5: 100% PDMS	LODs 0.001 µg/L para PAHs	Detección de trazas de PAHs	51
2005	IT-SPME-HPLC automatizado	-Capilar Macherey-Nagel, PDMS (100%)	Automatización del sistema	Cuantificación de PAHs y pesticidas clorados en agua de río	52
2006	Estudio comparativo entre SPME en fibra y IT-SPME acoplado a LC-UV	- SPME en fibra revubierta de PDMS y divinilbenceno - IT-SPME columna capilar de gases (100% PDMS)	Comparar ventajas y desventajas del SPME en fibra y el IT-SPME	Análisis de triazinas en aguas portables, residual.	53
2008	Sistema IT-SPME-HPLC con FMOC derivatización automatizada en el SPME	TRBS: 95% PDMS, 5% difenilpolisiloxano	Optimización extracción, derivatización con FMOC y desorción en una sola etapa	Cuantificación de residuos de aminas primarias en polímeros catiónicos	54

2009	Sistema IT-SPME-HPLC con OPA/NAC derivatización automatizada en el SPME	TRB5: 95% PDMS, 5% difenilpolisiloxano	Optimización extracción, derivatización con FMOC y desorción en una sola etapa	Cuantificación de residuos de aminas secundarias en polímeros catiónicos	55
2010	Sistema IT-SPME-HPLC-UV-DAD	TRB5: 95%PDMS, 5% difenilpolisiloxano	Estudio de la sensibilidad para diferentes compuestos mediante IT-SPME	Análisis multiresiduo contaminantes orgánicos	56
2014	Sistema IT-SPME-magnético con NPS de Fe ₂ O ₃ -CTAB - HPLC-UV-DAD	Columna capilar de sílice	Desarrollo de un nuevo sistema de extracción con IT-SPME conectado a un campo magnético	Análisis ácido acetilsalicílico, acetaminofeno, atenolol, diclofenaco e ibuprofeno	57
2014	Manégtico-IT-SPME con NPS (SiO ₂ -Fe ₂ O ₃)-HPLC-UV-DAD	TRB5: 95%PDMS, 5% difenilpolisiloxano con NPS superparamagnéticas SiO ₂ -Fe ₂ O ₃	Optimización sistema Manégtico-IT-SPME	Análisis de triazinas	58
2015	IT-SPME con CNTs-HPLC-UV-DAD	TRB5: 95% PDMS, 5% difenilpolisiloxano con SWCNTs y MWCNTs	Comparar resultados en TRB5 y TRB5 modificado SWCNTs y MWCNTs	Extracción de triazinas polares	59
2015	IT-SPME con CNTs-HPLC-UV-DAD	IT-SPME con CNTs-HPLC-UV-DAD, TRB5:95% PDMS, 5% difenilpolisiloxano y TRB35: 65% PDMS, 35% difenilpolisiloxano	Evaluación de los TRB5, TRB35 y las modificación de ambos capilares con SWCNTs y MWCNTs	Análisis de PAHs, triazinas, organofosforados y piretroides Esta tesis	60

La Zeína

La zeína es la mayor proteína del maíz [61] (**Figura 9**). En el pasado se obtenía principalmente como subproducto del procesado en las industrias de maíz, era un material barato y destinado a la alimentación animal, sin ninguna aplicación tecnológica. A principios del siglo XX, comenzó a ser estudiado su potencial industrial, como posible materia prima para la elaboración de plásticos. Actualmente, la zeína se obtiene en grandes cantidades como subproducto en el procesado de bioetanol, es la burlanda seca de maíz (o DDGS, grano seco de destilería) [62], lo que supone un valor añadido a la producción de bioetanol [63]. El desarrollo de mejores procesos de extracción y procesado de la zeína, y sus características como que es biodegradable y puede formar diferentes estructuras como gels, films, micro- y nanopartículas, lo ha convertido en un producto de alto valor para la industria. En los últimos 20 años se han desarrollado alrededor de 1600 publicaciones sobre este material, más del 40% de las publicaciones se han producido en los últimos 5 años (Base de datos: Web of science). Aun que no son muchas las publicaciones en comparación con las presentadas para otros materiales, la concienciación social acerca de la utilización de energías renovables frente a las no renovables como el petróleo, el peligro que los plásticos pueden suponer para el medio ambiente y la salud, y la creciente búsqueda de nuevos materiales degradables, hacen preveer que el número de publicaciones aumente considerablemente en los próximos años. En esta dirección apuntan algunos de los trabajos y diferentes aplicaciones ya existentes; desde dispositivos de microfluidos [64], films para embalajes de comida [65], micro y nano dispensadores de medicamentos [66] a ingeniería de tejidos entre las más destacadas [67].



Figura 9. Fotografía de la zeína en polvo

La zeína es una clase de prolamina con un peso molecular de 40 kDa (Ver **Tabla 5** [68]). Un poco más del 50% de los aminoácidos de la zeína son hidrofóbicos entre ellos leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%), pero también tiene un contenido importante de glutamina (21-26%) que es un aminoácido hidrofílico [62]. Es una proteína heterogénea que puede dividirse en α -zeína, β -zeína y δ -zeína. La α -zeína es la fracción mayoritaria (40-50%) con una estructura enrollada formando una barra que consta de 10-

11 segmentos α -helicoidales plegados unos sobre otros en forma antiparalelos y unidos entre sí por enlaces de hidrógeno y vueltas ricas en glutamina [69,70]. Presenta solubilidad en etanol, acetona, acetyl acetona y en agua en presencia de etanol, altas concentraciones de orina, pH alcalino ($\text{pH} \geq 11$) o surfactantes aniónicos. Sin embargo, la zeína es 50 veces más hidrofóbica que otras proteínas grandes como la albumina, el fibrinógeno, entre otros [71]. Su hidrofobicidad/hidrofilicidad en su estructura hace que la zeína sea un biopolímero único en solubilidad y de aquí muchas de sus múltiples aplicaciones como dispositivos para encapsulación [72] y posterior liberación de productos/farmacos en condiciones fisiológicas.

Como se ha comentado anteriormente, una característica muy importante de la zeína es que es biodegradable. Iman y Gordon [73] evaluaron su degradación para el procesamiento industrial del maíz a diferentes condiciones ambientales de temperatura, pH y humedad. Las condiciones ideales de degradación fueron 40°C , pH neutro y 50-60% de humedad, observándose mayor degradación con la humedad. Como proteína que es, su degradación también puede llevarse a cabo mediante el empleo de enzimas como pesina, termolisina y la tripsina [69].

Una de las aplicaciones más utilizada de la zeína es como soporte donde inmovilizar diferentes (macro)moléculas y utilizarlo para la liberación de fármacos o otros compuestos (*drug delivery system*). Se pueden desarrollar tanto films, fibras, gels, micro y nano-partículas de zein donde encapsular o atrapar las moléculas. Los films presentan como ventaja frente al resto de sistemas propuestos, que poseen una gran área superficial y son más fáciles de sintetizar y reproducir que por ejemplo, las micro- o nanopartículas.

Debido a su peso molecular, al grado de polimerización y la estructura química la zeína tiene unas propiedades excelentes para formar films. En el proceso de formación de films, primero, se forman estructuras enrolladas tipo barras donde los grupos hidrofílicos, las glutaminas, se sitúan en la parte exterior y los grupos hidrofóbicos en los segmentos helicoidales. Estas barras se alinean unas con otras y se autoorganizan formando láminas. Todo ello a través de interacciones como enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, y puentes de disulfuro entre cadenas proteicas [69].

Experimentalmente, el zeína es fácilmente transformable en films por interacciones con otros materiales o mediante procedimientos térmicos/químicos de entrecruzamiento (*cross linking*). [74,75]. Durante su procesamiento es moldeado a compresión y extrusión para desarrollar los films, siendo esta tecnología aplicable también en producciones industriales (a gran escala). Los films obtenidos son resistentes, duros, pero quebradizos. La plasticidad del material suele modificarse con componentes

Capítulo 2. Introducción

como el glicerol, sorbitol, el ácido oleico, digutil tartrato y la sucrosa que le aportan mayor flexibilidad [76].

Estudios realizados por Subramanian [77] con el fin de entender propiedades como la adsorción, humectabilidad, barrera frente al vapor y otros gases en los films de zeína, revelaron que la absorción y la disposición de la proteína en el film es diferente en presencia o en ausencia de humedad. Las moléculas de zeína adoptan una disposición perpendicular u horizontal en contacto con superficies hidrofílicas o hidrofóbicas respectivamente. Estos estudios indican la posibilidad de utilizar la zeína como revestimiento protector e impermeable para alimentos en las condiciones en las que las superficies hidrofílicas o hidrofóbicas, son necesarias para conservar los alimentos o productos de índole similar [69].

La producción de films que sean biodegradables y de bajo coste como es la zeína suponen una alternativa ecológica, no se generan residuos que requieren de tratamiento ni se utilizan materiales que provienen de fuentes no renovables como el petróleo.

Tabla 5. Zeína

Características	Observaciones	Estudios y aplicaciones	Ref
Aspecto	Polvo amarillo Fotografía Fig. 9 También hay zeína comercial de color blanco	-	62
Peso molecular	40 kDa	22-24 kDa es α -zeína, 17kDa es β -zeína, 18-27 kDa es γ -zeína	72
Composición	20% leucina, 10% prolina, 10% analina 10% glutamina	50% de los aminoácidos son hidrofóbicos	78
Solubilidad	Hidrofóbico	Muy soluble en alcoholes (EtOH), soluble en mezclas agua-alcohol, acetona, acetilacetona grandes concentraciones de urea, surfactantes y pH~11 alcalino	80
Toxicidad	No tóxico	Proteína del maíz (prolamina)	79
Reactividad	Inerte	Biocompatible, Biodegradable	80
Mecánicas	Permeabilidad Flexibilidad Resistencia	Permeable agua y disolventes orgánicos y a los gases. Poco flexible La fragilidad se mejora con la adición de plastificantes.	81 69 82
Fabricación	Sencilla	Se pueden obtener films, fibras, geles, mezclan y dejar a T° ambiente 6 h	69
Comercial	Sigma Aldrich	271€/kg Puede suponer un valor añadido en la producción bioetanol	83

Capítulo 2. Introducción

Materiales cerámicos

Los materiales cerámicos son anteriores a los metales, aparecen en la historia de la humanidad con las primeras civilizaciones. Aun así, su verdadero desarrollo no surge hasta a principios de los setenta, con la crisis de petróleo, donde se mejoró su procesamiento, y se consiguieron materiales menos frágiles (una de sus grandes limitaciones) [1].

Los materiales cerámicos son materiales inorgánicos, no metálicos que presentan como características identificativas que son buenos aislantes y tienen una temperatura de fusión y una estabilidad química elevada. Pueden clasificarse según su estructura como cerámicas iónicas (halita NaCl, alumina Al_2O_3 , zirconia ZrO_2 y magnesia MgO) y covalentes (sílice SiO_2 , diamante C, silicio Si, grafito C y carburo de silicio SiC).

Los nanotubos de carbono

Los nanotubos de carbono (CNTs) son una forma alotrópica de carbono como lo son el grafito y el diamante. Es importante comentar que existe cierta controversia a la hora de clasificar los CNTs. Por una parte, son nanomateriales y por tanto, si se clasifican atendiendo a sus propiedades, los CNTs presentan propiedades únicas consecuencia principalmente de su tamaño, estas propiedades son diferentes de los materiales a escala macroscópica., no se podrían clasificar en ningún grupo de los materiales clásicos. Por otra parte, los compuestos de carbono no encajan en ninguno de los esquemas de clasificación tradicionales de materiales cerámicos, polímeros y metálicos. Sin embargo, se ha decidido clasificar a los CNTs dentro del grupo de los materiales cerámicos ya que tanto el grafito y como el diamante normalmente se clasifican como materiales cerámico (por ejemplo, atendiendo a la estructura del diamante es muy similar a la de la blenda de cinc que es un material cerámico).

Fueron descubiertos en 1991 por Sumio Iijima [84], se trata de una lámina de enlaces de carbono (hidridación sp^2) [85] dispuestos en un patrón hexagonal regular (de un átomo de espesor) enrollada sobre sí misma para formar un cilindro hueco. Cuando se trata de una sola lamina enrollada, se denominan nanotubos de carbono monocapa (*Single-Walled Nanotubes c-SWNT*) y cuando se enrollan diferentes capas en disposición de una serie de tubos concéntricos, se denominan nanotubos de carbono multicapa (*Multi-Walled Nanotubes c-MWNT*). Entre 2000 y 2014 las publicaciones sobre CNTs han aumentado, siendo en entre 2010 y 2015 más de 193.800 artículos científicos publicados (**Figura 10**).

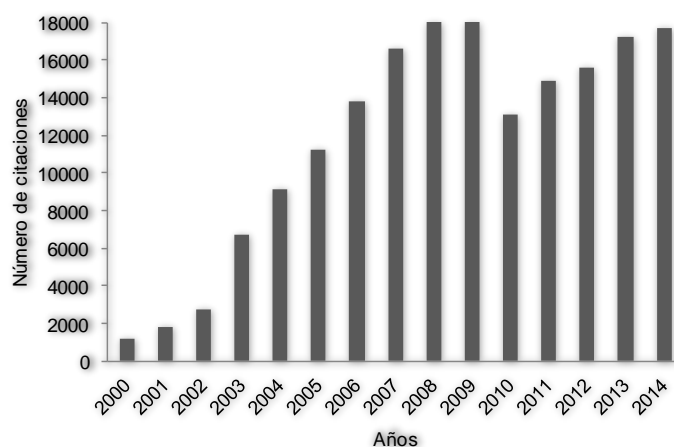


Figura 10. Número de citaciones sobre CNTs des del año 2000. Fuente Web of Science (Mayo 2015)

Sus propiedades electrónicas, mecánicas, térmicas y ópticas han sido ampliamente utilizadas en la detección de compuestos químicos y biológicos, y también como soportes catalíticos [86]. Es de destacar, su tamaño pequeño, alta conductividad eléctrica, y alta relación superficie-volumen que permiten diseñar dispositivos de respuesta rápida y alta sensibilidad. [85, 87-89] Uno de los principales problemas de los nanotubos es que no son solubles en medios acuosos, sin embargo la utilización de surfactantes y polímeros hace posible su utilización en estos medios preservando su estructura original y sus propiedades eléctricas. Por otra parte, esto resulta una ventaja a la hora de su inmovilización y diseño, por ejemplo, de dispositivos de extracción o pre-concentración se verá a continuación.

Aplicaciones analíticas

Los CNTs son utilizados como sensores/biosensores electroquímicos debido a que poseen una gran área superficial y facilidad para acumular biomoléculas, y además son excelentes conductores. Son muchos los sensores desarrollados con CNTs y sus aplicaciones son amplias tanto para la industria alimentaria, el control ambiental, el diagnóstico y la seguridad. En esta Tesis los CNTs no se han utilizado como sensores con lo que este apartado se limita a este breve comentario. Para más información pueden consultarse las siguientes reseñas bibliográficas [86,90-93].

Los CNTs son idóneos como adsorbentes en SPME debido a que presentan una gran área superficial activa para la adsorción/desorción de compuestos orgánicos e inorgánicos. Pueden interactuar fuertemente con las moléculas orgánicas vía fuerzas no

Capítulo 2. Introducción

covalentes como enlaces de hidrogeno, π - π stacking, fuerzas electrostáticas y mediante interacciones hidrofóbicas. La introducción de algunos grupos carboxílicos mejora la eficiencia de retención de compuestos cargados o polares, a través de interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals o enlaces de hidrógeno, a la vez que mantiene las capacidades de adsorción de compuestos apolares. Además, es posible modificar su superficie químicamente, cambiando su polaridad o funcionalizandola con sustituyentes específicos con el fin de modificar la afinidad por ciertos analitos frente a otros y CNTs en SPME en cuanto a una mejora muy significativa de la sensibilidad y selectividad en el proceso de extracción y pre-concentración [86]. En la **Tabla 6** se muestran fases de SPME modificadas con CNTs para la detección de diferentes contaminantes como los PAHs (**Tabla 6**. [94-96]), organofosfatos (**Tabla 6**. [97, 98]), piretroides (**Tabla 6**. [99]) y triazinas (**Tabla 6**. [100, 101]).

Tabla 6. CNT en SPME

Analito	Muestra	Cantidad de Muestra	Recubrimiento	Soporte	Técnica	Recuperación (%)	LOD	Ref
PAHs	azafran	-	o-MWCNTs(o.d 10-20 nm/PEG)	Capilar de sílice	GC-FID	85 - 101	0.001-0.05 µg/L	94
PAHs	Agua de río y lluvia	10 mL	o-MWCNTs(o.d 0.8 nm/TiO ₂)	Alambre de acero inoxidable	GC-FID	93 - 121	0.002-0.004 µg/L	95
PAHs	Agua de pozo y del grifo	5 mL	o-MWCNTs(o.d 20-40 nm)	Alambre de acero inoxidable	GC-FID	88 - 105	0.03-0.07 µg/L	96
Organofosforados	Plantas medicina les secas	0.5 g	o-MWCNTs(o.d 1-2 nm)	Alambre de acero inoxidable	GC-MS	75 - 87	0.3-0.5 ng/g	97
Organofosforados	Agua de río	8 mL	o-MWCNTs (-)	Alambre de oro	GC-MS GC-FID	97 - 104	0.2-0.3 µg/L	98
Piretroides	Agua del grifo, de estanque y de mar	5 mL	o-MWCNTs(o.d 2 nm /PPy)	Alambre de acero inoxidable	GC-ECD	83 - 112	0.12-0.43 µg/L	99
Triazine	Agua de lago y zumo de naranja	1 mL	o-MWCNTs (o.d. 2nm/ polimetilacrilato/ etilendimetilacrilato)	Capilar de sílice	IT-SPME- LC-MS	86 - 106	0.06-0.46 µg/L	100
Triazinas	Agua en botella, agua de río y de grifo	10 mL	SWNHs (o.d 4-5 nm)	Capilar de sílice	GC-MS	87 - 94	0.015-0.1 µg/L	101
PAHs, Organofosforados Piretroides Triazinas	Aguas	2-4 mL	o-MWCNTs y o-SWCNTs (0.32 mm i. d. y 3.0 µm/ PDMS y polifenilsiloxano	Capilar de sílice (PDMS)	LC-DAD	-	0.07- 0.5 µg/L En esta Tesis	60

2.2.3 ANALITOS Y TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN

2.3.1 Ftalatos

Los ftalatos son uno de los plastificantes más ampliamente utilizados en la industria del plástico. Son introducidos durante el proceso de polimerización con el fin de conseguir plásticos más flexibles y maleables. La concentración de ftalatos en los plásticos puede suponer hasta el 50% en peso del polímero. Estos compuestos quedan embebidos dentro de la matriz polimérica pero no son polimerizados, es decir no quedan unidos covalentemente al polímero, con lo que pueden desprenderse fácilmente con el tiempo, y su uso, liberándose finalmente al medioambiente. La sociedad moderna actual hace un uso masivo de los plásticos que han desbancando a sectores tradicionalmente gobernados por el metal y el vidrio, esta es una de las principales causas de las altas concentraciones de ftalatos encontradas en el medioambiente y la consecuente exposición de la población a los mismos.

Una serie de estudios realizados tanto en animales como en humanos han demostrado que la exposición a ftalatos puede afectar directamente al sistema reproductivo, endocrino y respiratorio [102, 103]. Las principales rutas de exposición son; por inhalación, a través de la ingestión en bebidas y comidas contaminadas como consecuencia de la migración de los ftalatos de los embalajes y envases de plástico o por contacto dérmico mediante la utilización de productos cosméticos o dispositivos de diálisis.

Entre los diferentes ftalatos (**Figura 11**); el di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP) es uno de los más producidos y utilizados. Su concentración en aguas superficiales no debe sobrepasar los 1.3 µg/L según la directiva 2008/105/CE [104].

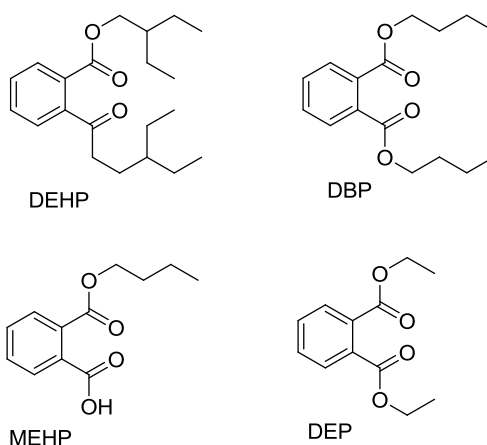


Figura 11. Estructura química de los ftalatos analizados.

Algunos estudios apuntan que DEHP puede ser degradado completamente por microorganismos. Entre sus productos intermedios de degradación se encuentran el mono-2-etilhexil ftalato (MEHP), dietil ftalato (DEP) y dibutil ftalato (DBP) (Ver **Figura 11**).

El análisis directo de ftalatos no es posible debido que se encuentran en muy bajas concentraciones ($\mu\text{g/L}$) en aguas ambientales, de lavado y orina, entre otras matrices. Para solucionar este problema se utilizan etapas de preconcentración y separación antes de su identificación. Existen diferentes técnicas de preconcentración extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase líquida (LPME) o sólida (SPME), sin embargo la SPME se ha convertido en la técnica más utilizada donde la extracción y la preconcentración es posible en una sola etapa.

Aunque la mayoría de los métodos propuestos para la estimación de ftalatos emplean la CG, la contaminación durante el proceso de preparación de la muestra necesaria en GC provoca en muchos casos falsos positivos y resultados sobreestimados. En 2010, MINTOTA desarrolló un sistema automático de IT-SPME acoplado a HPLC y detector de fila de diodos (DAD) para determinar selectivamente los dos ftalatos más utilizados industrialmente (DBP y DEHP) [56]. La etapa de preparación de muestra, preconcentración y extracción se redujo a una única etapa (ver **Sección 5.1 y 5.2**). Así se evitaron problemas de contaminación de las muestras consecuencia de la presencia ubicua de ftalatos. En la **Tabla 7** se muestra la evolución del SPME para la detección de ftalatos y otros contaminantes en agua a niveles de trazas. En esta Tesis se propone un método para la evaluación de DEHP en aguas [105] (**Sección 5.1**).

La determinación de dialquil-ftalatos en orina se realiza a partir de los metabolitos mono-alkil en la actualidad y el tratamiento de la muestra requiere de diferentes etapas: a) extracción de los ftalatos utilizando un disolvente orgánico, b) etapa de limpieza adicional para separar las grasas de otros materiales lipofílicos endógenos c) hidrólisis enzimática con β -glucuronidasa y/o hidrólisis ácida, d) preconcentración mayormente por extracción en fase sólida (SPE). Este método es laborioso y requiere de un consumo de disolventes orgánicos considerable (Ver **Tabla 7**). La **Tabla 7** indica también los métodos propuestos para alkil-ftalatos para su análisis en otros fluidos biológicos. La Tesis propone el primer método para la estimación de dialquil ftalatos en orina [106].

Tabla 7. Metodologías analíticas para la estimación de los ftalatos en muestras biológicas.

Ftalatos analizados	Muestra biológica	Pre-tratamiento de la muestra	Extracción y lavado de la muestra	Técnica	LOD	Ref
Monoalquil ftalatos	Orina	1. Adición de patrón interno 2. Desconjugación enzimática (37°C, 90 min) 3. Acidificación	1. SPE 2. Evaporación de extracto (N ₂)	UPLC-MS/MS	0.2-5 µg/L	107
Monoalquil ftalatos	Orina	1. Desconjugación enzimática (37°C, 90 min) 2. Acidificación 3. Adición de patrón interno	1. SPE 2. Filtrado con jeringa (0.2µM)	HPLC-MS/MS	0.15-3 µg/L	108
Monoalquil Ftalatos y oxo-monoalquil ftalato	Orina, Suero, Plasma seminal	1. Desconjugación enzimática (37°C, 2 h) 2. Centrifugación	1. SPE 2. Secado y concentrado de la muestra	HPLC-MS/MS	0.1- 1.4 µg/L	109
Monoalquil Ftalatos y oxo-monoalquil ftalato	Orina,	1.Desconjugación enzimática (37°C, 90 min) 2. Acidificación 3. Centrifugación	1. SPE	HPLC-MS	0.2 µg/L	110
Dialquil ftalatos	Sangre Sudor	1. Precipitación de las proteínas	1. Extracción líquido-líquido (hexano: diclorometano) (8:1) 2. Dilución 1:4 con hexano	GC/MS	0.2 µg/L	111
Dialquil ftalatos	Leche materna Sangre Suero	1. Acidificación 2. Dilución con agua	1. Extracción líquido- líquido 2. Purificación con una columna de aminopropileno	GC/MS	0.1-3 µg/L	112
Dialquil ftalatos	Sangre	1. Centrifugación de la sangre para obtener el plasma 2. Dilución	1. Extracción líquido- líquido (MTBE:dioctil ftalato en hexano)(1:1) 2. Mezcla con hexano y vortex	GC/MS	0.2-0.4 µg/L	113
Dialquil Ftalatos y monoalquil ftalatos	Orina	1. Dilución con agua 2. Ajuste de pH	IT-SPME	CapLC/DAD	0.5-1.5 µg/L	106 Esta tesis

2.3.2 Triazinas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, organofosfatos y piretroides

Las triazinas; como la atrazina y la propazina son herbicidas que inhiben o interrumpen el crecimiento normal de las plantas. Mientras que los pesticidas organofosforados, clorpirifos y crofenvinifos, tienen acción insecticida actuando como inhibidores de la acetilcolinesterasa. Ambos son utilizados de forma extensiva en tanto en la agricultura, industria y en las ciudades causando principalmente la contaminación de aguas subterráneas, ríos y lagos. Son compuestos muy persistentes que pueden estar activos durante años. La exposición prolongada a las triazinas puede ocasionar alteraciones hormonales en animales y también en humanos, mientras que los organofosfatos provocan alteraciones en el sistema nervioso. Estos compuestos (**Figura 12**) suelen analizarse por técnicas de GC como CG-FID o CG-MS (Ver **Tabla 6**). También se han analizado por CL, utilizando, en muchos de los casos, IT-SPME para la extracción y preconcentración de los analitos (Ver **Tabla 8**) obteniéndose LODs < µg/L. Se ha demostrado en esta Tesis que las fases modificadas con CNTs mejoran los parámetros analíticos a los contaminantes ensayados [60] (Ver **Sección 5.3**).

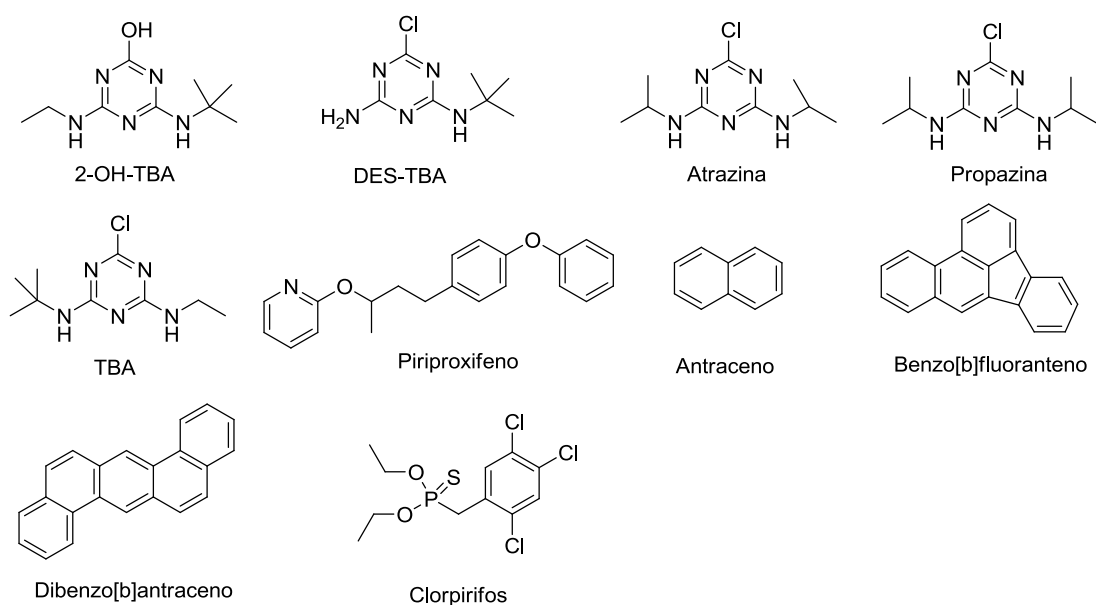


Figura 12. Estructura química de los contaminantes analizados en aguas.

Tabla 8. Estimación de triazinas, organofosforados, PAHs y piretroides por LC						
Familia de compuestos	Muestras	Pre-tratamiento de la muestra y extracción de los analitos	Columna analítica	Técnica	LOD	Ref.
Triazinas	Aguas de río, de estanque, de riego, del suelo, aguas residuales industriales y aguas potables	1. Filtración (d=0.45µm) 2. IT-SPME: TRB5 (300x0.25 mm i.d., 0.25 µm)	Columna capilar empaquetada (Zorbax SB C ₁₈ , 35x 0.5 mm i.d., 5 µm)	CapLC-UV	0.025-0.25 µg/L	53
Organofosforados	Aguas residuales	1. Filtración (d=0.45µm) 2. SPME con NPs deFe ₃ O ₄ y extracción de los analitos 3. IT-SPME: TRB5 (35 cm x 0.32 mm i.d., 3 µm)	Columna monolítica (Onyx (150 mm x 0.2 mm i.d.)	CapLC-DAD	MSPPE: Clorpirifos 0.05µg/L y clorfenvinifo s: 0.1 µg/L	57, 114
PAHs	Aguas residuales	IT-SPME y IT-SPME magnético: columna capilar de 60 cm, 0.075 mm i.d, 10 µm) con NPs de Fe ₂ O ₃ soportadas en sílice	Columna capilar empaquetada Zorbax SB C ₁₈ (35 mm x 0.5 mm i.d, 5 µm).	CapLC-DAD	Clorpirifos/d lorofenifos 0.01 y 0.05 µg/L	57, 115, 116
	Mejillones	1. MSPD (0.1 g de muestra liofilizada) 2. IT-SPME TRB-35 (70 cm, 0.32 mm i.d, 3 µm)	Columna monolítica Onyx C ₁₈ (100 mm x 3 mm i.d, mesoporos 13 nm, macroporos 2µm)	CapLC-Detector Fluorescencia	LODs ≤ 0.6 µg/Kg	117
	Sedimentos	1. MSPD (0.1g de muestra) 2.IT-SPME: TRB-35 (70 cm, 0.32 mm i.d, 3 µm)	LiChrospher PAHs (250 mm x 4.6 mm i.d, 5 µm).	CapLC-Detector Fluorescencia		118
Piretroides y carbamatos	Agua de río y lago	1. Filtración (filtros PTFE) y adición 5% v/v acetónitrilo 2. SPE en línea	Columna de C-18 Ascentis Express (10 cm 4.6 mm I.D., 5mm partícula).	CapLC-UV	5.5-8.9 µg/L	119
organofosforados, triazinas y piretroides, PAHs	Aguas	1. IT-SPME modificado con CNTs	Columna de C-18 Zorbax SB	CapLC-UV	0.07-0.5 µg/L	60 En esta tesis

2.3.3 Aminas volátiles

En los últimos años, los compuestos nitrogenados como el amoníaco y las aminas alifáticas (**Figura 13**) se han convertido en importantes contaminantes debido a sus características tóxicas y olorosas. Las aminas alifáticas encontradas en aire en concentraciones considerables, son el resultado de su uso extensivo a través de la industria química, en la que tales compuestos encuentran aplicación en la fabricación de materias primas o productos intermedios para la preparación de fertilizantes, pesticidas, surfactantes, fármacos, polímeros, colorantes, etc.

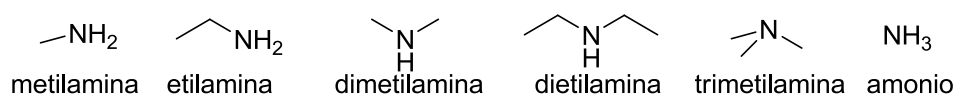


Figura 13. Estructura química de las aminas volátiles analizadas.

Las aminas, en general, son contaminantes a tener en consideración debido a que reaccionan muy fácilmente en presencia de ácido nitroso u otros compuestos nitrogenados produciendo nitrosaminas. Las nitrosaminas son responsables de producir cáncer en gran cantidad de especies animales. En el caso de los humanos, estudios actuales demuestran una correspondencia directa entre las nitrosaminas y el riesgo de padecer cáncer. De esta manera, las aminas alifáticas son conocidas como potentes precursores de sustancias cancerígenas y su determinación y control es crucial. Todo ello ha provocado una creciente conciencia social sobre los peligros para la salud que la presencia de aminas en aire supone, orientando muchos estudios de investigación a la búsqueda de métodos de detección fiables para su monitorización en el medioambiente, sobretodo en lugares susceptibles de tener aminas volátiles en cantidades desaconsejables tales como depuradoras, industrias agroquímicas y otras.

Las aminas presentan propiedades como la alta volatilidad y polaridad, son químicamente inestables y además presentan baja absorción o fluorescencia. Para dar respuesta al problema de su detección son varios los métodos que proponen transformar las aminas en derivados con características ópticas susceptibles de ser medidas. La derivatización permite detectar cantidades bajas de aminas a través de una reacción secundaria para formar el derivado detectable en condiciones de reacción suaves [120]. Muchos son los agentes de derivatización utilizados para detectar aminas alifáticas, como el ortoftalaldehído (OPA), dinitrofluorobenceno (DNFB), ninhidrina, fluoroescamina, halogencenzofurano y el 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) [121-123].

La etapa de derivatización ha sido y es ampliamente utilizada como método para incrementar los LODs en diferentes técnicas, como cromatografía de gas, cromatografía

Capítulo 2. Introducción

líquida y espectroscopia UV-vis. No obstante estas técnicas no permiten generalmente la detección in situ y en tiempo real.

Para el caso de la determinación de aminas in situ y en tiempo real, una posibilidad es utilizar muestreo activo, que requiere de un equipo específico y en algunos casos, un coste energético a tener en cuenta. Por ejemplo, los tubos colorimétricos comerciales [124] permiten su estimación semi-cuantitativa, pero basándose en el cambio de color de un colorante que responde al pH, por lo que su selectividad es limitada. Otro ejemplo de muestreo activo se basa en el empleo de SPE-C₁₈ y formación de derivados con NQS [125]. Estos sistemas alcanzan unos LOD de 3.2 o 1.1 mg/m³, considerando 15 o 60 min a un caudal de muestreo de 30 mL/min y permiten la discriminación entre aminas primarias y secundarias. Otros sensores activos de aminas en aire se han obtenido dopando polímeros como el PDMS, el PVA o el NOA65 con metaloporfirinas, pero responden a concentraciones elevadas del orden de 11000 ppmv [126], muy por encima de las concentraciones presentes en la atmósfera reales y de las establecidas en la legislación.

De forma alternativa, la técnica de muestreo pasivo, no necesita una fuente externa de energía, ni la ejecución de tareas específicas por parte del personal, con lo que el coste energético es nulo y mejora la simplicidad y aplicabilidad del sensor, sin embargo generalmente requiere de tiempos mayores de exposición. Para muchas aplicaciones concretas este tipo de sensores pasivos son recomendables, por lo que su disponibilidad resulta de interés.

A continuación se comentan algunos de los sensores para aminas volátiles diseñados en los últimos 5 años tanto para muestreo activo como para pasivo. Se observa como en general los LODs para los sensores activos son más bajos que para los sensores pasivos. Sin embargo, en la **Tabla 9** [127] y [128] se muestran sensores pasivos que presentan LODs similares a los observados para la detección mediante un muestreo activo. El sensor descrito en [128] presenta un diseño novedoso (Cristales líquidos dopados con aldehído áurico) pero su uso, solo permite la determinación de dibutilamina de forma semiquantitativa, por lo que el propuesto en esta Tesis [128] presenta mayor aplicación. Tres han sido los sensores que se han aplicado a la descomposición de muestras de pescado (ver referencias [128], [129] y [130]) solo el sensor propuesto en [128] lo ha hecho de forma pasiva, sin necesidad de consumo energético alguno (Ver **Sección 6.1**).

Tabla 9. Sensores colorimétricos para la detección de aminas en aire

Amina	LOD ppmv	Estimación ppmv	Colorante	Diseño del sensor	Muestreo	Respuesta del sensor	Ref.
Amonio	0.08 ^a	Discriminación entre aminas	36 colorantes comerciales	Los colorantes fueron inmovilizados en el ormosil mediante impresión en polietileno tereftalato nanoporoso	Activo: 2 min a 500 mL/min pos analizador multigas 2030	• Mapas distintivos mediante cámara digital (Adobe Photoshop)	129
Metilamina	0.01 ^a		36 colorantes comerciales				
Dimetilamina	0.01 ^a		Metaloportfirinas, pH indicators de pH, vatocromicos, solvatocromicos, indicadores redox				
Trimetilamina	0.03 ^a						
Butilamina	10	Semi-quantitativo	-	Cristales líquidos dopados con aldehído áurico	Pasivo : 30 min de exposición	• Apariencia oscura • Misma respuesta para aminas primarias y secundarias	127
Metilamina	10 ^b	Discriminación entre aminas	Sintetizado con el colorante 4001	Colorante encapsulado en dos tipos de NPs poliméricas con diferente polaridad soportadas sobre papel	Activo: 20 min a 2000 mL/min	• Imagen Digital (ImageJ) • Responde con alcoholes y a la humedad después de horas	130
Etilamina	10 ^b						
Propilamina	50						
Butilamina	50						
Pentilamina	10 ^b						
Hexilamina	10 ^b						
iHeptylamina	10 ^b						
Amonio	< 10	-	Metaloportfirina	Colorante embebido en plasma pulverizado por boquilla de atomización ultrasónica sobre lámina de tereftalato de polietileno	Activo: 50 min a 100 mL/min con control de flujo (MKS instrumento, Andover, MA)	• Respuesta a condiciones de mucha humedad • No discrimina entre aminas • Aplicación: conservación de pescado	131
Dimetilamina	10	-					
Trietilamina	10	10 - 10000					
Trimetilamina	10	-					

Trimetilamina	20000	Semi- cuantitativo	Líquido colistérico crystalino como film polimerico	Impresión inyección liquido colesterico cristalino	por del	Pasivo:100 min de exposición	<ul style="list-style-type: none"> Vapor de agua mejora la respuesta Aplicación para detector bacalado podrido 	132
Propilamina	90	90 - 320	Porfirina tripodal	<i>Spin-coating</i>		Activo: 0.5 L/min ⁻¹ por controlador de flujo Bronkhorst F-201FV	<ul style="list-style-type: none"> Estable 1 mes 	133
Anilina				disoluciones de				
Butilamina				cloroformo en				
Hexilamina				vidrio				
Metilamina	4·10 ⁵	4.5-90·10 ⁵	Ftalocianinas de	<i>Spin-casting</i>		Pasivo: 10 min de exposición		134
Dimetilamina	5.4·10 ⁵	6-13·10 ⁵	cobre	disoluciones sobre				
Trimetilamina	4.5·10 ⁵	5-100·10 ⁵		vidrio recubierto de oro y sobre silicona.				
Metilamina	1.2	3.9 - 39.7	Comercial 1,2- naftoquinona-4-	Colorante		Pasivo: LODs para 8h, y	<ul style="list-style-type: none"> Discriminación aminas 	128
Etilamina	0.8	2.7 - 26.6	sulfonato(NQS) y	embebido en PDMS mediante su		cuantificación para 1 h para aminas y 24h para amonio	<ul style="list-style-type: none"> Estable más de 9 meses No le afecta la humedad ,excepto al sensor ETH^T 4001PDMS/TEOS 	En esta Tesis
Dimetilamina	0.8	2.7 - 26.6	4-(N,N- diocilamino)-4'-	disolución previa en TEOS				
Dietilamina	0.5	1.6 - 16.4	(trifluoroacetil)azo					
Trimetilamina	71.23	71.2 - 712.3	benceno (ETH ^T 4001)				<ul style="list-style-type: none"> Aplicación en muestras de merluza en mal estado 	
Ammonio	14.10	14.10						

a : LODs fueon calculados por extrapolación de la respuesta observada de sus Limites de Exposición Permitidos los cuales para amino (50ppm), metilamina (10 ppm), dimetilamina (10ppm) trimetilamina (10 ppm). b: el sensor falla en la discriminación de aminas a 10 ppm.

2.3.4 Las drogas sintéticas: AMP, MAMP, MDA y MDMA.

Las drogas sintéticas ilegales se han convertido en una parte importante de la sociedad, sobre todo entre los jóvenes. Estas drogas son populares debido a su poder estimulante sobre el sistema nervioso central. El consumo, la producción y la comercialización de drogas ilegales sigue siendo hoy en día un gran problema para muchos países. En términos de producción y uso, las tres drogas sintéticas que dominan el mercado europeo: son las anfetaminas (AMP), la metanfetamina (MAMP) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) (**Figura 14**). El "éxtasis" tiene como principio activo MDMA pero también puede contener otras anfetaminas tales como 3,4-metilendioxianfetamina (MDA) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA). De acuerdo con las investigaciones oficiales, las cantidades incautadas de muestras de anfetaminas y éxtasis han aumentado en los últimos años, siendo 29.000, 7.000 y 11.200 incautaciones de AMP, MAMP y MDMA, respectivamente, en 2012 [135].

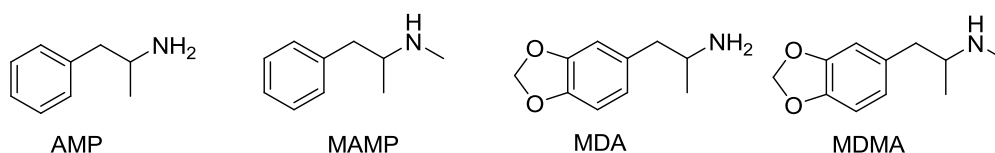


Figura 14. Estructura química de las anfetaminas analizadas.

Los métodos comúnmente utilizados para la detección de estos compuestos son métodos de electroforesis capilar [136], espectroscopia IR [137, 138], CG [139,140] o CL [141,142]. Sin embargo, estos métodos requieren estrictas condiciones de laboratorio y expertos analíticos capacitados.

Los métodos in situ permiten una detección en el momento con lo que son esenciales para el control policial. Los métodos utilizados para la detección rápida de drogas utilizan el espectrómetro de iones portátil (IMS) [143, 144]. Un método alternativo es el basado en la detección de gas de ionización de superficie [145] para evitar el inconveniente de la utilización de fuentes radiactivas para el proceso de ionización. Para fines de selección in situ también se utiliza un Infrarrojo de transformada de Fourier portátil (FTIR) [146] y pueden utilizarse espectrómetros Raman [147-150], ver **Tabla 10** [140]. Estos espectrómetros proporcionan una respuesta rápida en la detección in situ de principios activos, así como la caracterización de varios excipientes y mezclas, sin tratamiento de la muestra. Sin embargo, las drogas callejeras suelen modificarse con excipientes (es decir adulterantes o diluyentes), ya que suelen ser vendidas a peso. Se añaden adulterantes para imitar los efectos de la sustancia activa y, por tanto, aparentar mejor calidad. Por otro lado, los diluyentes se añaden simplemente para aumentar el volumen consiguiendo un mayor beneficio económico para el traficante de drogas.

Capítulo 2. Introducción

La Biblioteca espectral de compuestos disponible es limitada debido a la amplia gama de excipientes en las drogas ilegales. Este hecho dificulta en muchos casos la identificación de las drogas. Otra de las desventajas de esta técnica de análisis es que los espectrómetros portátiles son caros y requieren de personal entrenado para interpretar los resultados.

Como alternativa económica y rápida a los métodos mencionados para la detección in situ de drogas están las pruebas colorimétricas como Marqués, Simon (**Ver Tabla 10** [151], entre otras. Sin embargo, los principales inconvenientes de estas pruebas son, en general, el uso de reactivos peligrosos, la inestabilidad de los mismos en disolución y el tener que preparar las disoluciones cada vez. Para evitar estos inconvenientes, el encapsulamiento de reactivos en matrices poliméricas es óptimo, para mejorar la estabilidad de reactivos y disminuir la toxicidad del ensayo, además de poder trabajar sin necesidad de tener que preparar las disoluciones en el momento, ya que los reactivos necesarios quedan encapsulados en el polímero. Estos reactivos pueden ser liberados o pueden reaccionar en el interior del polímero en presencia del analito y producir un cambio de color visual como respuesta analítica. En la **Tabla 10** se muestran algunas de las características de estos sensores. Los sensores [152] y [153] son sensores colorimétrico que no requieren de preparación de disoluciones con lo que resultarían óptimos para el control policial de drogas, siendo el sensor propuesto en esta Tesis [153] más sensible y estable que el sensor [152].

Tabla 10. Métodos analíticos para la detección de compuestos anfetamínicos							
Drogas	LODs (mg/m L)	Estimación (μM)	Colorante	Diseño del sensor	Muestreo	Respuesta del sensor	Ref.
AMP	0.01	-	Disolución acuosa de AgNPs y sales	Dispositivo de tres canales con un láser y bomba de vacío	Espectroscopia Raman	<ul style="list-style-type: none"> Muestras de saliva Requiere un Láser 	150
AMP	0.82	2-10	Disolución AuNPs-citrato unidas a un segmento de ADN antiparalelo	El ensayo se preparó en disolución acuosa	Cambio de color de rosa a azul (20 min)	<ul style="list-style-type: none"> Recuperación ~ 96-107% RSD (n=9) ~5% Selectivo frente: diazepam, quetamina, morfina, barbitol, triazolam, petidina 	154
AMP	70	70-1670	Ensayo de Simón: Nitroprusiato sódico	Ensayo en disolución acuosa	La disolución cambia azul	<ul style="list-style-type: none"> 20 μL muestra RSD intra~3% y inter~4% Muestras Yaba de control de drogas Aplicación para móvil 	151
AMP	1340	4000-33500	4-4-(trifluoroacetilfenilaza)-1-naftilazo-N,N-dioctilammina	Inmovilizado con TEOS en proceso sol-gel	Cambio de color azul a rojo	<ul style="list-style-type: none"> Pequeño y fácil de llevar RSD intra ~1% y inter~3% Estable 3 meses Respuesta en diferentes matrices Validación por GC-FID Responde a aminas alifáticas entre 10-100 veces menos sensibles Aplicación para móvil 	152
MDA, MDMA, MAMP, AMP	~ 50	170-335	1,2-naftoquinona-4 sulfonato	Encapsulado en PDMS	Cambio de color amarillo-naranja o amarillo-gris	<ul style="list-style-type: none"> Dispositivo sólido RSD inter 15% Validación con FTIR-ATR Estable 9 mese 	153 En esta Tesis y LC

2.3.5 Amonio

El amonio juega un papel muy importante en los aportes de nitrógeno en agua y es un buen indicador de su calidad [155-157]. Los niveles altos de concentración de amonio en aguas suelen estar vinculados a las descargas externas en el sistema acuático, principalmente de la agricultura, los efluentes industriales y alcantarillas urbanas [158]. El NH_4^+ así como el NH_3 se encuentran en aguas ambientales, y la existencia de ambas especies depende de parámetros tales como el pH, la salinidad y la temperatura. El amonio también está presente como nitrato de amonio y sulfato de amonio en el material particulado atmosférico (PM). Su determinación se utiliza para evaluar el aerosol secundario inorgánico (SIA), uno de los principales componentes de PM que proviene principalmente de fuentes antropogénicas (tráfico, producción de energía y las emisiones agrícolas).

El deterioro de la calidad del agua en el siglo pasado ha sido fácilmente reconocible observando la sobrecarga de nitrógeno que sufren las especies que la habitan. Los niveles altos de amonio es uno de los factores de estrés importantes en la calidad del agua [158]. El poder eutrofizante del NH_4^+ y NH_3 es bien conocido, pero también se pueden considerar como precursores de gases de efecto invernadero (GEI), ya que la nitrificación y desnitrificación permiten la formación de N_2O [159-161]. La monitorización del NH_4^+ y NH_3 son importantes no sólo para la evaluación de la calidad del agua, sino también el calentamiento global y el cambio climático. Además aspectos del PM ampliamente estudiados como el impacto en los materiales del clima, de construcción, reducción de la visibilidad y efectos adversos sobre la salud han sido directamente relacionados con su composición de amonio [162].

Existe una demanda creciente para desarrollar sistemas de monitorización de amonio como parámetro importante en el control ambiental [163]. Uno de los métodos de análisis más habituales se basa en la reacción de derivatización con timol para formar indofenol/indothymol de color azul [164]. Existen otros métodos colorimétricos como el método de SPE-indotimol, el método de Roth, Nessler y luminol (Ver **Sección 6.3.5**). En la siguiente tabla se muestran algunos de los sensores desarrollados en los últimos cinco años para la estimación de amonio. Solo uno de ellos se ha aplicado a muestras reales, concretamente en muestras de pescado **Tabla 11** [165] sin embargo el intervalo de concentraciones de análisis de este sensor resulta inadecuado para aguas. El sensor propuesto en esta Tesis [166] presenta un rango y unos LODs óptimos y se ha ensayado en muestras de aguas y extractos acuosos de PM_{10} .

Tabla 11. Sensores para la detección de amonio

Amonio	LOD (mg/L)	Estimación (mg/L)	Colorante	Diseño del sensor	Muestreo	Respuesta del sensor	Ref
NH_4^+	0.19	0.19-19	Aza-BODYPY funcionalizado con 2 anillos pirazinos	Ensayo en disolvente orgánico de THF	Cambio de color de verde a rojo/rosa y desactivación de la fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Selectivo por NH_4^+ frente otros cationes (Zn^{2+}, Cd^{2+}, Hg^{2+}, Co^{2+}, Fe^{3+}) • Fe^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Na^+, Al^{3+}, Ca^{2+}) • No se ha ensayado en muestras 	167
NH_3	7.6	19-380	NPs de NaYF ₄ :Yb,Er y indicador rojo de fenol	Disolución NPs y el indicador en CHCl_3 pulverizada sobre polietileno tereftalato	Cambio de color de rojo a verde al ser excitado a 980 nm	<ul style="list-style-type: none"> • Reversible • Estable 3 meses • No le afecta la humedad • Detección también en matrices complejas • No se ha ensayado en muestras 	168
NH_4^+	1	1-53	Nanopartículas de plata (AgNPs) en goma de guar	Biofilm preparado directamente con AgNP y goma de guar	Desplazamiento SPB de 413-440 nm	<ul style="list-style-type: none"> • 2-3 s • Buena reproducibilidad • Sensor ecológico • No se ha ensayado en muestras 	169

Capítulo 2. Introducción

NH_4^+	0.001	0.001-1	Nanopartículas de plata (AuNPs) en goma de guar	Biofilm preparado directamente con AuNP y goma de guar	<ul style="list-style-type: none"> • Pérdida del color rosa a incoloro. • Desaparición de la SPB • Reproducible • Estable 8 meses • No se ha ensayado en muestras 	10s	165
NH_4^+	0.0007	0.001-0.19	Complejo de dansilo Cobalto (II) porfirina	Complejo en forma de cristal y disolución de HCl	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de la fluorescencia y cambio de color de rojo a verde. 	No hay ensayos de selectividad ni estabilidad y reproducibilidad.	170
NH_4^+	0.4	1-10	Timol	Encapsulación del reactivo en PDMS	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio de color de amarillo a verde • Comparación con otros métodos • Aplicación en muestras de agua y extractos PM_{10} 	<ul style="list-style-type: none"> • RSD intra ~5% y inter~7% • Estable durante meses • Comparación con otros métodos • Aplicación en muestras de agua y extractos PM_{10} 	166 En esta Tesis

2.3.6 Las aminas biogénicas

Las poliaminas son moléculas de tamaño pequeño, derivadas metabólicamente de ciertos aminoácidos. Poseen naturaleza policatiónica, con cargas positivas debido a la protonación de los grupos amino primarios y secundarios a pH fisiológico (**Figura 15**) [171].

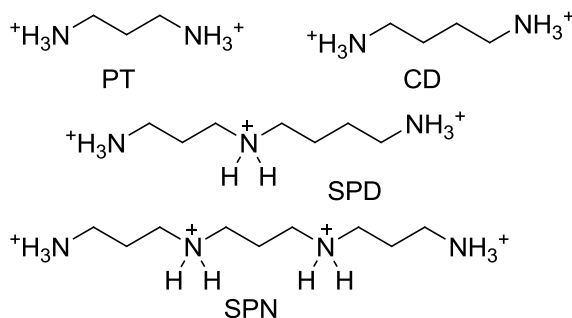


Figura 15. Estructura química de las poliaminas

Las poliaminas biogénicas como la putrescina (1,4-butanodiamina) PT, cadaverina (1,4-pentanodiamina) CD, espermidina (N-(3-aminopropilo)-1,4-butandiamina) SPD, y espermina (N¹,N⁴-bis(3-aminopropilo)-1,4-butandiamina) SPN, entre otras (**Figura 15**), son moléculas clave en las etapas de la regulación celular como el crecimiento, la multiplicación y la diferenciación celular [172, 173]. Están implicadas en los procesos biológicos de replicación, transcripción, traslación, modificaciones post-translacionales, canal iónico, estabilidad de membrana, proliferación celular, transformación, diferenciación, apoptosis y carcinogénesis [174-176]. Aunque su importancia es más que evidente, se conoce relativamente poco acerca de su mecanismo de acción. El hecho de participar en tantos procesos celulares hace que resulte complejo discernir cuál es su función específica en las células; información que sería esencial tanto para el diagnóstico como para tratamiento de enfermedades como el cáncer.

Estudios recientes han demostrado que el rápido crecimiento celular que tiene lugar en los tejidos cancerosos va asociado a una elevada producción de poliaminas que son transferidas al torrente sanguíneo hasta el riñón donde se excretan en la orina [177]. Cuando se erradica completamente el tejido tumoral mediante una operación quirúrgica o tratamientos de radio-quimioterapia, tiene lugar una disminución de los niveles de poliaminas con el tiempo [178-181]. De forma que la monitorización de la concentración de poliaminas podría emplearse para seguir la evolución de un tumor y conocer la eficacia de los tratamientos terapéuticos aplicados en el paciente de forma fácil y rápida. Así pues, los niveles de poliaminas pueden ser utilizados como un biomarcador de control en pacientes con cáncer.

Capítulo 2. Introducción

La determinación de poliaminas en orina humana no es sencilla debido al gran número de componentes en orina que pueden interferir y al bajo nivel de concentración [179, 182, 183]. Se necesitan métodos de determinación selectivos y sensibles. Los métodos más utilizados para la detección poliaminas en orina son métodos cromatográficos, electroforéticos o fluorimétricos así como inmunoensayos [184-187].

La utilización de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es uno de los métodos analíticos más utilizados para la determinación de poliaminas por su gran sensibilidad, selectividad y reproducibilidad. Sin embargo, se requieren tratamientos de muestra complejos y tiempos de análisis relativamente altos.

Por otra parte, los métodos fluorimétricos tienen la ventaja de ser métodos rápidos y fáciles de utilizar, a la vez que relativamente sensibles. En este campo, se han publicado diversos estudios donde se presentan diversos químiosensores de SPN (Ver **Tabla 12**): a partir de un conglomerado *montmorillonite-hydrogel*, [188] una sonda molecular de compuesta de cumarina [189] y también con nanopartículas de oro (AuNPs) utilizadas; i) como desactivadores (quenchers) de la fluorescencia de colorantes por transferencia electrónica del fluoróforo a las nanopartículas de oro; AuNP/BODIPY [190] ii) como soportes del fluoróforo que se ve activado en presencia de la SPN [185]. Sin embargo, el diseño y la síntesis de este tipo de sensores no resulta nada sencillo. El ensayo propuesto en esta Tesis tiene la capacidad de discriminar entre pacientes sanos y pacientes con cáncer.

Tabla 12. Sensores para la detección de poliaminas							
Aminas Biogénicas	LOD	Estimación	Colorante	Diseño del sensor	Muestreo	Respuesta del sensor	Ref
SPN SPD	20µM	20-100 µM	Cumarina	Cumarina unida a montmorillonita y embebido en hidrogel supramolecular	Aumento de la fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Selectivo: SPN y SPD • Muestras de orina artificial 	188
SPN, SPD, PT, Histamina, Tiramina	0.1 mM	0.1-1.2 mM	Derivado de cumarina	de Inmovilización en polimetacrilato	Desplazamiento de la banda y aumento de la absorbancia	<ul style="list-style-type: none"> • Control del pH • Aplicación a PT en gas 	189
SPN SPD	5 µM	5-100 µM	AuNP-citrato/ BODIPY	Disolución (tampón)	Aumento de la fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Selectivo: SPN y SPD • Orina artificial 	190
PT, SPN, SPD Otras aminas	10 µM	Semi- cuantitativa	Ácido carbónico Tetrafenileno modificado	Disolución en HCl	Aumento de la Fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> • Identificación de 10 aminas diferentes 	185
SPN	0.07µM	0.07-0.75µM	-	Disolución acuosa de AuNPs	Desplazamiento de la banda y aumento de Absorbancia. Cambio de color rosa a azul	<ul style="list-style-type: none"> • Selectivo SPN • Aplicado en orina voluntarios sanos y enfermos de cáncer 	18 en esta Tesis

2.3.7 Fosfatos

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de organismos biológicos, tanto para su metabolismo, como para sus procesos fotosintéticos. Sin embargo, el exceso de los niveles de fosfato en el agua provoca la proliferación de vegetación acuática desencadenando un proceso de eutrofización; cuando las algas y las plantas mueren, los microorganismos las descomponen consumiendo el oxígeno del agua. La reducción de la concentración de oxígeno disuelto es potencialmente perjudicial para la vida acuática en general. Desde la mitad del siglo XX, la eutrofización en lagos y embalses se ha convertido en uno de los problemas ambientales más generalizados, costosos y difíciles de solventar. Hoy en día, los niveles de fosfato inorgánico (P_i) en el agua están regulados por la UE a través de la Directiva sobre el tratamiento de agua urbana, que especifica la concentración máxima total media anual de entre 2-1 mg/L en función del tamaño de la zona urbana. La medición de los niveles de fosfato en los ríos, lagos y aguas costeras es cada vez más importante si se quiere alcanzar un buen estado ecológico y químico para el año 2015, tal y como se inició en la Directiva Marco del Agua [191]. La monitorización y prevención es la forma más fiable y económica para preservar la calidad del agua.







El método más común para la detección de P_i en aguas es un método colorimétrico desarrollado en la década de los sesenta. Este método presenta como interferentes arseniatos, silicatos, sulfuros sulfuros y agentes oxidantes. Además, el molibdeno, reactivo requerido para la prueba, es un producto químico cancerígeno, haciendo de este un procedimiento potencialmente perjudicial para la salud [192]. A pesar de la amplia variedad de metodologías desarrolladas, ninguna de ellas ha sido capaz de substituir al ensayo colorimétrico con molibdeno. La falta de selectividad por el P_i contra otros aniones (sobre todo en el diseño de sondas o receptores supramoleculares) y también, el intervalo de concentraciones requerido para aguas (0.1-5 mg/mL) sigue siendo un problema tanto para el desarrollo de sensores ópticos como electroquímicos. En la siguiente tabla (**Tabla 13**) se muestran diferentes sensores ópticos para P_i . Los sensores descritos en [193] y [194] resultan demasiado sensibles mientras que los propuestos en [195] y [196] adolecen de sensibilidad. Solo dos de ellos se han aplicado a muestras de agua [196] y [197]. En la presente Tesis se propone un biosensor óptico que contribuye a disminuir los problemas mencionados anteriormente (**Tabla 13**, [197])







Tabla 13. Sensores para la detección de fosfato inorgánico en aguas							
P _i	LOD (mg/L)	Estimación (mg/L)	Colorante	Diseño del sensor	Muestreo	Respuesta del sensor	Ref
P _i	0.1·10 ⁻³	0.1-770 ·10 ⁻³	Poli-9-aminofluoreno	Electropolimerización	Decrece la fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> Interferente: Fe (II) No detecta piro y polifosfatos Aplicación en agua potable 	193
P _i	0.8·10 ⁻³	10-155·10 ⁻³	Complejos quinólicos de cloruro de cerio	Complejo en disolución	Aumento de la fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> Selectivo frente I₃⁻, NO₃⁻, CN⁻, CO₃²⁻, Br⁻, Cl⁻, F⁻, H₂PO₄⁻ y SO₄²⁻ Aplicado en muestras de fertilizantes y agua del grifo No existen estudios de estabilidad 	194
PP _i	4800	-	Complejo de zinc (II)	Complejo en disolución	Cambio de color de rojo a violeta	<ul style="list-style-type: none"> Selectivo frente otros aniones y ATP, P_i No requiere tampón No se ha ensayado en muestras 	195
P _i	480	480-2880	Complejo fluorescente y cobre	Complejo de fluorescente y cobre	Aumento de la fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> Selectivo frente AcO⁻, N₃⁻, SCN⁻, CO₃²⁻, Br⁻, Cl⁻, F⁻, I⁻ y SO₄²⁻ Aplicación en muestras de orina, suero y saliva 	196
P _i	0.2	0.5-5	3-O-metilfluoresceína fosfato	Alcalina fosfatasa inmovilizada en un film de zeína y el cromóforo en disolución	Aumento de la fluorescencia y aumento del color amarillo	<ul style="list-style-type: none"> Rango óptimo de detección en aguas con niveles altos de P_i (0.5-5 mg/L). No son interferentes los cationes Estable 1 mes a -20°C No contaminante y Biodegradable 	197 En esta Tesis

CAPÍTULO 3.
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

En la **Tabla 14** se muestran los diferentes reactivos utilizados en esta Tesis, la casa comercial donde fueron adquiridos así como los pictogramas de seguridad de cada uno de ellos.

Tabla 14. Listados de reactivos utilizados en esta tesis. Donde  = Toxicidad aguda categoría 4 (GHS07) peligro al inhalar,  = Cancerígeno, Mutagénico (GHS08),  = Toxicidad aguda categoría 1, 2,3 (T0),  = Sustancia inflamable (IN),  = Sustancia corrosiva (CR),  = Dañino para el medio ambiente acuático (EN).

Reactivo	Casa comercial	 GHS07	 GHS08	 T0	 IN	 CR	 EN
Acetona	Romil				x		
Acenafteno	Dr. Ehrenstorfer	x			x		
Acenaftaleno	Dr. Ehrenstorfer						x
Acetonitrilo	Romil				x		
Ácido acetilsalicílico	Sigma						
Ácido clorídrico	Fluka, Merk						
Ácido tetracloruro úrico	Aldrich					x	
Ácido úrico	Aldrich						
Alcalina fosfatasa	Sigma						
Albumina bobina	Sigma-Aldrich						
3-aminopropil trietoxisilano	Aldrich					x	
Antraceno	Dr. Ehrenstorfer			x			x
Atrazina	Sigma-Aldrich	x		x			
Benzo[a]antraceno	Dr. Ehrenstorfer			x			
Benzo[b]fluoro antraceno	Dr. Ehrenstorfer						x

Capítulo 3. Metodología experimental

Benzo[g,h,i]pirileno	Dr. Ehrenstorfer						
Benzo[a]pireno	Dr. Ehrenstorfer			x			x
β-glucuronidasa	Roche						
Cafeína	Guinama		x				
Carbonato de sodio	Probus						
Chelex 100	Fluka						
Cloroformo	Romil			x			
Cloroformiato de 9-Fluorenilmetilo	Sigma					x	
Clorpirifos	Sigma-Aldrich						
Cloruro de sodio	Probus						
Creatinina	Sigma-Aldrich						
Criseno	Dr. Ehrenstorfer			x			x
Diclorohidrato de Cadaverina	Aldrich	x					
Dibenzo[a,h]antraceno	Dr. Ehrenstorfer			x			
Dibutil ftalato (99.5%)	Sigma-Aldrich						
Diciclohexilcarbodimida	Sigma-Aldrich						
2-dihexil ftalato (99%)	Sigma-Aldrich			x			
Dietilamina	Sigma				x	x	
Dietil ftalato (99%)	Sigma-Aldrich						
Dimetilamina	Sigma-Aldrich				x	x	
4-(N,N)-dioctilamino)-4'-trifluoroacetilazobenceno	Sigma						
Etanol	Romil				x		
Etilamina	Sigma			x			
Fenantraceno	Dr. Ehrenstorfer	x					
Fluoroanteno	Dr. Ehrenstorfer						x
Glucosa anhidra	Scharlau						
Glutaraldehído	Sigma-Aldrich			x		x	
Glicerol	Sigma						
Hidrocloruro de efedrina	Aldrich						
Hidrocloruro de levamisol	Fluka			x			

Capítulo 3. Metodología experimental

Hidrocloruro de procaina	Sigma			x			
Hidroxido de sodio	Panreac					x	
Hidroxido de terbutilazina	Dr. Ehrenstorfer	x					x
Ibuprofeno	Sigma		x				
Indo[1,2,3c,d]pireno	Dr. Ehrenstorfer		x				
Lactosa monohidratada	Guinama						
Maltosa-1-hidratada	Panreac						
Manitol	Scharlau						
Metanol	Romil			x	x		
Metilamina	Sigma				x	x	
Monoetil hexil ftalato	Dr. Ehrenstorfer	x		x			
N-acetilcisteina	Fluka						
Nanopartículas de dióxido de silicio (5-15 nm)	Aldrich						
Nanotubos de carbono monocapa	Aldrich		x				
Nanotubos de carbono multicapa	Aldrich		x				
Naftaleno	Dr. Ehrenstorfer						
1,2-naftoquinona-4-sulfonato	Sigma	x					
orto-ftaldialdehido	Sigma-Aldrich	x		x			
Paracetamol	Guinama						
Peróxido de hidrogeno	Sigma-Aldrich					x	
Perileno	Dr. Ehrenstorfer						
Pireno				x			x
Piriproxifen	Sigma-Aldrich		x				x
Polidimetilsiloxano Sylgard 184 kit	Dow Corning						
Propazina	Sigma-Aldrich			x			
Putrescina	Sigma	x					
Sal de ciclohexamonio de 3-O-metilfluoresceina fosfato	Sigma-Aldrich						
Sacarosa	Guinama						
Sulfato de magnesio	Probus						
Urea	Anal-NORMAPU						

Capítulo 3. Metodología experimental

	S						
Tetraortosilicato	Sigma	x	x				
Tetrahidroclorato de espermina	Sigma-Aldrich	x					
Terbutilazina	Dr. Ehrenstorfer	x					x
Terbutilazina-desetil	Sigma-Aldrich	x					
Trihidroclorato de espermidina	Sigma	x					
Timol	Sigma					x	x
Trimetilamina	Sigma	x					
zeína	Sigma						

3.2 INSTRUMENTACIÓN Y MONTAJES

- Sistema de purificación del agua nanopure II (UK).
- pH metro Crison micropH 2000 (España).
- Láser de Nd/YAG a 532 nm (Quantel Brilliant, France) **Figura 16A.**
- Fororreactor a LZC-L4V (Luzchem Research, Inc) **Figura 16B.**

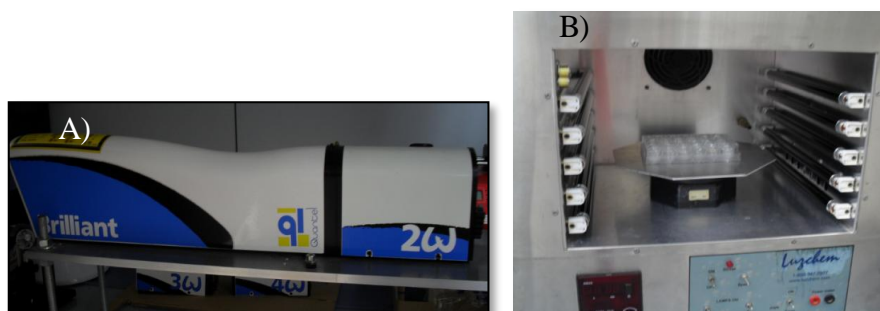


Figura 16. A) Láser Nd/YAG y B) Fotoreactor a LZC-L4V.

Capítulo 3. Metodología experimental

- Espectrofotómetro Varian Cary 60 de fibra óptica (Agilent, USA).



Figura 17. Espectrofotómetro de fibra óptica.

- Espectrofotómetro UV-Vis HP-8453 (Hewlett-Packard USA).

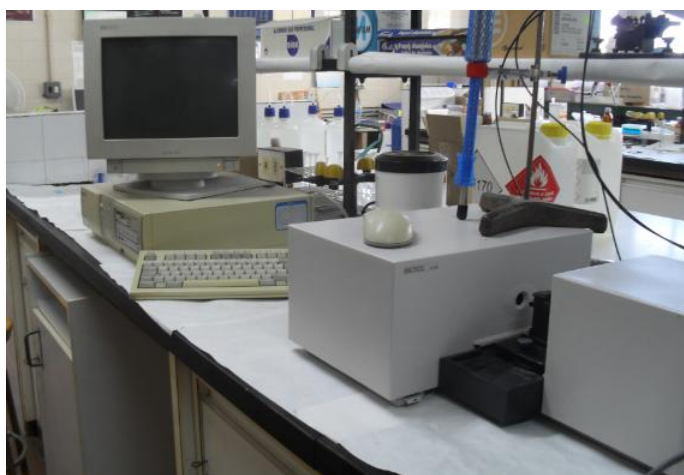


Figura 18. Espectrofotómetro UV-Vis HP-8453.

- Espectrofotómetro UV-Vis equipado con accesorio de reflectancia Labsphere RSA-HP-8453 (Hewlett Packard, USA).

Capítulo 3. Metodología experimental

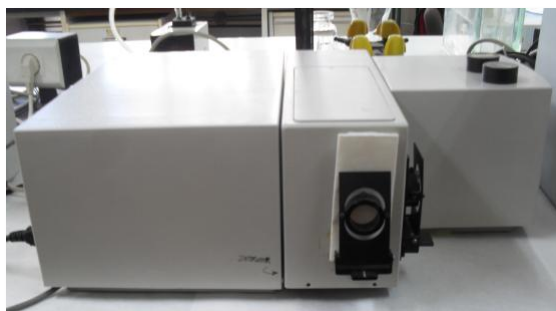


Figura 19. Espectrofotómetro UV-Vis Labsphere RSA-HP-8453.

- Espectrofluorímetro (Jasco FP-750, Tokio).

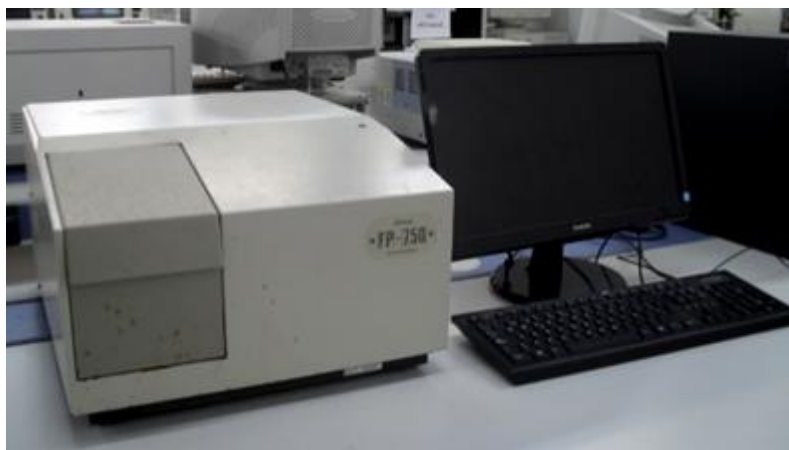


Figura 20. Espectrofluorímetro Jasco FP-750.

- Equipo para espectroscopia infraroja de transformada de Fourier (FTIR) con sistema de reflectancia total atenuada (ATR), Cary 630 FTIR (Agilent, USA).



Figura 21. FTIR-ATR (Cary 630 FTIR)

- El sistema de cromatografía líquida utilizado consiste una bomba cuaternaria (Jasco, PU-2089 Plus, Japón), un inyector de muestra automático con un loop de 20 μL , una interfase (LC-NetII/ADC) acoplado a un detector de fluorescencia (Jasco, FP-2020 Plus Intelligent Fluorescence Detector) El detector está conectado a un sistema de datos (ChromNAV JASCO Chromatography Data System) para su adquisición.



Figura 22. Equipo de CapLC Jasco, PU-2089 Plus.

- El sistema de cromatografía líquida capilar (CapLC) consiste en una bomba binaria capilar (Agilent Serie 100, Waldbronn, Alemania) acoplado a un detector de UV-vis de fila de diodos (Agilent Serie 100, Waldbronn, Alemania) con celda de 80 nL. El detector se acoplo a un sistema de registro de datos y análisis de datos (Agilent, HPLC ChemStation).



Figura 23. Equipo de CapLC Agilent Serie 100.

- En esta Tesis el sistema de CapLC de la **Figure 23** se acopló a IT-SPME. La **Figura 24** muestra un esquema del montaje empleado. En este sistema una columna capilar se conectó a una válvula de inyección de 6 puestos y se empleó como bucle de inyección. Las conexiones capilares se hicieron empleando camisas (2.5 cm, 1/16 iu) de poliéster acetona (PEEK) y ferrulas de 1/16. Los patrones y las muestras se procesaron manualmente utilizando jeringas de precisión. Una vez los patrones y muestras se procesan en la posición de carga, la válvula se giró de forma que los analitos se desorbieron de la columna capilar con la fase móvil, transferiéndose a la columna columna analítica para su separación y detección.

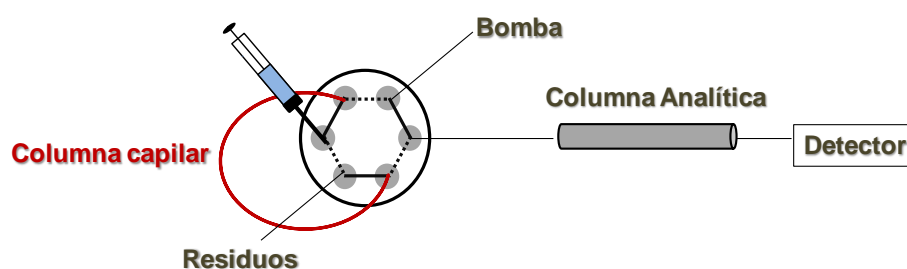


Figura 24. Esquema del sistema IT-SPME-Cap-LC-DAD utilizado.

- La separación de los analitos se lleva a cabo mediante una columna Lichrospher 100 RP18 (125 mm × 4 mm d.i., 5 µm de tamaño de partícula, Merck).

- Microscopio óptico ECLIPSE E200LED MV (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) con una cámara Nis-Elements 4.20.02 de software Nikon.



Figura 25. Microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200LED MV.

- Las micrografías electrónica de barrido (SEM) se obtuvieron con un HITACHI-S4800 y HITACHI-S4100 ambas a 20 kV.
- La distribución de tamaños de las AuNPs se determinó mediante microscopia de transmisión electrónica (TEM) con un equipo JEM-1010 de JeolLtd operando a 100kV.
- Las medidas de resonancia magnética nuclear de ángulo de spin para el silicio (Si^{29} MAS-NMR) se utilizó un equipo Bruker AVANCE 400.
- El esquema empleado para la generación de patrones gaseosos de aminas se muestra en la **Figura 26 (Sección 6.1)**. En este sistema la atmosfera de aminas de concentración conocida se obtuvo añadiendo un volumen de disolución de amina en la botella de dilución estática seguido de un volumen de NaOH (10 M) para favorecer la volatilización de las aminas (**Figura 26**). El sensor se suspendió de la botella de dilución y se cerró herméticamente. La respuesta del sensor se midió una vez transcurrido el tiempo de muestreo óptimo en cada caso.



Figura 26. Botella de dilución estática (2 L) empleada para la generación de patrones gaseosos.

3.3 SÍNTESIS DE AuNPs

La obtención de AuNPs se llevó a cabo en presencia de H_2O_2 mediante un método térmico. Se preparó una disolución acuosa de H_2O_2 (0.5-1.2 mM) con $HAuCl_4$ (0.5 mM) en agua milliQ tratada con Chelex 100. La disolución se introdujo en un tubo de vidrio con un imán y se procedió a la ablación con el láser de Nd:YAG irradiando a 532 nm (10Hz, 16-19J) entre 60 a 300 minutos. En la **Figura 27** se muestra un esquema del montaje utilizado para la ablación láser con el fin de obtener AuNPs monodispersas.

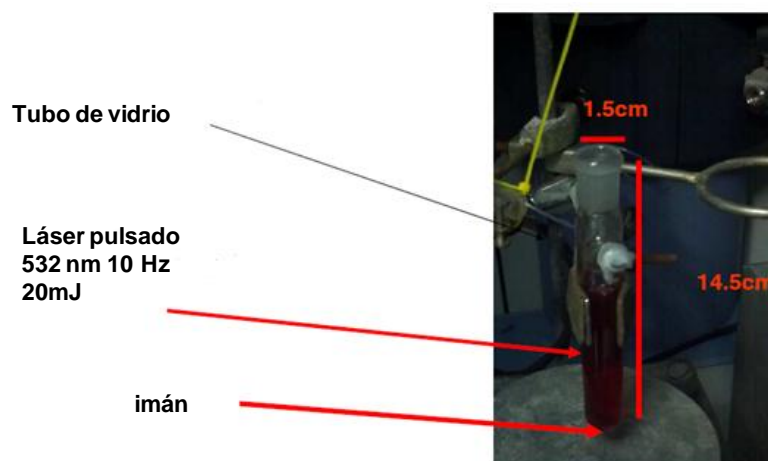


Figura 27. Esquema del montaje utilizado para la irradiación con Láser de la solución de AuNPs.

Con el fin de disminuir la concentración de H_2O_2 después de la síntesis de AuNPs la disolución de AuNPs se dispuso en una placa de pozillos y se introdujo en el fotoreactor con irradiación superior y rotación durante 30-60 minutos. La disminución de H_2O_2 se comprobó mediante las tiras reactivas de Merckoquant®.

El protocolo seguido para la síntesis de AuNPs se resume a continuación:

1) Preparación de la disolución de peróxido de hidrógeno

❖ *Stock 1*: En un tubo de plástico se añaden 100 μ L de H_2O_2 al 50% (es importante sacar el reactivo de la nevera 10 minutos antes de utilizarlo) a 10 mL de agua milliQ previamente tratada con Chelex 100 y filtrada. La concentración de peróxido de hidrógeno en el *stock 1* es de 174 mM.

❖ *Stock 2*: se prepara a partir de 1 mL de *stock 1* en 9 mL de agua milliQ tratada con Chelex 100 y filtrada. La concentración de peróxido de hidrógeno en el *stock 2* es de 17.4 mM.

❖ *Stock 3*: se prepara a partir de diluir el *stock 2* para obtener una absorbancia a 240 nm de 0.6-0.2 Sabiendo que el $\epsilon = 40.3$. Obtenemos que la concentración del *stock 3* que varía entre 11-5 mM según cada síntesis.

2) Preparación de la disolución de oro

Se pesa una cantidad de entre 8-29 mg de $H AuCl_4$ trihidratado ($M: 393,8 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) (con pipeta de vidrio, evitar utilizar espátulas metálicas) en un vial ámbar y de forma rápida, ya que el oro es higroscópico. A partir de esta cantidad se calcula el volumen de agua adicionado para obtener una concentración de 10 mM.

3) Preparación de la disolución final

Se añade en un tubo de centrifuga de vidrio (20 mL) cubierto de papel de aluminio, 16.75 mL de agua milliQ previamente tratada con chelex y filtrada, 1 mL de la disolución de $AuCl_4 \cdot 3H_2O$ (10 mM) y 2.25 mL del *stock 3* de H_2O_2 , obteniendo un volumen final de 20 mL. Las concentraciones finales fueron: $[Au^{3+}] = 0.5$ y $[H_2O_2] = 0.5-1.2$ mM.

4) Test de peróxidos y eliminación de H_2O_2 .

Se utilizan las tiras reactivas Merckoquant®, para evaluar si existe H_2O_2 en exceso. La **Figura 28** muestra un ejemplo de un test negativo de una disolución de AuNPs. Si queda agua oxigenada, la disolución de AuNPs se coloca en una placa Petri de 24 pocillos y se irradia en el fotoreactor hasta que el test resulta negativo. También se

comprueba la relación de absorbancias en el espectro de UV-Visible. Los AuNPs sintetizadas fueron utilizadas en la **Sección 5.1**



Figura 28. Fotografía de los colores indicativos de las concentraciones de H₂O₂ presentes en el medio y de una tira reactiva para una disolución de AuNPs en la que no queda H₂O₂ en cantidad suficiente para ser detectada en este ensayo.

3.4 PREPARACIÓN DE SENSORES

3.4.1 Sensores de PDMS-NQS y PDMS/TEOS-NQS (Patente ES248247B1).

Se utilizó el kit PDMS Sylgars 184 que consta de dos componentes: a) el elastómero base y el agente de curado, estos se mezclaron en proporción (10:1) y se dejaron gelificar. Para la preparación de los sensores se mezclaron el elastómero base con la disolución del reactivo derivatizante (NQS ó ETH^T 4001) en etanol o acetona respectivamente (**Ver Tabla 15; F1b y F8a**) y se agitó vigorosamente. A continuación, se añadió el agente de curado, se agitó y se depositó en moldes de diámetro 1.5 cm. Finalmente, se dejaron gelificar durante 2-5 días a temperatura ambiente. Para los sensores híbridos se utilizó el mismo procedimiento con la diferencia que el reactivo se suspendió directamente en TEOS. En **Tabla 15** se muestra la composición de los diferentes sensores estudiados. Aquellos señalados en rojo representan los sensores óptimos utilizados en la determinación pasiva de aminas en aire. Estos sensores se utilizaron la **Sección 6.1**.

Tabla 15. Composición de los sensores PDMS/(TEOS)-NQS y PDMS/(TEOS)- ETH^T 4001

Sensor	Colorante		Disolvente		Matriz Polimérica	
	Tipo	Mg/g	Tipo	Vol. (mL)	PDMS%	TEOS %
F1a	NQS	3.4	ETOH	0.7	100	-
F1b	NQS	1.7	ETOH	0.35	100	-
F1c	NQS	0.85	ETOH	0.35	100	-
F2	NQS	1.7	-	-	70	30
F3	NQS	1.7	-	-	50	50

F4	NQS	1.7	-	-	40	60
F5	NQS	0.85	ETOH	0.35	100	-
F6	NQS	3.4	CHCl ₃	0.35	100	-
F7	NQS	1.7	H ₂ O	0.35	100	-
F8a	ETH ^T 4001	0.4	acetona	0.35	100	-
F8b	ETH ^T 4001	1.7	acetona	0.35	100	-
F9	ETH ^T 4001	0.4	acetona	0.35	80	20
F10	NQS	1.7	acetona	0.35	100	-
F11	NQS	1.7	-	-	50	50

3.4.2 Sensores de PDMS/TEOS-NQS-SiO₂NPs

Los sensores de PDMS se prepararon siguiendo un procedimiento muy similar al mencionado en el apartado anterior. En primer lugar, el NQS se disolvió en etanol bajo condiciones de ultrasonidos durante 10 min. Se añadió el elastomero base de PDMS y se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 15 min para obtener una dispersión homogénea. Después, se añadió el agente de curado PDMS con una relación en peso de (1:10) (agente de curado: elastómero base) bajo vigorosa agitación durante 15 min y a temperatura ambiente. Finalmente, se depositó en moldes de plástico y se curó a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 días en oscuridad. Diferentes formas y el tamaño de los films fueron ensayados con el fin de mejorar el tiempo de respuesta (**Sección 6.2**).

Los films de PDMS/TEOS-NQS-SiO₂NPs se prepararon siguiendo un proceso similar. El NQS y las SiO₂NPs se disolvieron en TEOS en el ultrasonidos durante 10 min. A la disolución resultante se le añadió el elastómero base de PDMS y se dejó en agitación durante 15 min. Después se añadió el agente de curado en relación en peso (1:10) y se dejó en agitación 15 min. Finalmente, se depositó en moldes de plástico y se curó a 30°C en la estufa 1 día. Se utilizó una relación en peso 50:50 de PDMS:TEOS y un 0.1% (w / w) de NQS y 0.1% (w / w) de SiO₂ NPs (**Sección 6.2**).

En la **Tabla 16** se muestra la composición de los sensores estudiados. Todos los sensores se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente.

Tabla 16. Composición de los sensores de PDMS/TEOS-NQS dopados con NPs.

Sensor	NQS (% w)	Etanol (% v/v)	PDMS Base+Curado (% w)	TEOS (% w)	SiO ₂ NPs (% w)	Forma	
						Cuadrado (altura; anchura, cm)	Circulo (diámetro; anchura, cm)
A	0.1	3.6	96.3	-	-	2; 1	3; 1
B	0.1	-	49.9	49.9	0.1	-	3; 1
C	0.1	-	39.92	59.88	0.1	-	3; 1

3.4.3 Sensores de PDMS-timol

El sensor de PDMS-timol se sintetizó mezclando la silicona base (3 g), el timol (400 µL) en acetona y agente de curado (0.3g), y se agitó vigorosamente durante 40 min. El gel resultante se transfirió a una placa de pocillos de poliestireno, utilizando 0.2 g por cada pozillo, por sensor y se dejaron gelificar a temperatura ambiente durante 2 días. (**Sección 6.3**).

El sensor de PDMS-timol/NaOH se sintetizó mezclando la silicona base (3 g), el timol (400 µL) en acetona, NaOH (80-250 µL) y agente de curado (0.3 g) y se agitó vigorosamente durante 40 min. El gel resultante se transfirió a una placa de pocillos de poliestireno, utilizando 0.2 g por cada pozillo, por sensor y se dejaron gelificar a temperatura ambiente durante 2 días (**Sección 6.3**).

El sensor de PDMS-timol/nitroprusiato se preparó mezclando la silicona base (3 g), el timol (400 µL) en acetona, nitroprusiato pulverizado (26 mg), agente de curado (0.3g) y se agitó vigorosamente durante 40 min. El gel resultante se transfirió a una placa de pocillos de poliestireno, utilizando 0.2 g por cada pozillo, por sensor y se dejaron gelificar a temperatura ambiente durante 2 días (**Sección 6.3**).

3.4.4 Sensor de zeína/glicerol-ALP y zeína/glicerol-OMFP

Para el sensor ALP/zeína se disolvió la zeína (10% w/v) en etanol acuoso (90% v/v) y utilizando glicerol como plastificante (0%, 30%, 50%, 70% y 90% en relación al peso total). Se añadió la alcalina fosfatasa (80 µL of 10 mg/mL) y se agitó durante 20-30 min hasta completa homogenización. Finalmente, se introdujeron 200 µL por placa de pocillos. Para la obtención del sensor OMFP/zeína se preparó una disolución de OMFP en etanol y se añadió a la zeína siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Ambos sensores se dejaron a temperatura ambiente durante 6 h y una vez solidificados se

guardaron en el congelador (-20°C). Tanto la disolución de ALP como OMFP se prepararon justo antes de su utilización.

3.5 PROCEDIMIENTOS Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.5.1 Obtención de las respuesta del sensor de AuNPs

Para evaluar la respuesta colorimétrica de las AuNPs frente a la presencia de poliaminas en patrones acuosos se prepararon cuatro experimentos independientes en los cuales, se añadió a una disolución de AuNPs (1 mL, A=0.36) volúmenes crecientes entre 10-100 µL de disolución de putrescina (PT), cadaverina (CD), espermidina (SPD) y espermina (SPN), respectivamente. Los espectros se midieron a los 20 segundos de la adición de poliaminas. Las concentraciones utilizadas fueron: putrescina (3-5 µM), cadaverina (2-5 µM), espermidina (0.1-1.5 µM) y espermina (70-750 nM) (**Sección 4.2**).

Para la cuantificación por adición estándar, la orina se trato por SPE. Se adicionaron volúmenes de orina tratada de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 µL a una disolución de AuNPs (1 mL, A=0.36) y se seleccionaron como volúmenes óptimos de orina tratada 5, 10 y 15 µL. Para la cuantificación de SPN se adicionaron volúmenes de orina tratada y orina fortificada de 5, 10 y 15 µL en alícuotas separadas de disolución de AuNPs (1 mL, A=0.36) y se registraron los espectros a los 20 segundos (**Sección 4.3**).

3.5.2 Procedimiento IT-SPME-CapLC

Columnas y condiciones cromatográficas

En la **Tabla 17** se describen los capilares, columnas analíticas y condiciones cromatográficas empleadas para cada uno de los analitos de esta Tesis.

Tabla 17. Columnas y condiciones cromatográficas

Análito	Matriz	Columna capilar	Columna analítica	Fase móvil	Detector	Capítulo			
Ftalatos	Agua	TRB-5 ^a	Onyx C-18 Monolítica (150 mm x 0.2 mm i.d) Phenomenex	Gradiente: F = 5 µL/min	UV de fila de diodos (190-400 nm) Detección a 320 nm	Sección 5.1			
				t = 0 MeCN:H ₂ O (70:30)					
				t = 15 MeCN:H ₂ O (100:0) t = 25 MeCN:H ₂ O (70:30)					
Ftalatos	Orina	TRB-5 ^a	Zorbax SB C-18 particulada (150 mm x 0.5 mm i.d) Agilent	Gradiente: F = 10 µL/min	UV de fila de diodos (190-400 nm) Detección a 320 nm	Sección 5.2			
				t = 0 MeCN:H ₂ O (50:70)					
				t = 15 MeCN:H ₂ O (95:5)					
				t = 22 MeCN:H ₂ O (70:30) t = 25 MeCN:H ₂ O (50:50)					
PAHs, Triazinas, Clorpirifos,	Agua	TRB-5	Zorbax SB C-18 particulada (150 mm x 0.5 mm i.d) Agilent	Gradiente: F = 10 µL/min	UV de fila de diodos (210-360 nm)	Sección 5.3			
				Triazinas:					
	c-SWNTs-TRB-5-s	c-MWNTs-TRB-5-s	c-SWNTs-TRB-35-s	c-MWNTs-TRB-35-s	t = 0 MeCN:H ₂ O (70:30)				
					PAHs:				
	c-SWNTs-TRB-5-s	c-MWNTs-TRB-35-s	c-SWNTs-TRB-35-s	c-MWNTs-TRB-35-s	t = 0 MeCN:H ₂ O (70:30)				
					t = 10 MeCN:H ₂ O (90:10)				
	c-SWNTs-TRB-5-s	c-MWNTs-TRB-35-s	c-SWNTs-TRB-35-s	c-MWNTs-TRB-35-s	t = 24 MeCN:H ₂ O (100:0)				
					t = 27 MeCN:H ₂ O (70:30)				
	Anfemita- minas	Agua	-	Lichrospher 100 RP18 (125 mm x 4 mm d.i.).	Clorpirifos y piretroides				Sección 6.2
					t = 0 MeCN:H ₂ O (70:30)				
t = 8 MeCN:H ₂ O (100:0)									
t = 18 MeCN:H ₂ O (70:30)									
Anfemita- minas	Agua	-	Lichrospher 100 RP18 (125 mm x 4 mm d.i.).	Gradiente: F = 10 µL/min		Sección 6.2			
				t = 0 MeCN:H ₂ O (60:40)					
				t = 2.5 MeCN:H ₂ O(50:50)					
				t = 18 MeCN:H ₂ O (70:30)					
				t = 10 MeCN:H ₂ O (70:30) t = 14 MeCN:H ₂ O (100:0)					

a: 95% polidimetilsiloxano, 5% difenilo (40 mm x 0.32 i.d), b: 65% polidimetilsiloxano, 35% difenilo (40 mm x 0.32 i.d)^a

La síntesis de columnas capilares para IT-SPME se llevó a cabo siguiendo los procedimientos que se describen a continuación.

Funcionalización de los CNTs

Se pesaron 0.025g c-SWNTs y se disolvieron en 5 mL de H₂SO₄:HNO₃ (3:1) con el ultrasonidos durante 90 minutos (50 W, 60 Hz). Posteriormente, se diluyeron en agua (500 mL) y se filtraron con un filtro de acetato celulosa de 0.45 µm. Finalmente se lavaron con 1M HCl y se secaron a temperatura ambiente. En el caso de c-MWNTs se pesaron 0.02g c-MWNTs y se disolvieron en 80 mL de H₂SO₄:HNO₃ (3:1) con el ultrasonidos durante 5 horas (50 W, 60 Hz). Después, se diluyeron en agua (1500 mL), se filtraron, se lavaron y se dejaron secar siguiendo el mismo procedimiento.

Inmovilización de CNTs en las columnas capilares de PDMS (TRB-5 y TRB-35)

En primer lugar se procedió a la activación del PDMS haciendo pasar NaOH (2M) por el capilar y se dejó actuar 24 h. A continuación el capilar se lavó con agua nanopure (5 min). Una vez lavado se hizo pasar 2% (v/v) APTES en acetona (15 min), agua (5 min) y metanol (5 min) para eliminar el exceso de APTES. El siguiente paso fue pasar una disolución de glutaraldehído 10% (v/v) preparada en tampón borato 50 mM, pH =9.0 durante 10 min. Entonces, se dispersaron los nanotubos de carbono (5 mg/mL) en una disolución (4.5mL) dimetilformaldeído y 1.3-diciclohexilcarbonidimida (0.5mg) y se pasó a través del capilar durante 30 min. Finalmente, el capilar se lavó con agua para eliminar los c-CNTs que no hubieran reaccionado y quedado retenidos en la pared capilar de PDMS

3.5.3 Obtención de la respuesta de los sensores poliméricos

Las condiciones experimentales empleadas para la obtención de la respuesta de los sensores poliméricos se muestra en la **Tabla 18**.

Tabla 18. Condiciones experimentales empleadas para la obtención de la respuesta de los sensores poliméricos

Analito	Intervalo de concentraciones	Matriz	Vol. muestra	Sensor	Reactivos	Respuesta a en el soporte	Respuesta en disolución	Detección	Sección
Aminas en aire: MeNH ₂ , Me ₂ NH, EtNH ₂ , Et ₂ NH, Me ₃ N, NH ₃	Aminas primarias y secundarias: 5-50 mg/m ³ Amina terciaria: 1-10 g/m ³	Aire	(2L) ^a	<ul style="list-style-type: none"> • PDMS-NQS • PDMS-ETH^T4001 • PDMS-TEOS-NQS 	NaOH (50 µL, 10 M) ^b	x	-	Reflectancia difusa (λ=525 nm)	Sección 6.1
Anfetaminas: AMP, MAMP, MDMA y MDA	MDMA, MDA: 2.5-25 mg/L AMP, MAMP: 2.5-50 mg/L	Agua	1 mL	<ul style="list-style-type: none"> • PDMS-NQS • PDMS-TEOS-NQS-SiO₂NPs 	Tampón carbonato (8 %, w/v, pH=11)	x	x	Reflectancia difusa (λ=525 nm) Absorbancia (λ=525 nm)	Sección 6.2

Amonio (NH ₄ ⁺)	0.7-10 mg/L	Agua	0.5 mL	<ul style="list-style-type: none"> • PDMS-timol 	NaOH (5 µL, al 1.25%), nitroprusiato (20 µL, 0.1M) y tampón carbonato (40µL,0.05M)	-	x	Absorbancia (λ=565 nm)	Sección 6.3
				<ul style="list-style-type: none"> • PDMS-timol/NaOH 	nitroprusiato (20 µL, 0.1M) y tampón carbonato (40µL, 0.05M)				
				<ul style="list-style-type: none"> • PDMS-timol/nitroprusiato 	NaOH (5 µL, al 1.25%), tampón carbonato (40µL, 0.05M)				
Fosfato inorgánico	0.5-5 mg/L	Agua	2 mL	<ul style="list-style-type: none"> • Zeína-glicerol-ALP 	Tampón Tris-HCl (100 mM, pH=9) y OMFP (5µL, 0.48 mM)	-	x	Florescencia (λ=513 nm)	Sección 7

a: ver Figura 26, b: necesario para volatilizar la amina en disolución

3.6 MUESTRAS

En esta Tesis se han analizado muestras de procedencia diversa, biológicas, ambientales y clínicas.

Muestras biológicas: Muestras de orina humana

Las muestras de orina utilizadas en el **Capítulo 4** fueron de voluntarios sanos, tanto hombres como mujeres en edades comprendidas entre los 22-30 años y en el caso de los voluntarios enfermos de cáncer, las cinco muestras fueron de hombres en edades comprendidas entre los 40-70 años. Todas las muestras fueron tratadas por SPE. Las muestras se almacenaron en nevera un máximo de 2 días.

Las muestras de orina utilizadas en el **Capítulo 5: Sección 5.2** se tomaron utilizando material de vidrio en todo momento y guardadas en botellas ámbar un máximo de 2 días a 4°C. Se tomaron muestras tanto de mujeres como hombres de edades comprendidas entre los 20-80 años. Estas muestras fueron previamente acidificadas y directamente procesadas en el sistema IT-SPME-CapLC. Se procesaron volúmenes de 4 mL. Cabe destacar que se evitó en todo momento el contacto con material de plástico (viales de plástico, jeringas de plástico, tapones de plástico y guantes).

Muestras ambientales: muestras de aguas (río, lago, mar), PM₁₀ y muestras de lavado de tuberías de plástico

En el **Capítulo 5: Sección 5.1** se analizaron muestras de agua de mar y de transición tomadas en diferentes puntos de la Comunidad Valenciana y muestras de lavado obtenidas al recircular agua a través de tuberías de plástico. Las muestras de aguas de mar y de transición se guardaron en botellas de ámbar a 4 °C y las muestras de lavado fueron utilizadas en el momento. Las muestras se acidificaron, evitando en todo momento el contacto con el material de plástico. Finalmente, se procesaron 4 mL en el sistema IT-SPME-CapLC.

En el **Capítulo 6: Sección 6.3** se analizaron muestras de aguas (ríos y aguas de lavado) de la región de Valencia y también muestras de extractos acuosos de PM₁₀. Las muestras de agua de río y de lavado se guardaron a 4°C en botellas ámbar hasta su análisis. Las muestras de PM₁₀ fueron recogidas en un periodo de 24 h en una zona industrial de Coruña-Galicia por EN-12341 con un filtro de fibra de cuazo de 420 cm². Una fracción de 24 cm del filtro se introdujo en el ultrasonidos con 10 mL de agua nanopure y finalmente dos porciones del extracto fueron diluidas en 50 mL.

En el **Capítulo 7** se utilizan muestras de agua de grifo, agua de mar (Playa de la Caracola) agua de río (Río Júcar) y agua de transición (Lago de Cullera), tomadas en

diferentes puntos de la Comunidad Valenciana. Las muestras se guardaron en botellas ámbar en nevera (4°C). Para su uso se prepararon con tampón Tris HCl ((100 mM, pH 9.0) utilizando un volumen de 2 mL en cada ensayo.

Muestras clínicas: Muestras de droga (éxtasis)

En primer lugar, las tabletas ilegales de éxtasis se pulverizaron y homogenizaron. Estas muestras se midieron directamente con el sensor (**Capítulo 6: Sección 6.2**). El análisis de estas muestras por cromatografía líquida, se llevó a cabo pesando 6.7 g del polvo obtenido a partir de los comprimidos y disolviendo en 50 mL de agua con ultrasonidos. La solución resultante se diluyó con 250 mL con agua. Finalmente, 20 µl de esta solución se inyectaron en el cromatógrafo. Sin embargo, para el análisis por el sensor una cantidad de muestra en polvo obtenido de las tabletas fue simplemente transferida a un vial de con los dispositivos. La muestra se procesó por los dos métodos de derivatización en condiciones mencionadas y se ensayó por triplicado.

Muestras en aire: pescado en descomposición

En el **Capítulo 6: Sección 6.1** se utilizó una la muestra de pescado (merluza congelada) que se introdujo en una bolsa de plástico hermética de dimensiones (17 x 22 cm) durante 5 y 6 días a temperatura ambiente.

CAPÍTULO 4.
LAS AuNPs COMO SENSOR PLASMÓNICO

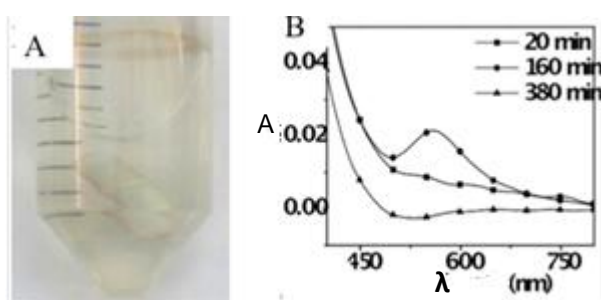
4.1 SENSOR PLASMÓNICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPERMINA EN ORINA HUMANA

En este Capítulo se comentaran los detalles para el desarrollado de un sensor plasmónico de SPN en muestras de orina de voluntarios sanos y enfermos de cáncer. El ensayo está basado en la agregación de AuNPs controlada por dos factores: 1) la naturaleza de las AuNPs, sintetizadas de forma que no poseen ligandos orgánicos que las estabilicen, con lo que están más en contacto con su entorno y 2) las características específicas de la espermina, la cual a través de los 4 grupos amino es capaz de establecer múltiples interacciones consigo misma a la vez que con las AuNPs. La interacción de la SPN con las AuNPs provoca su agregación, la disolución cambia de color rosa a azul al incrementar la concentración de SPN. (Ver [18]).

4.1.1 Síntesis de AuNPs

La síntesis de AuNPs esféricas y monodispersas se llevó a cabo mediante un método térmico a partir de una disolución de HAuCl_4 y H_2O_2 y ablación Láser (Ver Sección 3.3).

Al principio del proceso hay un tiempo largo de inducción donde no se observa banda del plasmón, y durante el que ocurre la reducción del Au (III) a Au(0). A partir de este momento las AuNPs comienzan a formarse. Este hecho, se ha comprobado preparando una disolución de HAuCl_4 y H_2O_2 en completa oscuridad y en agitación. Sin ser la disolución irradiada con el láser, se observa por UV, pasado cierto tiempo, una pequeña Banda de Plasmón. Con el paso del tiempo dicha banda desaparece y comienza a observarse Au(0) adherido a las paredes del recipiente (**Figura 29A y 29B**). Se tomaron fotografías de imágenes de TEM donde se muestra la presencia de AuNPs con una gran dispersión de tamaños (**Figura 29C y 29D**).



Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico

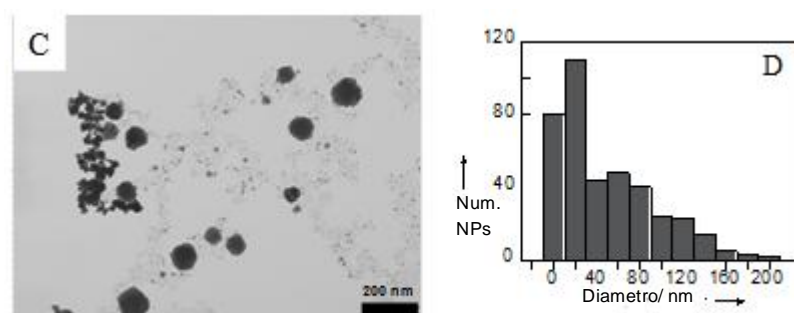


Figura 29. A) Fotografía de la disolución de AuNPs en oscuridad. B) Espectro absorbancia AuNPs. C) Micrografía de TEM de la síntesis en ausencia de luz y D) Histograma de distribución de tamaños de AuNPs.

Una vez formadas las AuNPs polidispersas mediante el proceso térmico descrito. El láser (**Figura 30A**) provoca la ablación de las AuNP formadas evitando su crecimiento y dando lugar a distribuciones de tamaño de AuNPs de 15-30 nm (**Figura 30B**) [198-200]. Una vez formadas las AuNPs se diluyen con agua (2:1) ($H_2O:AuNPs$), se elimina el exceso de peróxido de hidrógeno con el fotoreactor y se comprueba con las tiras reactivas que la cantidad de H_2O_2 es inferior a 0.5mg/mL (Ver **Tabla 19**).

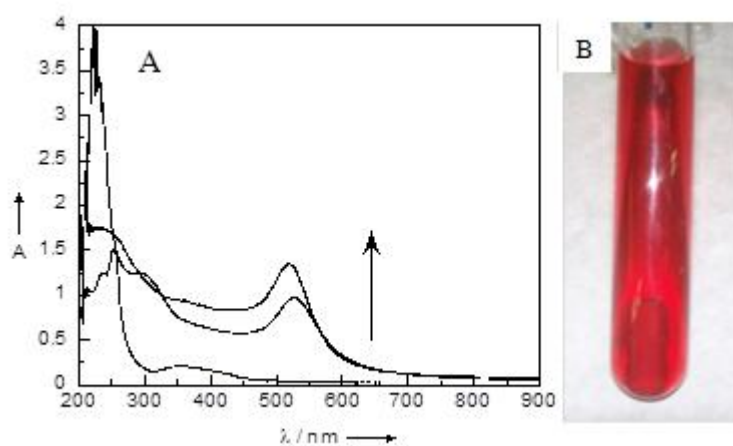


Figura 30. A) Espectro UV-Vis registrado para la síntesis de AuNPs, B) Fotografía de la disolución de AuNPs obtenidas.

Consideraciones para las síntesis de AuNPs:

- i) Frecuencia del láser a 10 Hz y potencia entre los 10 y los 20 mJ.

ii) El volumen total de disolución irradiada queda condicionado a un recipiente que permita una buena irradiación en todas las partes de la disolución como un tubo de vidrio, así el volumen utilizado fue 20 mL.

iii) Las cantidades adecuadas de H_2O_2 son de 0.5-1.2 mM. Una vez obtenidas las AuNPs se diluían tres veces (con cuidado; casi gota a gota) nada más sacarlas del láser.

Una vez formadas las AuNPs, se evalúa si queda agua oxigenada con las tiras reactivas (Merckoquant®), que pueden detectar cantidades de hasta 0.5 mg/mL

La eliminación de H_2O_2 supuso el proceso más crítico. Después de realizar varios intentos, se observó que cuando el cociente entre el valor de la absorbancia en el máximo de la banda de plasmón (520 nm) y el valor de absorbancia a 240 nm correspondiente a la presencia de H_2O_2 es de 1.5 a 1.9, la cantidad de H_2O_2 en exceso es pequeña y no interfiere en la estabilidad de las AuNPs ni en ensayos posteriores (en la **Tabla 19** se presentan estos valores para las disoluciones de AuNPs utilizadas para los ensayos). Si este valor es superior, la eliminación del H_2O_2 debe hacerse por tratamiento con MnO_2 y posterior filtrado.

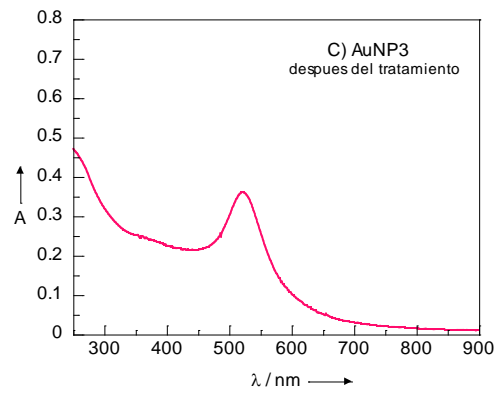
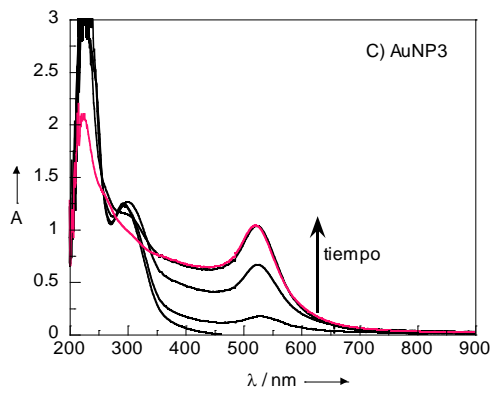
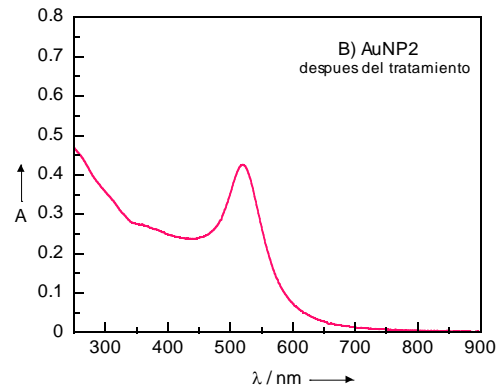
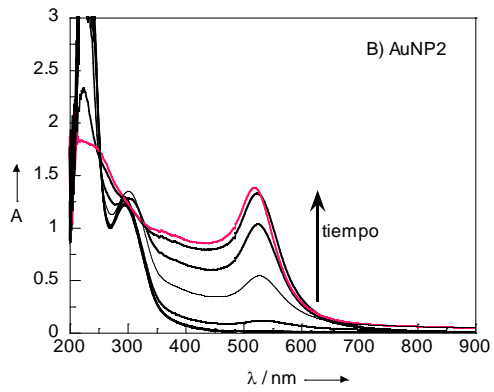
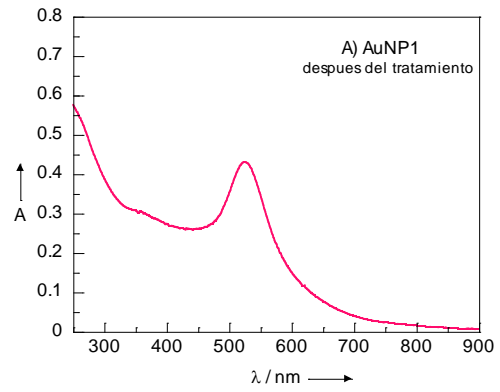
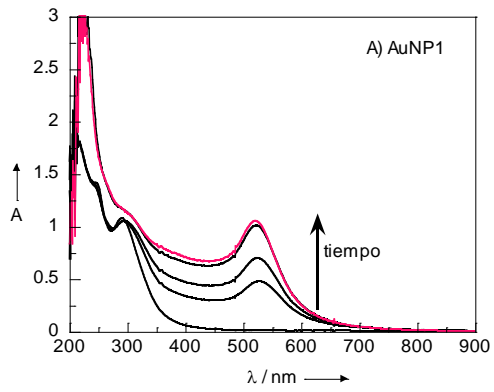
Por lo tanto, para disminuir la concentración de H_2O_2 , las AuNPs se introducen en el fotorreactor con irradiación superior y rotación durante 30-60 minutos. La eliminación con irradiación se basa en la capacidad de las AuNPs para dar lugar a la reacción de Fenton que origina radicales hidroxilo ($HO\cdot$) y descomposición del agua oxigenada [201, 202]. Finalmente, se comprueba con tiras reactivas Merckoquant que la cantidad de H_2O_2 es inferior a 0.5 mg/L. En las **Tablas 19 y 20, Figuras 31 y 32** muestran las condiciones de síntesis elegidas para las cuatro síntesis de AuNPs, sus espectros UV-Vis y las micrografías de TEM.

Tabla 19. Condiciones de síntesis para las AuNPs utilizadas en los ensayos.

AuNPs	H_2O_2 (mM)	Ablación con Laser Frecuencia, Energía, Tiempo	Tratamiento posterior a la síntesis
AuNP1	0.77	10 Hz, 16-19 mJ, 270 min.	Dilución ^[a] y fotorreactor ^[b] (20 min)
AuNP2	0.92	10 Hz, 16-19 mJ, 90 min.	Dilución ^[a] , MnO_2 (25 mg) y decantación
AuNP3	0.63	10 Hz, 16-19 mJ, 250 min.	Dilución ^[a]
AuNP4	1.1	10 Hz, 16-19 mJ, 210 min	Dilución ^[a] y fotorreactor ^[b] (60 min)

[a] La dilución de AuNPs fue (2:1 H_2O :AuNPs), [b] 14 lámparas- UVA en el fotorreactor LZC-L4 V.

Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico



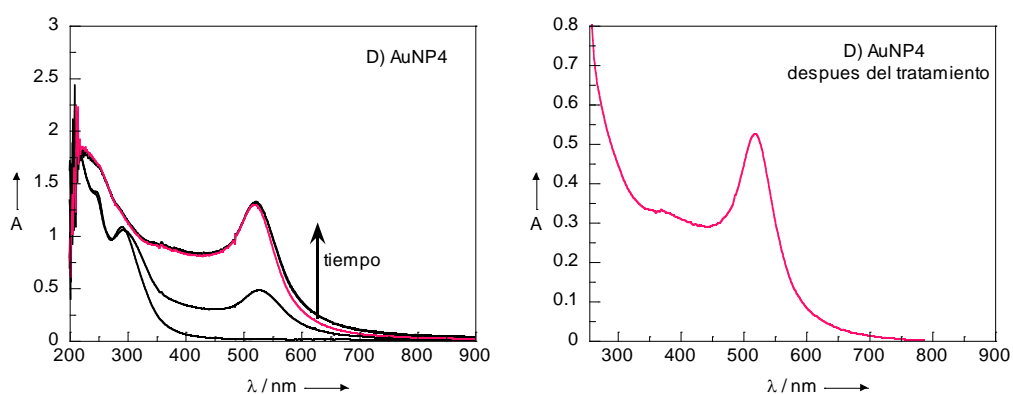
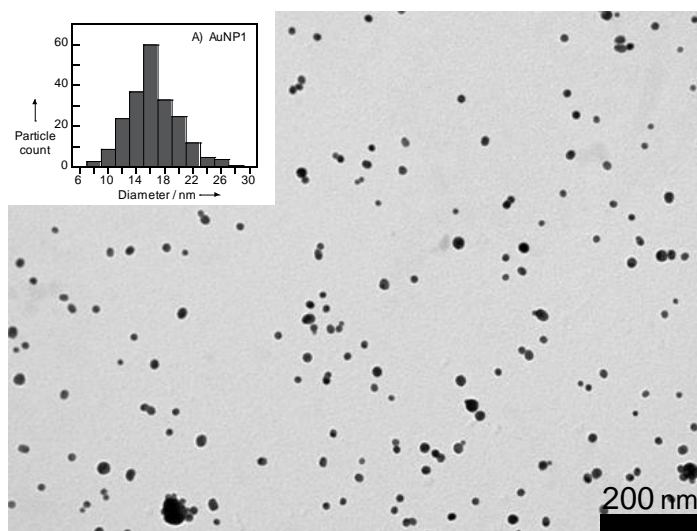


Figura 31. Espectros de absorción para A) AuNP1 B) AuNP2, C) AuNP3 y D) AuNP4. Gráfico obtenido durante la síntesis de AuNPs (izquierda) y después del tratamiento posterior a la síntesis (derecha).

Tabla 20. Control por UV del H₂O₂ en la síntesis de AuNPs.

	Inicio de la síntesis		Final de la síntesis		
	A (λ 240) <i>Stock 3</i>	[H ₂ O ₂] _{en} disolución (nM)	A _{240nm}	A _{520nm}	A _{H2O2} /A _{AuNP}
AuNP1	0.28	0.77	2.01	1.05	1.90
AuNP2	0.33	0.92	1.69	1.27	1.33
AuNP3	0.23	0.63	1.65	1.04	1.59
AuNP4	0.43	1.1	1.81	1.26	1.43



Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico

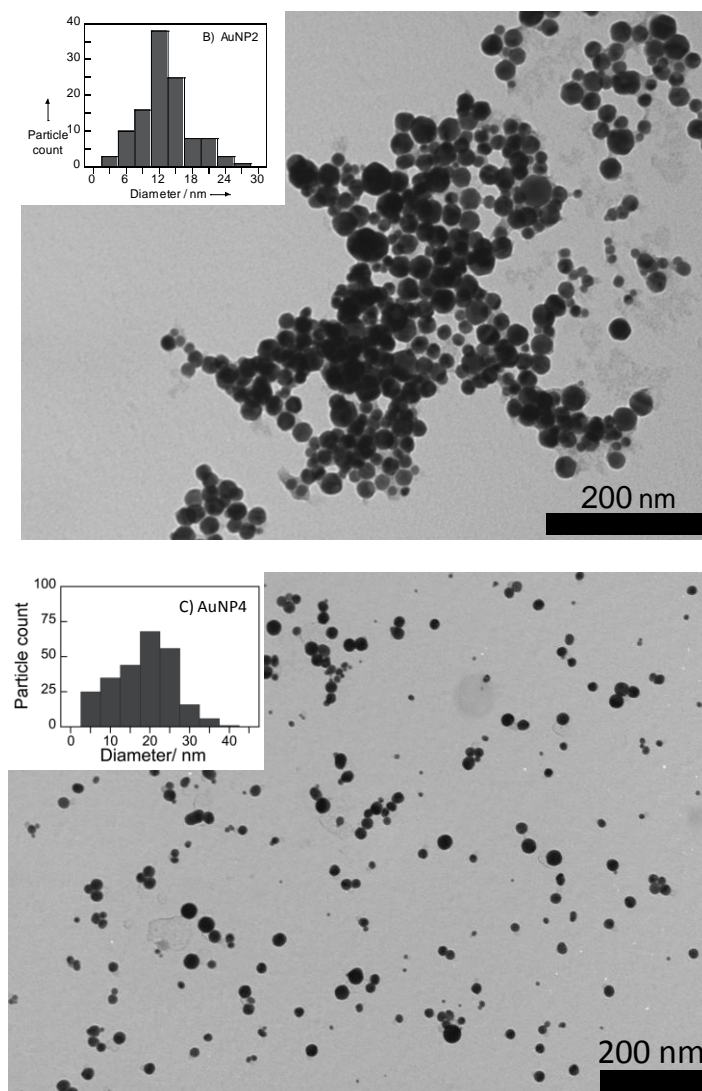


Figura 32. Imágenes de TEM y histograma donde se muestra la distribución de tamaños A) AuNP1, B) AuNP2, C) AuNP4.

4.1.2 Desarrollo del ensayo.

Para evaluar la respuesta colorimétrica de las AuNPs frente a la presencia de poliaminas en patrones acuosos se prepararon cuatro experimentos independientes en los que, se añadió a una disolución de AuNPs (1 mL, $A=0.36$) volúmenes crecientes entre 10-100 μ L de disolución de putrescina (PT), cadaverina (CD), espermidina (SPD) y

espermina (SPN), respectivamente. Los espectros se midieron a los 20 segundos de la adición de poliaminas (Ver **Sección 3.5.1**). El objetivo fue observar si la adición de poliaminas provocaba la agregación de las AuNPs. El proceso se siguió por espectroscopía UV y por inspección visual del cambio de color de la disolución, de tonalidades rosa para disoluciones de AuNPs no agregadas a tonalidades azul-moradas para disoluciones de AuNPs agregadas. En la **Figura 33** se muestran las variaciones producidas sobre la banda de superficie plasmónica (SPB) de AuNPs centrada a los 520-525 nm al añadir las diferentes poliaminas. Se observa cómo se producen cambios selectivos que dependen tanto, de la poliamina como de su concentración.

En general, a niveles μM , todas las poliaminas, excepto la putrescina, provocan un desplazamiento hacia longitudes de onda mayores. Sin embargo, resulta interesante comprobar que solo la SPN, que tiene una cadena más larga y mayor número de grupos amino de todas las poliaminas evaluadas, provoca un desplazamiento de la banda plasmónica bastante pronunciado a concentraciones nM.

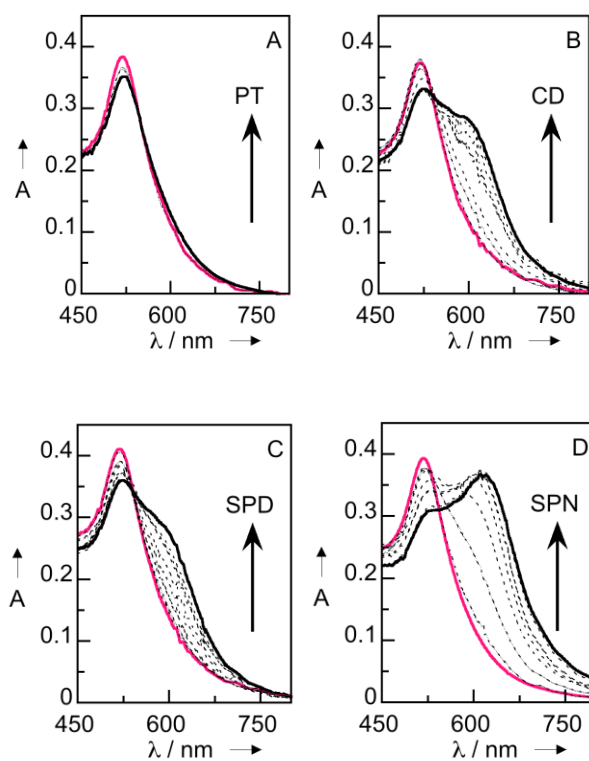


Figura 33. Espectros de absorbancia de las AuNPs registrados a los 20 segundos después de la adición de: A) putrescina (3-5 μM), B) cadaverina (2-5 μM), C) espermidina (0.1-1.5 μM) y D) espermina (70-750 nM). En **rosa** aparece el espectro para las AuNPs mientras que en **negro** aparece el espectro observado para la adición de poliamina sobre las AuNPs.

Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico

Todas las PAs están protonadas debido al HCl presente en la disolución coloidal de AuNPs. Estudios de Raman en PT, SPD y SPN han observado diferencias claras en las interacciones $N^+-H\cdots Cl^-$ de dihidrocloruro de putrescina y de dihidrocloruro de SPN. Estas diferencias son consecuencia tanto de la longitud de la cadena como del número de grupos imino/amino en el comportamiento conformacional de las poliaminas [203]. Además, estudios de Raman de estas poliaminas y del oligonucleótido guanina-citosina han demostrado la gran capacidad que posee la SPN para inducir agregación frente a la SPD; la SPN agrega el oligonucleótido de forma similar que la SPD pero en concentraciones tres veces menores [204].

La clave para explicar a nivel molecular la agregación observada por la SPN reside, principalmente, en dos factores: i) la tendencia de los grupos amino por situarse en la superficie de la AuNPs con el fin de actuar como estabilizadores electrostáticos de las AuNPs y ii) la capacidad de formar múltiples interacciones intermoleculares (enlaces de hidrógeno, van-de-Waals) entre poliaminas, ambos factores contribuyen a la estabilización del agregado. Sin embargo, la extraordinaria selectividad por la SPN, no puede explicarse solamente por interacciones electrostáticas, como se ha mencionado anteriormente las características estructurales específicas también juegan un papel muy importante (**Figura 34**).

Estos resultados indican que las AuNPs pueden actuar como sensores plasmónicos específicos de SPN en orina considerando que el contenido de SPN en orina [179-181] está dentro del rango detectable por las AuNPs (**Figura 33D**).

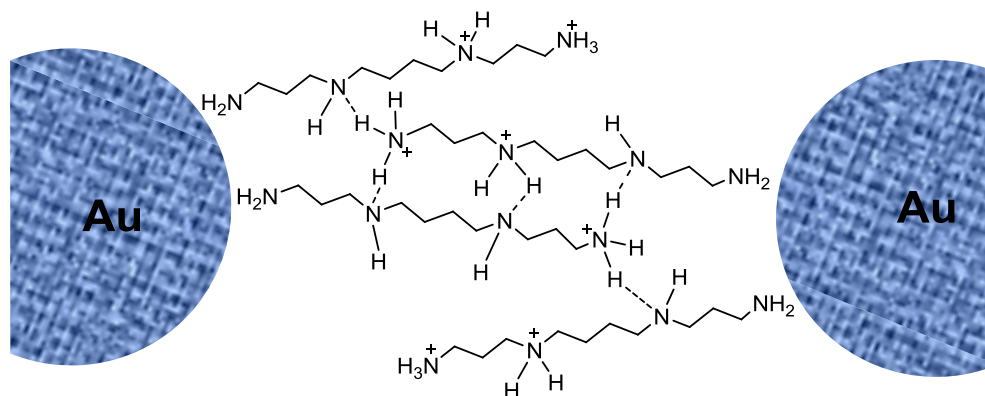


Figura 34. Esquema de la agregación de las AuNPs inducida por la SPN.

En la **Figura 35** se observa el perfil que describe el comportamiento de las AuNPs frente a la SPN para el mismo experimento realizado en la **Figura 33D**. En ella, se muestra la dependencia de la absorbancia a 610 nm respecto a la concentración de SPN en un rango de 70-750 nM. Cada uno de los puntos, corresponde a la respuesta de

las AuNPs ($A_{\text{plasmón}}=0.36$, 1 mL) a 610 nm a una concentración de SPN determinada (14 μM , 5-55 μL). En la **Figura 35** se muestran además, las fotografías de las disoluciones obtenidas después de cada adición de SPN. Se observa un cambio de color gradual del rosa- rosa oscuro- al violeta y finalmente, a un color violeta azulado lo que demuestra que es posible seguir el proceso también visualmente. La unión de estos puntos describe una curva sigmoideal que plasma el comportamiento de agregación de las AuNPs frente a la SPN. Se diferencian tres etapas: una etapa de iniciación, una etapa intermedia y una etapa final de saturación. La etapa intermedia comprende el intervalo lineal, el cual se eligió como intervalo de trabajo ya que es el intervalo dinámico de concentraciones donde es posible la cuantificación mediante de regresión lineal.

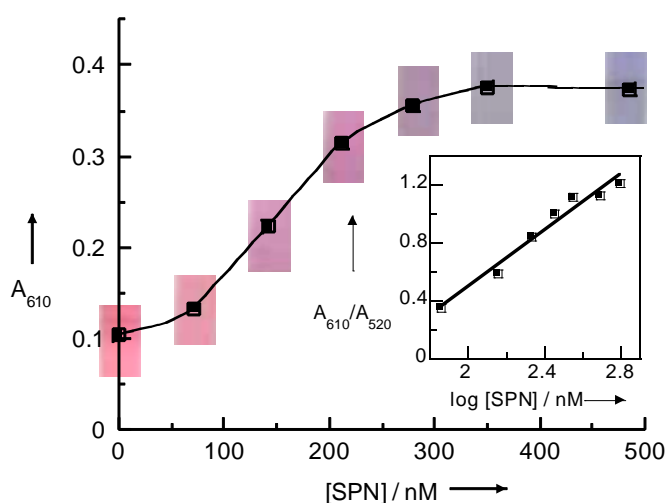


Figura 35. Absorbancia a 610 nm 20 segundos después de cada adición de SPN (70-750 nM). Insertado aparece la recta: A_{610}/A_{520} vs $\log [SPN]$ (nM).

Para estudiar la agregación de las AuNPs en orina se adicionaron volúmenes aditivos de orina (10-100 μL) a las AuNPs (1 mL) y se tomaron medidas a los 20 segundos de la adición. Sorprendentemente, no se observaron cambios significativos (**Figura 36A**). En un segundo experimento se adicionaron volúmenes aditivos de orina a la cual se le había añadido SPN (orina fortificada con SPN (14 μM , 10-100 μL)), sobre la disolución de AuNPs (1 mL) y se tomaron medidas a los 20 segundos después de cada adición (**Figura 36B**). Se observó un cambio de color de la disolución del rosa al morado correspondiente a un ensanchamiento de la Banda de Plasmón. A las 6 horas la disolución de AuNPs había precipitado y la disolución permanecía incolora.

Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico

Con el fin de eliminar posibles interferentes y observar respuestas más claras y sensibles, se procedió a tratar la muestra de orina extracción por fase sólida. La extracción en fase sólida (solid phase extraction; SPE), es un método rápido y sencillo [205]. De esta manera para la extracción de las poliaminas de la orina, se utilizaron cartuchos de C-18 (100 mg) y fueron acondicionados con metanol (1 mL) y tampón carbonato (1 mL, 0.5M) a pH=12. Se hizo pasar 1 mL de orina y orina fortificada (2.9 µg/mL) y se lavó con carbonato (2 mL), acetonitrilo (1 mL) y agua nanopure (2 mL). Finalmente, se eluyó con ácido acético al 5% (dos fracciones de 0.25 mL). La eficiencia de la extracción fue evaluada por derivatización con o-ftaldialdeido-N-acetilcisteína (OPA:NAC).

Con esta orina tratada, se procedió de forma análoga a los experimentos anteriores. Se adicionaron volúmenes crecientes de orina tratada (5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 µL) a una disolución de AuNPs (1 mL, $A_{\text{plasmón}} = 0.36$) y se registró el espectro a los 20 segundos después de cada adición. El espectro de absorción de la **Figura 36C** muestra como la banda de plasmón a 520 nm decrece mientras que la nueva banda resultante de la agregación de las AuNPs a 610 nm aumenta con cada adición. La **Figura 36C** muestra que la etapa de SPE redujo el efecto matriz, ya que la respuesta obtenida, después de procesar las muestras de orina, es similar a la respuesta de las AuNPs frente a la espermina en disolución acuosa (ver **Figuras 36C y 36D**). Como en el caso de patrones acuosos, el sensor propuesto presenta una elevada sensibilidad para la detección de SPN en muestras de orina. Además, la concentración de SPN en muestras de orina se encuentra a niveles de nM, las cuales están dentro del intervalo útil de concentraciones del sensor propuesto.

Para demostrar que la agregación de las AuNPs en la **Figura 36C** es debida a la SPN, se realizó un experimento de control. Se tomaron dos alíquotas de AuNPs (1 mL). A una de ellas se le adicionó orina tratada mediante SPE (5 µL) y a la otra se le adicionó orina fortificada con espermina (350 nM) y posteriormente se trató mediante SPE (5 µL). Se midieron ambas respuestas a los 20 segundos de la adición. La **Figura 36D** muestra los espectros solapados de ambas disoluciones donde se observa que mientras las AuNPs con orina mostraban un ligero ensanchamiento, las AuNPs con orina fortificada mostraban un aumento notable de la banda a 610 nm. Además, la agregación evoluciona con el tiempo desplazándose hacia longitudes de onda mayores (efecto observado también en el caso de la adición de orina no tratada a altas concentraciones de espermina).

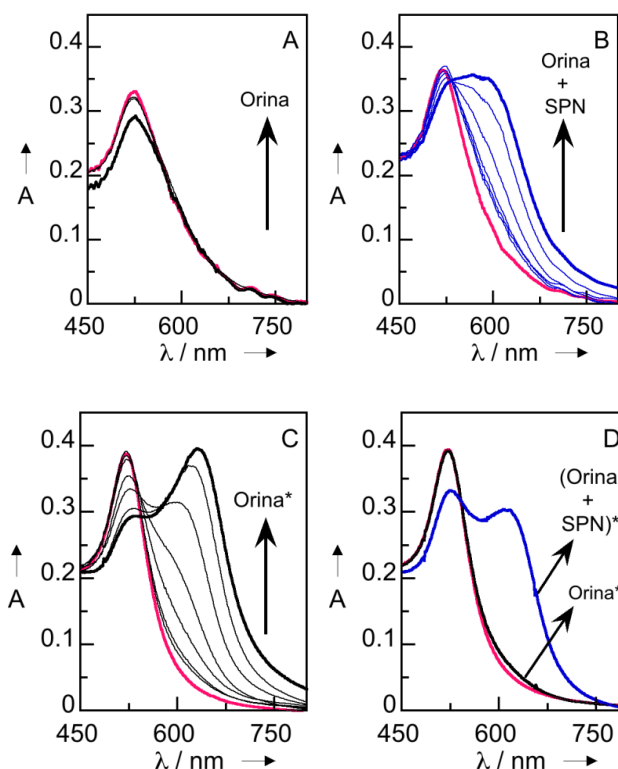


Figura 36. Espectro de absorción de AuNPs (1mL) tras la adición de: A) orina no tratada (10-100 μ L), B) orina fortificada con SPN no tratada (142, 281, 418, 552, 625, 750 nM), C) orina tratada por SPE (5, 10, 15, 20, 30, 40 μ L) y D) orina fortificada con espermina tratada por SPE (350 nM). En **rosa** espectro de AuNPs, en **negro** orina adicionada a AuNPs y en **azul** orina fortificada adicionada a AuNPs. (*) Orina tratada por SPE.

Este mismo procedimiento, se llevo a cabo, con muestras de voluntarios enfermos de cáncer (orina patológica).

La **Figura 37F-G**, muestra los espectros obtenidos en las mismas condiciones de tratamiento por SPE y adición utilizando orinas patológicas. Los resultados obtenidos se compararon con los resultados obtenidos con muestras de orina de voluntarios sanos tratadas también por SPE (**Figura 37A-E**). Como puede observarse, el comportamiento de las AuNPs no es el mismo cuando se trata de orina de voluntarios sanos que cuando se trata de orina patológica. La primera adición de orina patológica provoca la agregación de las AuNPs. Adiciones posteriores, muestran estados de agregación altos en los cuales se observa una disminución de la banda del plasmon, posiblemente ocasionada por la precipitación de las AuNPs a consecuencia de su rápida agregación.

Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico

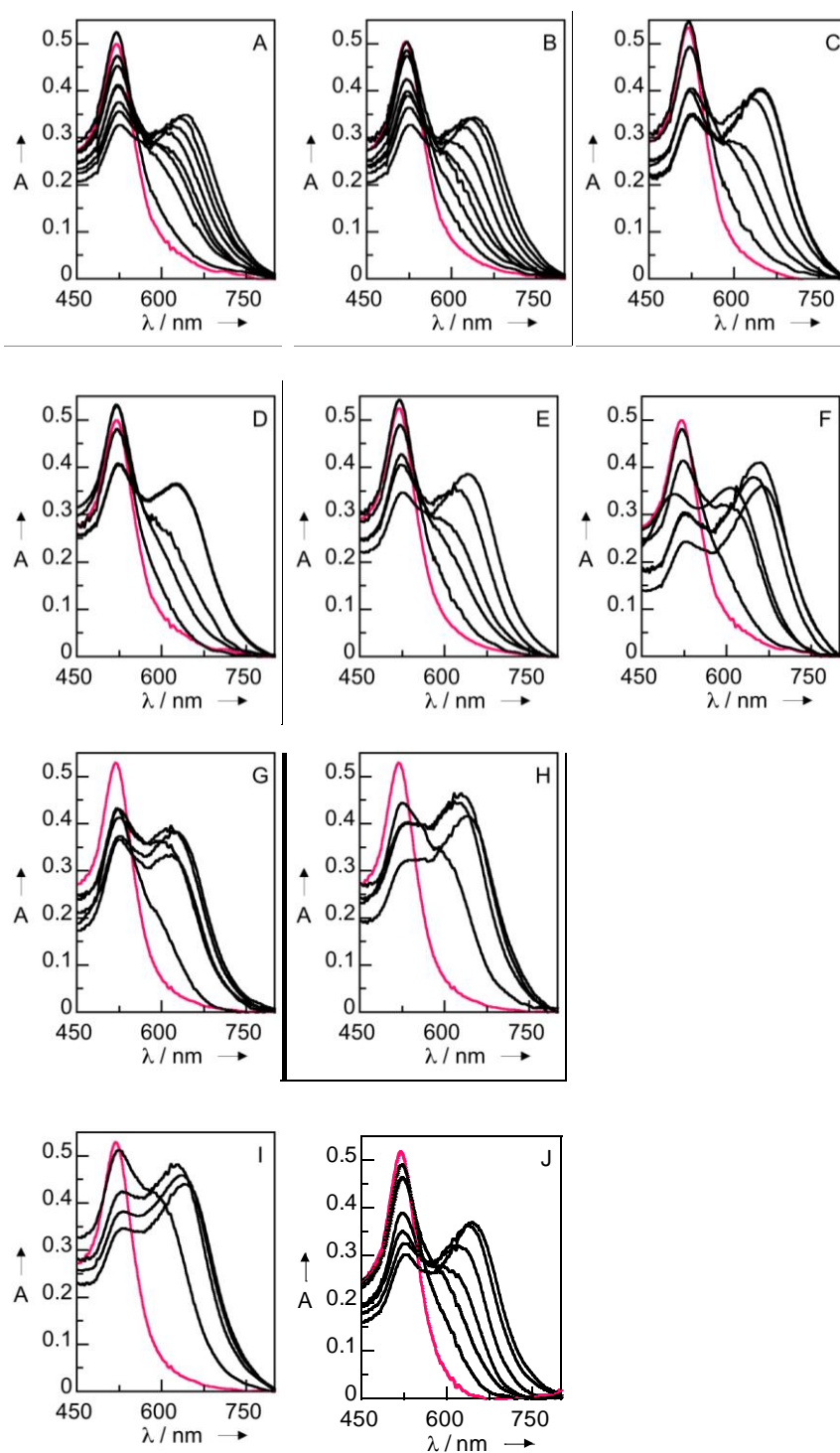


Figura 37. Espectro de absorción de las AuNPs (1mL) para la adición (5-40 μ L) de: orina tratada por SPE de cinco voluntarios sanos (A-E) y F, G, H), orina de cuatro voluntarios

enfermos de cancer, tratada por SPE en las mismas condiciones, (J) orina de un voluntario enfermo de cancer diluida a la mitad y tratada por SPE. Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.

En la **Figura 38** se representan las respuestas obtenidas a partir de experimentos independientes, para un volumen determinado adicionado de orina de voluntarios sanos y orina patológica sobre las AuNPs. El volumen adicionado fue de: A) 5 μL , B) 10 μL y C) 15 μL de orina (en **negro**) y orina patológica (en **verde**) sobre las AuNPs (1mL). Podemos observar, en todos los casos, una mayor agregación cuando se trata de orina patológica.

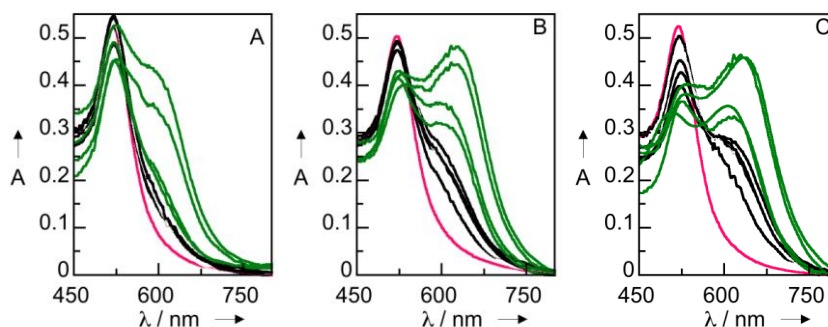


Figura 38. Espectro de absorción de las AuNPs después de la adición de: A) 5 μL , B) 10 μL , C) 15 μL de orina y orina patológica tratada mediante SPE. Para todos los gráficos; en **rosa** AuNPs, en **negro** AuNPs con orina tratada por SPE y en **verde** AuNPs con orina patológica tratada por SPE. Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.

4.1.3 Parámetros analíticos

Se estudió si existía efecto matriz comparando las respuestas de las AuNPs frente a patrones preparados en agua con patrones preparados en orina. Los resultados mostraron que el **rango dinámico de detección de SPN** para las AuNPs era diferente en los patrones de SPN preparados en agua que en los patrones preparados en orina. Dicho rango es menor cuando los patrones son en orina que cuando son preparados en agua, es decir, la respuesta de las AuNPs es mayor en la matriz de orina (**Figura 39**). Este mismo fenómeno se puede observar en ensayos ELISA. El sensor propuesto presenta además, otras analogías con los inmunoensayos, intervalos de trabajo reducidos y que normalmente el tratamiento de la muestra debe adecuarse para cada muestra con el fin de cuantificar los compuestos en estudio [206].

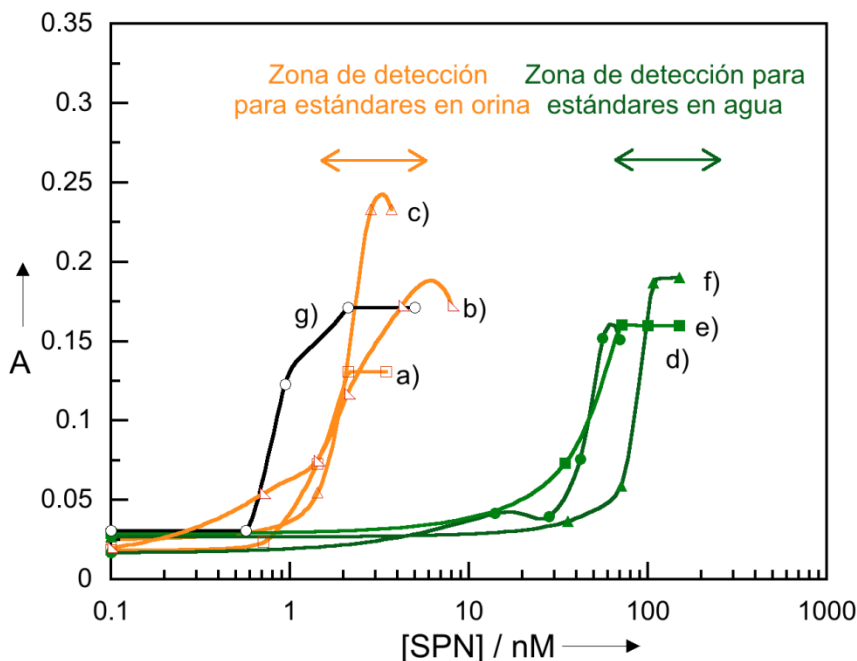


Figura 39. Absorbancia frente a la concentración de SPN añadida para la adición de patrones preparados en agua (en verde: c, d, e), patrones preparados en orina tratada por SPE (en naranja: a, b, c) y patrones preparados en orina patológica diluida a la mitad y tratada por SPE (en negro: g) sobre una disolución de AuNPs. Patrones en orina: a) 0.1, 1.4, 2.8, 4, 5.6, 8 nM, b) 0.1, 1.4, 2.1, 4.23, 8 nM, c) 0.1, 0.71, 1.43, 2.12, 3.46 nM. Patrones en agua: d) 0.1, 14, 28, 42, 56, 70 nM, e) 0.1, 35, 71, 100 nM, f) 0.1, 36, 71, 106, 150 nM. Patrones en orina patológica: g) 0.1, 0.57, 0.94, 2.11, 10 nM.

Debido al efecto matriz, el método de adición estándar (SAM) fue el método utilizado para cuantificar la SPN. Se tomaron volúmenes iguales de orina, y en cada uno de ellos, excepto al blanco, se les añadió cantidades diferentes de SPN (72-143 nM). A continuación, se registraron las respuestas de las AuNPs para cada disolución de orina y orina fortificada con SPN. La recta de calibrado se construyó empleando la respuesta debida a la contribución de la SPN añadida frente a la concentración de SPN añadida. Finalmente, por sustitución del valor de absorbancia registrado para la orina (no fortificada, el blanco) en la recta de calibrado, se calculó la concentración de SPN en la muestra de orina. La **selectividad** de las AuNPs por la SPN se analizó en presencia de los componentes mayoritarios de la orina: urea, ácido úrico y creatinina. Se demostró que tanto la presencia de estos componentes de forma individual, como la mezcla de todos ellos, en las concentraciones típicamente encontradas en orina (mM) no producían agregación (**Figura 40A**). Experimentos que realizamos previamente demostraron que

aminas alifáticas de cadena corta como la metilamina, dimetilamina, etilamina o dietilamina que pueden estar presentes en la orina como productos de degradación de otras aminas más complejas, tampoco producían agregación en las nanopartículas (**Figura 40B**). También se estudió si las condiciones ácidas utilizadas para la extracción mediante SPE de la espermina jugaban un papel relevante en la agregación de las AuNPs. No se observaron cambios significativos en la banda de plasmón cuando el pH de la disolución coloidal de AuNPs se acidificó. Teniendo en cuenta que la síntesis de AuNPs tiene lugar a pH ácido, no era de esperar que la acidificación del medio pudiera provocar agregación y así se demostró en **la Figura 40C**. Finalmente, se estudió la influencia de otros componentes mayoritarios como la albumina y el calcio en la respuesta de las AuNPs. Las **Figura 40D y 40E** muestran que la presencia de calcio o albumina no influye en la respuesta de las AuNPs frente a las SPN. Por tanto, dichos componentes no interfieren en la determinación de SPN.

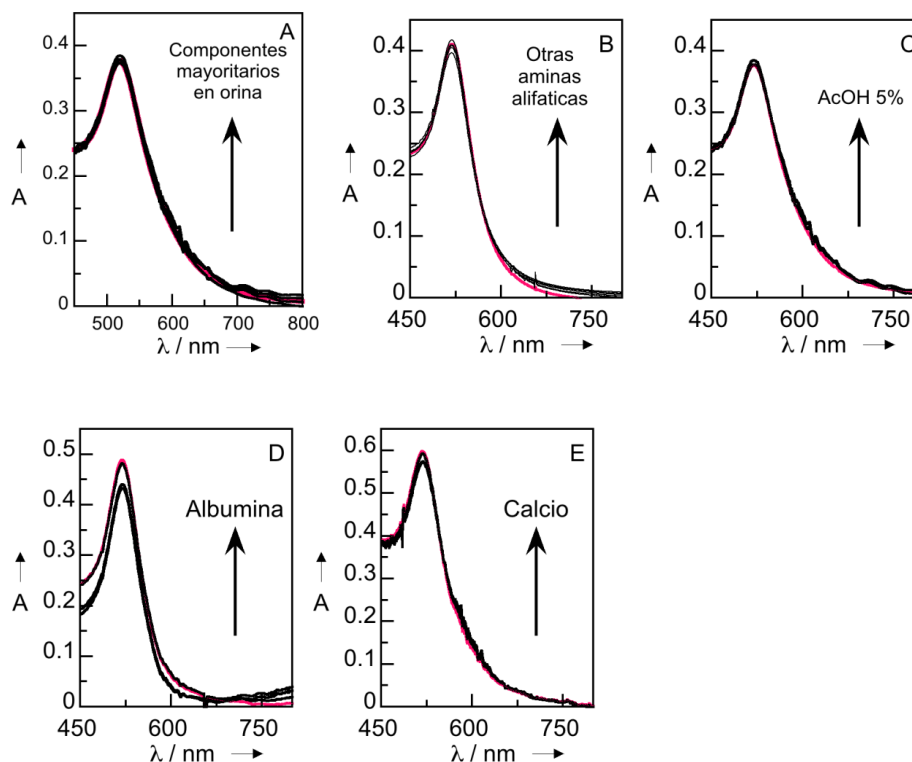


Figura 40. Espectro de absorción de las AuNPs (1mL) para la adición entre 10-100 μ L de: A) Los componentes mayoritarios de la orina; urea (14 mM), ácido úrico (2.4 mM), creatinina (7.1 mM), B) aminas alifáticas (metilamina, dimetilamina, etilamina o dietilamina), C) AcOH al 5%, D) albumina (4.4 mM) y E) Ca_2CO_3 (3.5 mM).

4.1.4 Aplicación en muestras de orina

Diferentes volúmenes de orina tratada fueron adicionados sobre AuNPs (1mL, $A=0.36$). Se comprobó que el valor de la absorbancia de la banda correspondiente a la agregación fuera igual o inferior al valor de la absorbancia correspondiente a las AuNPs no agregadas (520 nm). Bandas de agregación (610-650 nm) con valores de máximos de absorbancia superiores a la banda para las AuNPs (520 nm) son valores que están fuera de nuestro intervalo lineal de cuantificación y que por tanto, no podemos considerar. De esta manera, se eligieron como volúmenes óptimos de trabajo para la orina tratada 5, 10 y 15 μL diferentes volúmenes de orina. **Figuras 41A, 41B y 41C** respectivamente. En cada experimento, se compararon los cambios de absorbancia producidos a los 20 segundos de añadir orina tratada por SPE (**Figura 41** línea **negra**) y orina fortificada a dos concentraciones diferentes (72 nM y 143 nM), posteriormente tratada por SPE (**Figuras 41: líneas azules**) frente a la absorbancia de la banda de plasmón de las AuNPs (**Figura 41: líneas rosa**). Se observó el aumento de la banda de absorbancia a 600-650 nm a medida que aumenta la concentración espermina.

Como se ha puesto de relieve en el apartado anterior el patrón de desarrollo del ensayo con el tiempo puede ayudar a discriminar las muestras de orina de pacientes sanos y cancerosos. Esta es una característica muy importante del ensayo, pero además también puede implementarse para la estimación cuantitativa de espermina en orina.

Para la **estimación de la concentración de SPN** en orina de voluntarios sanos se consideraron las respuestas de las AuNPs a dos concentraciones, 72 nM y 143 nM, para un volumen de 5 μL , mientras que para los experimentos realizados con volúmenes añadidos de 10 y 15 μL solo se consideró la respuesta para la fortificación de la orina de 72 nM ya que a concentraciones mayores, la respuesta se encontraba fuera del intervalo lineal. La concentración de espermina se estimó según el SAM estándar y fue de 171 ± 73 nM ($n=4$), dicho resultado está de acuerdo con los valores de espermina en orina [179-181].

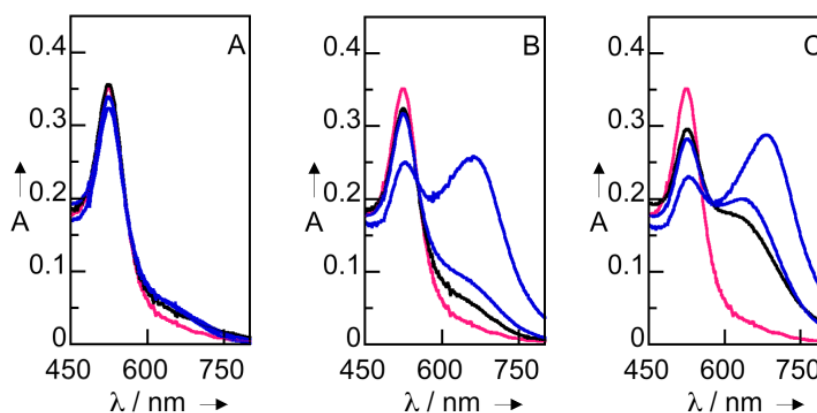


Figura 41. Espectro de absorción de las AuNPs después de la adición de A) 5 μL , B) 10 μL , C) 15 μL de orina y orina fortificada (72 nM y 143 nM) tratada mediante SPE. Para todos los gráficos; en **rosa** AuNPs, en negro AuNPs con orina tratada por SPE y en **azul** AuNPs con orina fortificada con SPN a dos concentraciones (72 nM y 143 nM) y tratada por SPE. Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.

El mismo procedimiento se llevó a cabo en orinas patológicas, teniendo en cuenta, que la agregación de las AuNPs se produce a concentraciones de espermina añadidas inferiores, y que su comportamiento es diferente. Por ello, en primer lugar, las muestras de orina patológica fueron diluidas a la mitad antes del procedimiento de SPE. Con ello, la concentración de SPN en la muestra se encontraba dentro del intervalo lineal. Además, la dilución contribuyó a disminuir el efecto matriz con lo que finalmente los resultados fueron tratados de igual manera que en el caso de la orina de voluntarios sanos teniendo en cuenta el factor de dilución. Así, volúmenes de 5 μL , 10 μL y 15 μL de orina y orina fortificada en (36 nM y 72 nM) fueron adicionados de manera independiente a las AuNPs (**Figura 42**). La concentración de espermina en orina patológica se estimó a partir de los valores obtenidos para la adición de 10 μL fortificada en 36 y 72 nM y 15 μL fortificada en 36 nM según el SAM y fue 225 ± 50 nM ($n=5$).

Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico

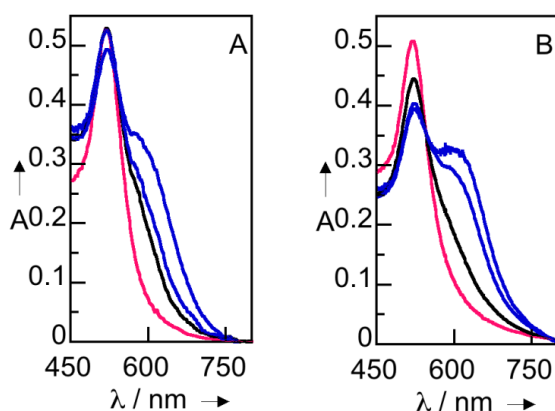


Figura 42. Espectro de absorción de las AuNPs después de la adición de A) 10 μ L, B) 15 μ L, de orina patológica y orina patológica fortificada (36 nM y 72 nM) diluida a la mitad con agua y tratada mediante SPE. Para todos los gráficos; en **rosa** AuNPs, en negro AuNPs con orina patológica, en **azul** AuNPs con orina patológica fortificada con SPN a dos concentraciones (36 nM y 72 nM). Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.

La **Figura 43** muestra las imágenes de TEM para las AuNPs (**Figura 43A**) y las AuNPs (**Figura 43B**) después de la adición de 280 nM de SPN. Es evidente que la adición de SPN contribuye a la agregación de las AuNPs.

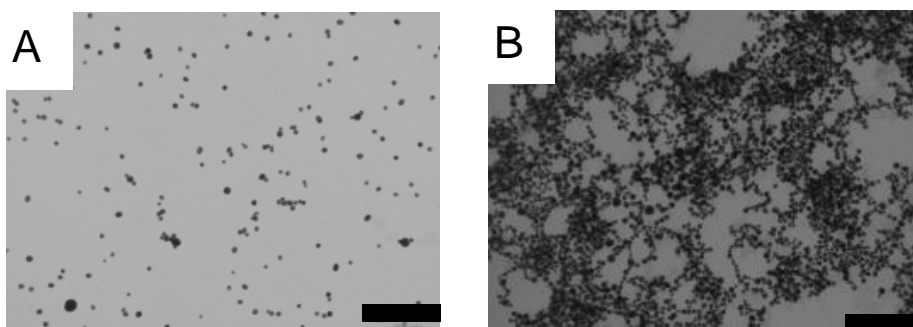


Figura 43. Imágenes obtenidas por TEM de A) las AuNPs y B) las AuNPs después de la adición de SPN (280 nM). La barra de escala: 200 nm.

Demostrada la selectividad del método y establecido el modelo de calibración, quedó por demostrar, la robustez del sensor respecto a las AuNPs utilizadas (AuNP1, AuNP2, AuNP3 y AuNP4). Para ello se prepararon cuatro síntesis de AuNPs: AuNP1, AuNP2, AuNP3 y AuNP4, con ligeras modificaciones en i) la concentración inicial de

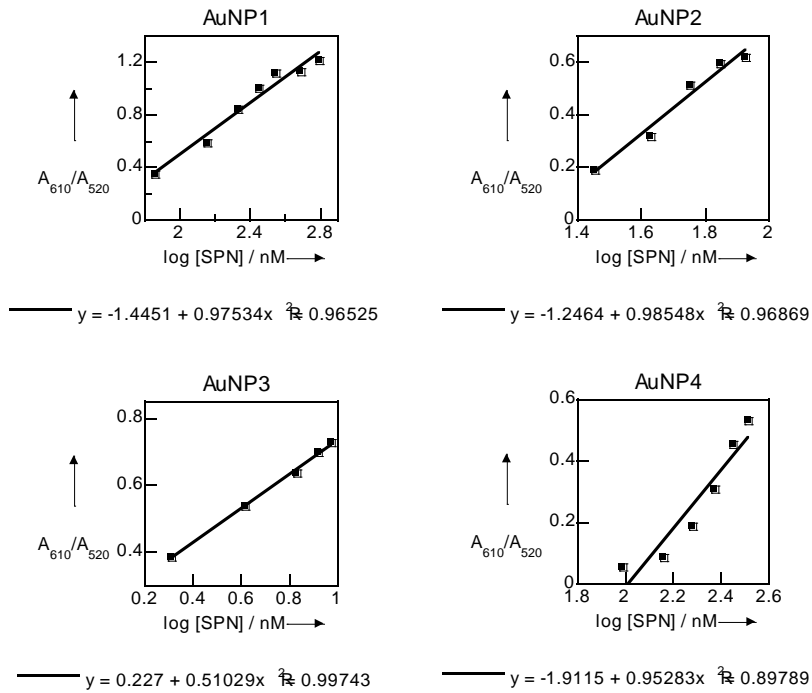
H₂O₂ ii) el tiempo de ablación iii) el procedimiento de eliminación de exceso de H₂O₂ (Tabla 1). A diferencia de las AuNPs con ligandos que tiene un tamaño fijo, las AuNPs “ultralimpias” pueden presentar distribución de tamaños con máximos dependientes de cada síntesis entre 15-20 nm. Este hecho podría condicionar la detección debido a una variación en la interacción espermina-AuNPs y por tanto, en el proceso de agregación. De modo, que en este apartado se han estudiado las variaciones en la respuestas en función de la síntesis, tanto para patrones acuosos como para patrones preparados en muestras de orina. Con el fin de demostrar que estas pequeñas variaciones no eran relevantes para la detección y cuantificación de SPN se procedió observar el comportamiento de las AuNP1, AuNP2, AuNP3 y AuNP4 en patrones acuosos. La **Tabla 21 y la Figura 44** muestran las pendientes obtenidas para A_{520}/A_{610} vs log [SPN] para cada síntesis ensayada. Se comprobó que utilizando menor cantidad de AuNPs provocaba una pendiente proporcionalmente menor. Las pendientes para AuNP1, AuNP2 y AuNP4 que presentan un plasmón similar ($A= 0.36$) son prácticamente la misma, mientras que para AuNP3 cuya banda de plasmón era la mitad ($A=0.18$) presenta una pendiente que es la mitad. Se demostró que, son los cambios en la concentración de AuNPs (conocida a través de la intensidad del plasmón) los responsables de un cambio de comportamiento de las AuNPs frente la espermina, a menor concentración de AuNPs menor será la agregación y menor será la pendiente y por tanto, menor la sensibilidad del sensor.

Tabla 21. Recta de calibrado obtenida para la adición de patrones acuosos de SPN con cuatro síntesis independientes de AuNPs.

AuNP	A AuNPs	AuNPs (μ L)	$A_{AuNP}/AAuNP-SPN$ VS log [SPN]
AuNP1	0.36	1000	$y = 0.97x - 1.45$
AuNP2	0.36	1000	$y = 0.99x - 1.25$
AuNP3	0.18	1000	$y = 0.49x - 1.30$ ^[a]
AuNP4	0.36	1000	$y = 0.95x - 1.91$

[a] AuNP3 fue diluida a la mitad

Capítulo 4. Las AuNPs como sensor plasmónico



Una vez evaluada la respuesta de las AuNP1, AuNP2, AuNP3 y AuNP4 frente a patrones de SPN acuosos se procedió a evaluar su respuesta en patrones de orina. Diferentes variables fueron testadas: i) el volumen de la disolución coloidal de AuNPs, ii) los volúmenes de orina fortificada adicionados (5, 10 y 15 μL) iii) la concentración de AuNPs ($A_{520} = 0.36$ y 0.18) iv) la concentración de espermina (72 nM y 143 nM). La tabla 4 muestra las pendientes obtenidas para $A_{\text{AuNP-SPN}}$ vs $[\text{SPN}]$ nM. Por comparación de las pendientes y las condiciones experimentales tenemos: i) la pendiente es el doble cuando la concentración de AuNPs es la mitad (comparamos los resultados de AuNP3 con AuNP1) ii) la pendiente es cuatro veces mayor cuando la concentración de espermina es cuatro veces menor (comparamos los resultados de AuNP2 y AuNP4 con AuNP1) iii) la pendiente es el doble cuando la concentración de SPN es cuatro veces menor y la concentración de AuNP es el doble (Comparando los resultados de AuNP2 y AuNP4 con AuNP3) iv) La pendiente es el doble cuando se trata de orina patológica pues la concentración de SPN en orinas de pacientes con cáncer suele ser mayores que en personas sanas (comparamos los resultados para AuNP4 para orinas patológicas **en verde** con AuNP4 para orinas normales **en negro**). En cambio, utilizando las mismas AuNP4 en orinas normales y en condiciones similares a las AuNP2, se obtienen pendientes iguales. (Ver **Tabla 22**).

Tabla 22. Pendientes obtenidas para estándar de SPN en orina utilizando diferentes condiciones de análisis.

AuNPs	A_{AuNPs}	AuNPs (μL)	Orina +SPN (μL)	Pendiente ^[a]
AuNP1	0.36	250	5	0.015
AuNP2	0.36	1000	5	0.06
AuNP2	0.36	1000	10	0.06
AuNP2	0.36	1000	15	0.06
AuNP3	0.18	250	5	0.03
AuNP4	0.36	1000	5	0.06
AuNP4	0.36	1000	15	0.06
AuNP4	0.36	1000	10^[b]	0.12
AuNP4	0.36	1000	15^[b]	0.12

[a] $A_{AuNP-SPN}$ vs [SPN]; [SPN] referido a la concentración de orina fortificada (72 nM y 143 nM). En **verde** valores obtenidos para muestras patológicas fortificadas (36 nM y 72 nM).

Se puede concluir que el valor de las pendientes obtenidas depende de la concentración de AuNPs respecto a la concentración de espermina. El estado de agregación será consecuencia del aumento o disminución de la concentración de un componente respecto al otro y esto es lo que se demuestra a partir de los experimentos analizados. Se demuestra que el comportamiento de AuNP1, AuNP2, AuNP3 y AuNP4 frente a la SPN es el mismo tanto en patrones acuosos como en orina y que por lo tanto las ligeras variaciones en la síntesis de las AuNPs no tienen relevancia para la detección y cuantificación de espermina en orina.

La **Figura 44** siguiente es una representación esquemática de la comparación entre la pendiente y las condiciones experimentales utilizadas, concretamente la relación entre la concentración de AuNPs y SPN.

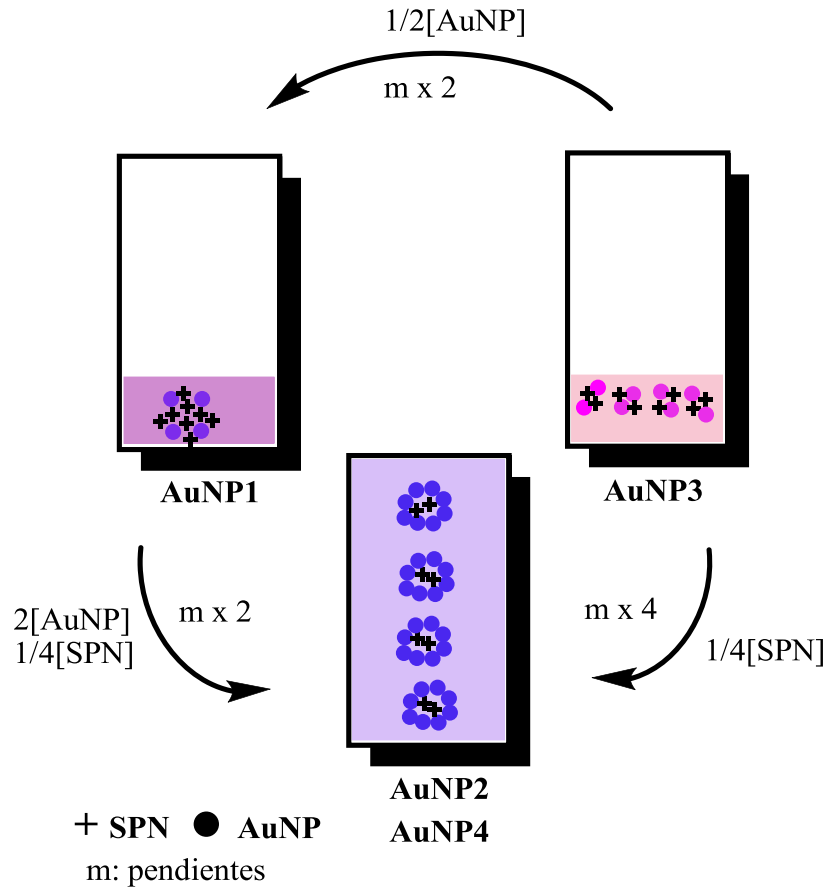


Figura 44. Esquema de la respuesta de cuatro síntesis diferentes de AuNPs a la concentración tanto de SPN como de AuNPs en orinas de voluntarios sanos. (Los resultados obtenidos en el caso de orinas patológicas han sido excluidos para mayor comprensión del esquema.)

La explicación matemática del valor de las pendientes para las AuNP1, AuNP2, AuNP3 a diferentes condiciones experimentales.

$$m = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{A_{AuNP-SPN}}{A_{AuNP}} = \frac{[AuNP] - [SPN]}{[SPN]} = \frac{[AuNP] - [SPN]}{[AuNP][SPN]}$$

i) Comparando el resultado para las AuNP3 frente a AuNP1: la pendiente es el doble cuando la concentración de AuNP es la mitad.

$$\left. \begin{array}{l} \text{AuNP1} \longrightarrow A = 0.36 \\ \text{AuNP3} \longrightarrow A = 0.18 \end{array} \right\} [\text{AuNP}]_{\text{AuNP3}} = \frac{1}{2} [\text{AuNP}]_{\text{AuNP1}}$$

$$\frac{[\text{AuNP} - \text{SPN}]_{\text{AuNP3}}}{[\text{AuNP}]_{\text{AuNP3}} [\text{SPN}]_{\text{AuNP1}}} = \frac{[\text{AuNP} - \text{SPN}]_{\text{AuNP1}}}{\frac{1}{2} [\text{AuNP}]_{\text{AuNP3}} [\text{SPN}]_{\text{AuNP1}}} \longrightarrow m_{\text{AuNP3}} = 2 m_{\text{AuNP1}}$$

ii) Comparando los resultados para AuNP2 y AuNP4 frente AuNP1: la pendiente es cuatro veces mayor cuando la concentración de espermina es cuatro veces menor.

$$\left. \begin{array}{l} \text{AuNP2 ó AuNP4} \longrightarrow v = 1000 \mu\text{L} \\ \text{AuNP1} \longrightarrow v = 250 \mu\text{L} \end{array} \right\} [\text{SPN}]_{\text{AuNP2 ó AuNP4}} = \frac{1}{4} [\text{SPN}]_{\text{AuNP1}}$$

$$\frac{[\text{AuNP} - \text{SPN}]_{\text{AuNP2}}}{[\text{AuNP}]_{\text{AuNP2}} [\text{SPN}]_{\text{AuNP2}}} = \frac{[\text{AuNP} - \text{SPN}]_{\text{AuNP1}}}{[\text{AuNP}]_{\text{AuNP1}} \frac{1}{4} [\text{SPN}]_{\text{AuNP1}}} \longrightarrow m_{\text{AuNP2 ó AuNP4}} = 4 m_{\text{AuNP1}}$$

iii) Comparando los resultados para AuNP2 y AuNP4 frente AuNP3: la pendiente es el doble cuando la concentración de SPN es cuatro veces menor y la concentración de AuNP es el doble.

$$\left. \begin{array}{l} \text{AuNP2 ó AuNP4} \longrightarrow v = 1000 \mu\text{L} \quad A = 0.36 \\ \text{AuNP3} \longrightarrow v = 250 \mu\text{L} \quad A = 0.18 \end{array} \right\} \begin{array}{l} [\text{AuNP}]_{\text{AuNP2 ó AuNP4}} = 2 [\text{AuNP}]_{\text{AuNP3}} \\ [\text{SPN}]_{\text{AuNP2 ó AuNP4}} = 4 [\text{SPN}]_{\text{AuNP3}} \end{array}$$

$$\frac{[\text{AuNP} - \text{SPN}]_{\text{AuNP2}}}{[\text{AuNP}]_{\text{AuNP2}} [\text{SPN}]_{\text{AuNP2}}} = \frac{[\text{AuNP} - \text{SPN}]_{\text{AuNP3}}}{2 [\text{AuNP}]_{\text{AuNP3}} \frac{1}{4} [\text{SPN}]_{\text{AuNP3}}} \longrightarrow m_{\text{AuNP2 ó AuNP4}} = 2 m_{\text{AuNP3}}$$

4.1.5 Conclusiones

a) Se ha conseguido una síntesis de AuNPs monodispersas, rápida y reproducible mediante la cual las AuNPs permanecen estables para su empleo durante meses.

b) Las AuNPs obtenidas pueden utilizarse como sensores plasmónicos para la detección y cuantificación de SPN en orina.

c) El innovador sensor plasmonico desarrollado está basado principalmente en dos factores; la ausencia de competencia de ligandos orgánicos por la superficie de la AuNPs junto con la gran afinidad que presentan los grupos aminos del analito por la superficie de las AuNPs.

d) El patrón de desarrollo del sensor con el tiempo es distinto en función del tipo de orina.

d) Se ha demostrado la selectividad y robustez del método de detección de SPN.

e) Se ha aplicado con éxito en muestras reales de voluntarios tanto sanos como enfermos. Los resultados muestran que es necesario ajustar las condiciones para cada muestra con el fin de llevar a cabo la correcta cuantificación de SPN en dichas muestras.

f) El método descrito es un método de fácil manejo que no requiere equipamiento técnico complejo, empleando para ello una metodología que permite reducir el tiempo de análisis.

g) Este estudio ha permitido desarrollar un ensayo colorimétrico para la SPN que actualmente se encuentra en fase de investigación traslacional (**Proyecto Translacional PROGRAMA VLC-BIOMED**).

CAPÍTULO 5.
EL PDMS COMO FASE EN IT-SPME

IT-SPME es una técnica de extracción sostenible que aplicada a HPLC permite buenas recuperaciones tanto en agua como en otras matrices. Se reducen o se eliminan las etapas de preparación de muestra, a la vez que permite la automatización del proceso de análisis de muestras cuando se acopla a HPLC (Ver **IT-SPME** en **Introducción**).

En este trabajo se ha estudiado la degradación de 2-dietil hexilftalato (DEHP) (**Sección 5.1 y 5.2**) así como el análisis mutiresiduo de contaminantes (**Sección 5.3**). IT-SPME evita la utilización de disolventes de extracción y también de recipientes o utensilios de plástico de forma que se reduce el riesgo de contaminación al máximo, principal problema para la estimación de esta familia de compuestos. Primero, se llevó a cabo el análisis de ftalatos, incluyendo productos de degradación y metabolitos, en agua, analizando tanto muestras de aguas costeras como aguas de lavado de circuitos de plástico (**Sección 5.1**) y posteriormente, se optimizó para su estudio en muestras de orina (**Sección 5.2**). El método que aquí se propone es un método rápido, fiable y robusto, supone una alternativa a los métodos comúnmente utilizados para el análisis de ftalatos, métodos de GC que presentan falsos positivos y resultados sobreestimados como se ha indicado en el capítulo de Introducción (Ver [105, 106]).

En la **Sección 5.3** se estudió la modificación de las columnas capilares de PDMS con CNTs para IT-SPME-CapLC. Se demuestra como la introducción de CNTs influye en la extracción de compuestos. Se utilizaron contaminantes ambientales a niveles de trazas con una estructura química diversa. Los compuestos analizados fueron PAHs, triazinas, organofosfatos y piretroides (Ver [60]).

5.1 DETERMINACIÓN EN LÍNEA DE PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE DEHP EN AGUAS POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN TUBO Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR CON DETECTOR DE FILA DE DIODOS (IT-SPME-CAP-LC-DAD)

En este estudio se evaluó la posibilidad de extender el análisis mediante IT-SPME-CapLC-DAD [207] a la determinación de productos de degradación del dialquil ftalato más utilizado DEHP (Ver **Figura 45**). (Ver [105]).

5.1.1 Optimización de la separación cromatográfica

Se utilizó un sistema IT-SPME-CapLC-DAD para el análisis de los ftalatos (Ver **Sección 3.5.2 y Tabla 17** para conocer las condiciones experimentales).

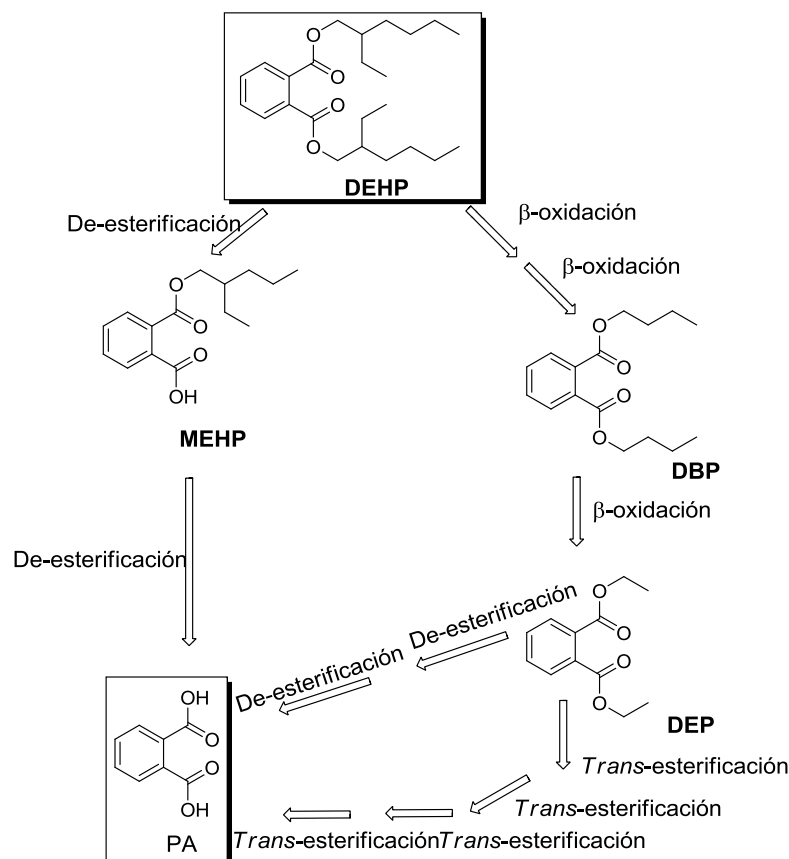


Figura 45. Posible esquema representativo de la degradación de DEHP en MEHP, DEP y DBP.

Los ftalatos analizados presentaron polaridades muy diferentes entre sí. El DEP es el más hidrofílico ($\log K_{o/w} = 2.5$) y el DEHP el más hidrofóbico ($\log K_{o/w} = 7.5$). En cambio, el DBP y el MEHP tienen $\log K_{o/w}$ similares; 4.6 y 4.2 respectivamente. Estudios anteriores revelaron que es necesario un porcentaje elevado de acetonitrilo (95% con un flujo de 10 μL) para la desorción de DEHP de la columna analítica debido a su hidrofobicidad [207]. La optimización de la fase móvil fue crucial para obtener una buena separación entre el DBP y el MEHP así como poder estimar DEHP en un tiempo razonable (30 min). (Ver composición de la fase móvil en **Sección 3.5.2: Tabla 17**).

5.1.2 Optimización de IT-SPME

El montaje IT-SPME-CapLC-DAD utilizado se puede ver en la **Sección 3.2. Figura 24**.

Tomando como referencia estudios anteriores con IT-SPME [207], el volumen óptimo utilizado tanto para patrones como para muestras fue de 4 mL. Para obtener una mejor respuesta para MEHP ($pK_a = 3.08$) los patrones y muestras se acidificaron, sin que esto provocara cambios en las respuestas de los otros compuestos. (Ver inserto en **Figura 46**).

Para mejorar la resolución del DBP, debido a que en la misma zona (entre los 15.5) de elución del DBP (16.7 minutos) se eluyen también otros compuestos presentes en el agua, se operó en gradiente. Se ensayaron diferentes disolventes de lavado. Con agua acidificada (50 μ L) se consiguió eliminar algunas impurezas. Se empleó el tiempo de retención y el espectro para la identificación de los diferentes ftalatos.

En la **Figura 46**, se muestran los cromatogramas para A) un blanco, B) un patrón de DBP de 10 μ g/L y para un patrón de DEP, MEHP y DEHP de 1 μ g/L. Tanto en el blanco como en los patrones se observan picos entre 15 y 18 minutos. Uno de estos compuestos desconocido en el blanco también aparece junto al DBP (Ver **Figura 46A y 46B**).

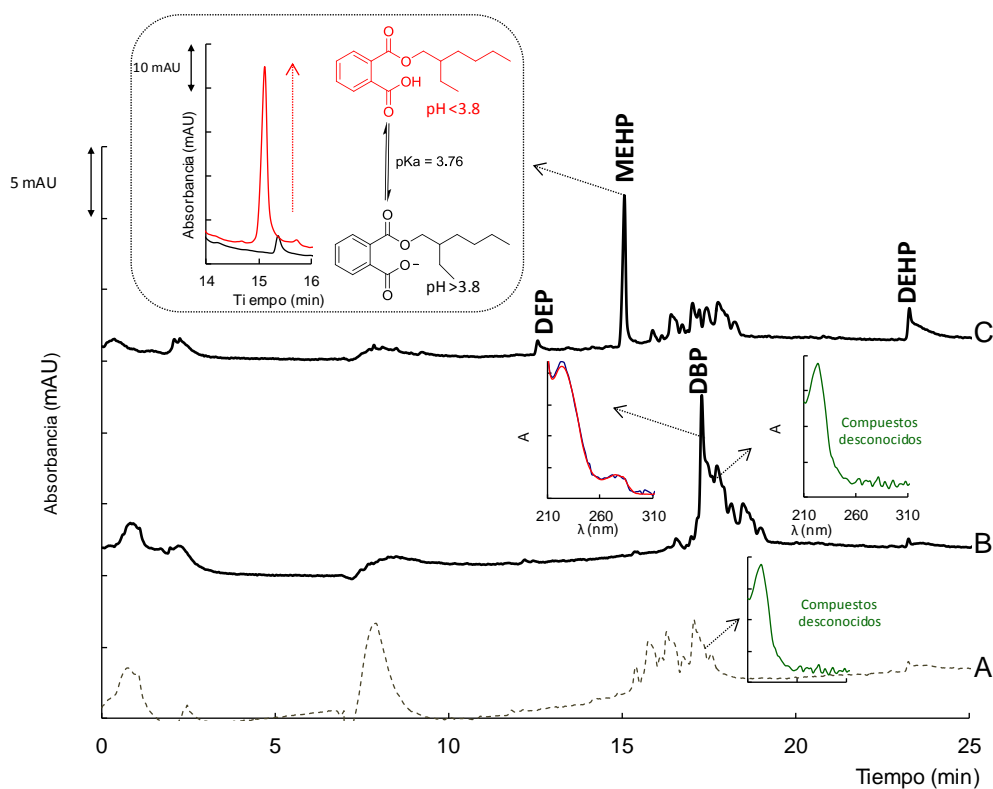


Figura 46. Cromatogramas obtenidos en condiciones óptimas: A) blanco (agua nanopura acidificada pH 3.0), B) Disolución patrón de DBP (10 μ g/L) y C) Disolución patrón de DEP, MEHP y DEHP (1 μ g/L por cada uno). Se ha insertado el pico cromatográfico obtenido cuando el MEHP está en agua y en agua acidificada a pH 3.0, así como sus dos formas posibles según el pH.

5.1.3 Parámetros analíticos

La **Tabla 23** muestra las figuras de mérito del procedimiento desarrollado. La precisión obtenida fue adecuada, las desviaciones estándar relativas intra- y inter-día fueron del 9% y el 20% (n = 3). Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) se calcularon experimentalmente a partir de las concentraciones que proporcionaron una relación señal/ruido de 3 y 10 respectivamente, excepto para el DEHP que se calcularon para concentraciones 3 veces y 10 veces superiores a la señal correspondiente del blanco. El DBP presentó un LOD bastante mayor debido a la presencia de compuestos en el blanco que eluyen a tiempos de retención similares. En general los LODs y LOQs detectados fueron satisfactorios [208-211].

Tabla 23. Parámetros analíticos para la determinación de DEHP y sus productos de degradación en aguas.

Analito	Intervalo de concentración (µg/L)	Linealidad, $y = a + bx$ (n= 5)			Reproducibilidad (n= 3) ^a		LOD (µg/L)	Recuperación ^b (%) (n=3)
		$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	R^2	Intradía CV (%)	Interdía CV (%)		
MEHP	0.015- 50.0	3 ± 1	63 ± 5	0.990	9	12	0.005	95 ± 4
DEP	0.3-25.0	-2 ± 4	11.4 ± 1.0	0.980	6	12	0.1	100 ± 5
DBP	3-50.0	130 ± 230	286 ± 10	0.997	4	2	1	103 ± 7
DEHP	0.3-50.0	1 ± 1	21 ± 1	0.990	4	20	0.1	96 ± 9

a: calculada a las concentraciones de 1 µg/L para DEP, MEHP y DEHP y 10 µg/L para DBP

b: calculada a partir de las muestras fortificadas con los ftalatos: DEP, MEHP y DEHP a 1 µg/L y DBP a 10 µg/L.

5.1.4 Aplicación a muestras reales

Análisis de aguas costeras y de transición de la Comunidad Valenciana.

En la mayoría de las muestras analizadas se encontró DEHP y en algunas de ellas también DEP. La **Figura 47** muestra dos de las aguas analizadas. La concentración de DEP y DEHP en cada una de ellas fue de 1.8 y 0.4 µg/L respectivamente.

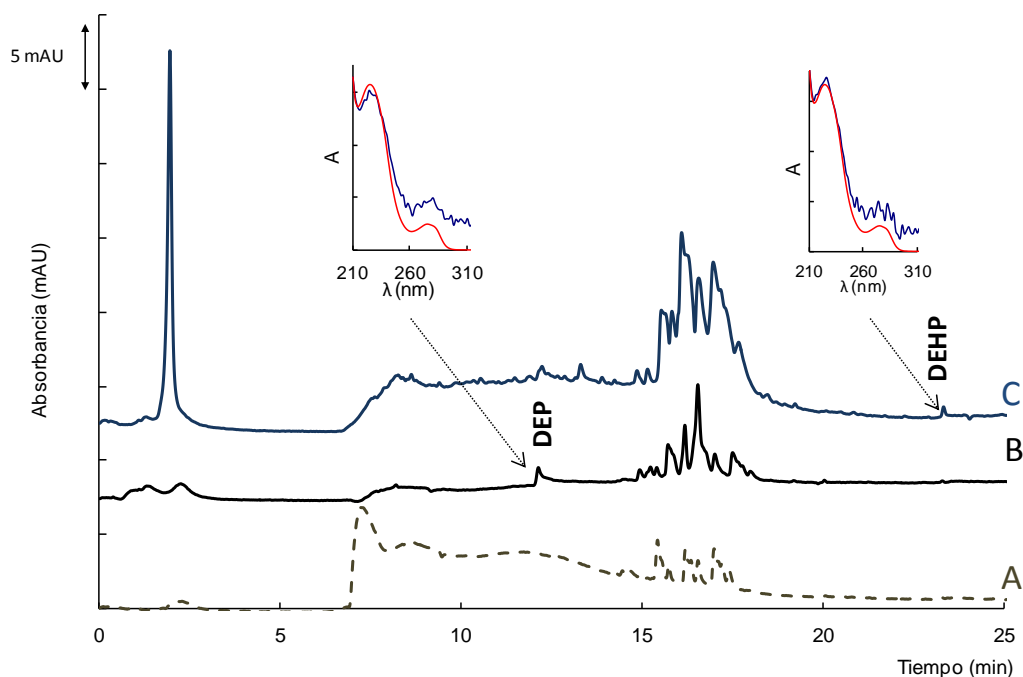


Figura 47. Cromatograma obtenido bajo condiciones óptimas (Ver Sección 3.5.2: Tabla 17) para alguna de las muestras de agua costera y de transición analizadas.

Análisis de aguas de lavado de tuberías de plástico.

Se hizo circular agua a través de tubos de plástico de dos dimensiones diferentes. Después de hacerlo circular una sola vez se encontraron ftalatos como el DEP y el MEHP (**Figura 48** en verde; tubos cortos y en rojo; tubos largos). Al recircular el agua varias veces también se observó DEHP. La cantidad de DEHP fue mayor al recircular agua a través de tubos de menor longitud (**Figura 48** en negro) que en los tubos de mayor longitud (**Figura 48** en azul) durante el mismo tiempo (1 h). El agua recircula más veces en los tubos de menor dimensión para un mismo tiempo, con lo que arrastra mayor cantidad de DEP, MEHP y DEHP. Se demuestra así, que la migración de ftalatos de los plásticos tiene lugar. Además, parece ser que a diferencia del DEP y el MEHP el DEHP es el que migra con mayor dificultad.

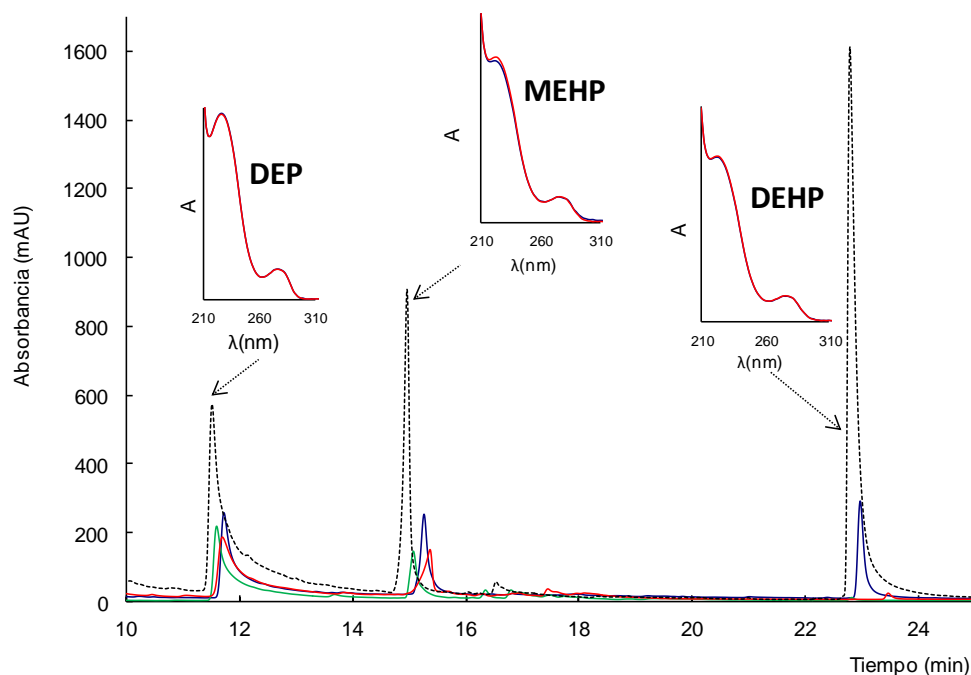


Figura 48. Cromatograma obtenido bajo condiciones óptimas para muestras de lavado de tuberías de plástico. El agua fue recirculada en un sistema de tuberías de plástico de dimensiones largas y cortas. El agua circulando en las tuberías cortas (en **verde**) y en las largas (en **rojo**) y el agua recirculada durante 1 h en las tuberías cortas (en **negro**) y en las largas (en **azul**).

5.1.5 Conclusiones

a) Tanto dialquil (DEHP, DBP, DEP) como el monoalquil ftalato (MEHP) pueden ser analizados por IT-SPME-Cap LC-DAD, a pesar del amplio rango de polaridad que estos analitos presentan. ($\log K_{o/w} = 2.5$ hasta 7.5), por lo que el método es adecuado para el análisis de *screening* de ftalatos y para el estudio de la degradación del DEHP, y también de su metabolito principal el MEHP.

b) La sensibilidad del método propuesto es comparable a la de otros métodos que utilizan microextracción [212-218].

c) El tratamiento de la muestra es mínimo (ajuste de pH) y es directamente introducida en el sistema. Así se reduce el tiempo de análisis (30 min) y se evitan problemas de contaminación como consecuencia del contacto con materiales plásticos y disolventes orgánicos durante la etapa de tratamiento de la muestra.

d) El método es simple, rápido económico y respetuoso con el medioambiente. Su robustez también queda demostrada en las más de cien muestras procesadas sin observar ningún deterioro por parte del sistema.

e) Este método supone una alternativa a los métodos de GC comúnmente utilizados para el análisis rutinario de ftalatos en aguas.

f) El PDMS que contiene un 5 % de polidifenilsiloxano es una fase extractante adecuada para IT-SPME para la estimación en línea de ftalatos de diferente polaridad en CapLC-DAD en aguas.

5.2 DETERMINACIÓN DE FTALATOS EN ORINA HUMANA POR IT-SPME-CAP-LC-DAD

5.2.1 Optimización de la IT-SPME

Ver Sección 3.5.2: Tabla 17 donde se describe la columna analítica así como la fase móvil utilizada y la fase del capilar IT-SPME. En la Sección 3.2 Figura 24 se resume el montaje IT-SPME-CapLC-DAD utilizado. En este caso, si bien se ensayaron volúmenes de 6, 4 y 1 mL el volumen óptimo utilizado tanto para patrones como para muestras también fue de 4 mL. Sin embargo, las muestras se diluyeron a la mitad para disminuir el efecto matriz. Las muestras enzimáticamente hidrolizadas se prepararon utilizando 2 mL tampón amonio acetato (pH=6.0-6.5) con β -glucuronidasa a 37°C durante 2 horas y se diluyeron con 2 mL de agua nanopure para su análisis [219].

Para evitar la contaminación durante el proceso de toma y preparación de la muestra, no se utilizó material de plástico. Las muestras fueron tomadas utilizando material de vidrio, se introdujo directamente en una botella de vidrio ámbar y se guardó en la nevera. Antes del análisis la muestra se diluyó y se acidificó en un vial de vidrio y se procesaron hasta 4 mL de muestra utilizando una jeringa de vidrio de 1 mL en el sistema en línea IT-SPME-CapLC-DAD. Finalmente, 50 μ L de agua a pH 3 fue inyectada para eliminar posibles compuestos retenidos en el capilar IT-SPME. Las muestras de orina fortificadas se procesaron siguiendo el mismo procedimiento fortificándose antes del análisis tal y como se describe en el protocolo siguiente y también, varios blancos fueron procesados con el fin de controlar posibles contaminaciones. (Ver [106]).

PROTOCOLO

1. Toma de muestra. Tiempo ~ 5 min
2. Transferir 2 mL de orina a un vial y añadir 2 mL de agua nanopura. Tiempo ~ 1 min
3. Acidificar la muestra con HCl 1 mM. Tiempo ~ 5 min
4. Preparar los patrones o las muestras fortificadas. Tiempo ~ 5 min

Δ ETAPA CRÍTICA. Cada disolución de ftalatos debe ser guardada en acetonitrilo a 4°C y diluida con agua nanopura antes del análisis.

5. Procesar 4 mL de patrones, muestras o muestras fortificadas por IT-SPME-CapLC-DAD. Tiempo ~ 1 min
6. Adquirir la señal analítica por IT-SPME-CapLC-DAD. Tiempo ~ 30 min

\diamond **IMPORTANTE:** Evitar el uso de materiales plásticos durante todo el proceso. Lavar cuidadosamente el material de vidrio antes de utilizarlo. Comprobar en los blancos que no existe contaminación de ftalatos.

5.2.2 Parámetros analíticos

Control de calidad y de exactitud (QA/QC)

Teniendo en cuenta que los ftalatos están presentes en el laboratorio, se ha tenido un especial cuidado en evitar el contacto con material de plástico. Así como, limpiar de forma escrupulosa y diseñar un protocolo de control de calidad y exactitud que garantice resultados analíticos libres de errores sistemáticos y falsos positivos. El material de vidrio utilizado para el análisis fue lavado con detergente, agua y agua nanopure (Millipor, Milford, MA, USA) sucesivas veces y finalmente, se secó en la estufa a 150 °C durante 2 horas.

Los ftalatos fueron identificados mediante el tiempo de retención y su espectro característico de UV. Varios blancos fueron registrados durante el análisis; concretamente un blanco cada 5 muestras o disoluciones patrón, con el fin de detectar posibles contaminaciones durante el análisis.

También se prepararon blancos para el disolvente y fueron analizados cada 5 muestras procesadas. En cuanto a las matrices fortificadas para las muestras de orina, estas fueron preparadas por duplicado.

Los límites de detección (LODs) se calcularon experimentalmente a partir de disoluciones y muestras que presentaban una relación señal/ruido de 3. Los límites de cuantificación (LOQs) se calcularon como el del punto más bajo de la recta de calibrado obtenida que proporcionó un 30 % de variación. Los seis puntos de la recta de calibrado estándar fueron obtenidos antes y después de cada análisis.

Teniendo en cuenta que no existen fuentes o referencias disponibles para los análisis y muestras analizados con las que comparar resultados, las recuperaciones de las muestras fortificadas fueron calculadas como una alternativa para mostrar su veracidad. Diez, fueron las muestras fortificadas y analizadas independientemente. La precisión fue evaluada y expresada (n=5) tanto intradía como interdía como la desviación estándar relativa (RSD) en %.

El intervalo dinámico de concentraciones fue definido representando el área de los picos frente a la concentración. El criterio seguido para la linealidad fue un coeficiente de determinación mayor que 0.99 y el RSD menor al 15% para todos los puntos de calibración individuales. La curva de calibrado no fue forzada a pasar por el cero en ninguno de los casos.

Capítulo 5. El PDMS como fase IT-SPME

Las concentraciones fueron representadas como la media \pm la incertidumbre expandida con $K=2$ de acuerdo con *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

La **Tabla 24** muestra los parámetros analíticos del método aquí propuesto. La linealidad fue satisfactoria a las concentraciones de ftalatos requeridas. La precisión fue también óptima considerando los niveles ensayados. Los LODs fueron verificados en las muestras de orina, obteniendo los mismos valores. Los LODs fueron similares a los obtenidos utilizando otros métodos descritos para mono-alquilftalatos en orina o dialquilftalatos en otras matrices biológicas (Ver **Tabla 7**). Es posible disminuir los LODs, en caso necesario, incrementando la longitud del capilar del IT-SPME haciendo que se incremente la cantidad de analito extraído en el capilar. Incrementar el volumen de inyección de 4 mL a 6 mL es otra opción, ya que se ha observado que la sensibilidad se ve incrementada en un 15%.

Diez muestras fueron fortificadas con DEP, DEHP, DBP y MEHP entre 5 y 20 $\mu\text{g/L}$. Las recuperaciones se muestran en la **Tabla 24**. No se encontró efecto matriz para los dialquil ftalatos mientras que se observó efecto matriz para el MEHP. En este caso, fue necesario utilizar el método de adición estándar para su cuantificación.

Tabla 24. Parámetros analíticos para la determinación de ftalatos en orina.

Analito	Intervalo de concentración ($\mu\text{g/L}$)	Linealidad, $y = a + bx$ (n= 5)			Reproducibilidad (n= 3) ^a		LOD ($\mu\text{g/L}$)	Recuperación ^b (%) (n=3)
		$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	R^2	Intradía CV (%) ^a	Interdía CV(%) ^a		
MEHP	4.5 – 50.0	3 ± 1	2.9 ± 0.1	0.993	5	9	1.5	90 ± 9
DEP	4.5 – 50.0	-7 ± 2	6.0 ± 0.1	0.997	9	20	1.5	50 ± 10
DBP	1.5 - 50.0	41 ± 23	22 ± 1	0.99	2	7	0.5	90 ± 2
DEHP	2 - 50.0	1 ± 1	8.2 ± 0.5	0.98	9	18	0.75	80 ± 8

a: muestras de orina fortificadas a 10 $\mu\text{g/L}$ y b: muestras de orina fortificada entre 5 y 20 $\mu\text{g/L}$

5.2.3 Aplicación a muestras reales

Las muestras fueron diluidas a la mitad, acidificadas (pH = 3) e introducidas en el sistema IT-SPME-CapLC-DAD para su análisis. No se realizó ningún tratamiento previo a diferencia de la mayoría de métodos utilizados para analizar ftalatos en muestras biológicas. Además, fue posible analizar tanto dialquil ftalatos como monoalquil ftalatos [105-111]. (Ver **Sección 2.3.1: Tabla 7: Metodologías analíticas para la estimación de los ftalatos en muestras biológicas**).

Se analizaron 18 muestras de orina (Ver dos de los cromatogramas ejemplo en **Figura 49**). El 50% de las muestras contenían DBP, el 28% DEHP, el 17% DEP y el 6% MEHP (ver **Tabla 25**). Para cuantificar el MEHP se utilizaron muestras fortificadas.

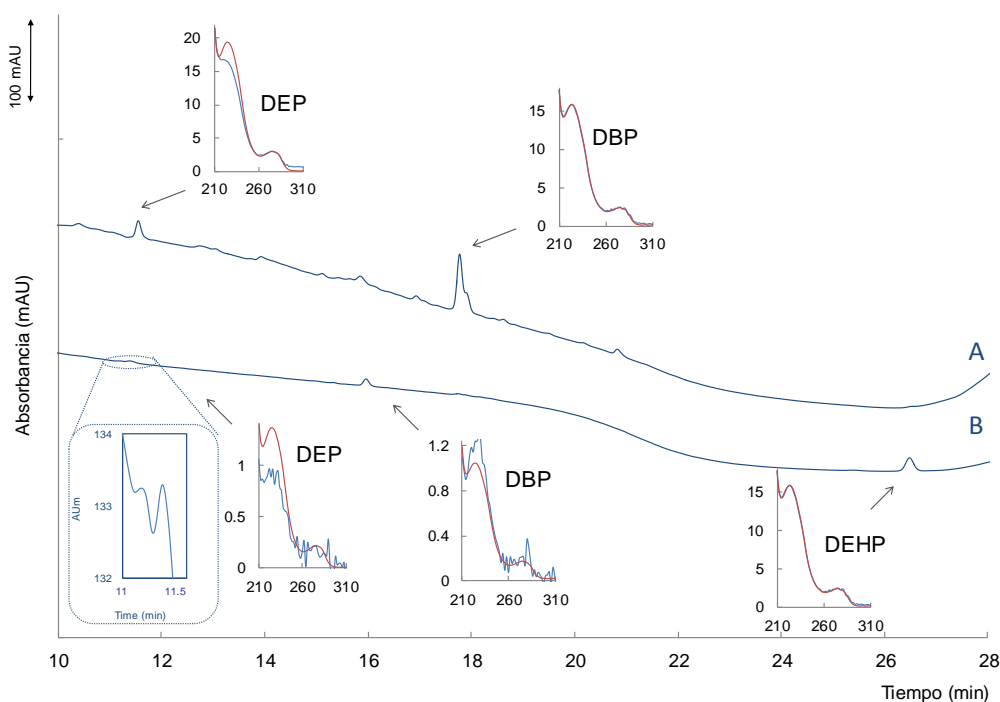


Figura 49. Cromatogramas obtenidos a 230 nm bajo las condiciones óptimas ensayadas para 2 de las muestras de orina con el espectro de UV de cada uno de los ftalatos. El inserto en el segundo cromatograma, corresponde a la línea base en la cual fue detectado el DEP en el LOD con el fin de asegurar la identificación.

Capítulo 5. El PDMS como fase IT-SPME

Tabla 25. Niveles de DEP, MEHP, DBP y DEHP en orina de 18 voluntarios. La mediana \pm incertidumbre expandida con $K=2$ fue utilizada para la cuantificación de acuerdo con NIST.

Ftalato	Media	Min	Max	Frecuencia de detección (%)
DEP	≈ 3	nd	4.5 ± 0.2	17
MEHP	≈ 3	nd	≈ 3	6
DBP	≈ 0.5	nd	≈ 1.2	50
DEHP	2.2 ± 0.2	nd	6.8 ± 0.4	28

La **Figura 50** muestra los ftalatos encontrados en cada una de las muestras ensayadas. Se observa como solo siete de las muestras presentan ftalatos por debajo de los LODs. Cuatro de las muestras contienen solo DBP, una muestra contiene DEHP y otra muestra contiene MEHP.

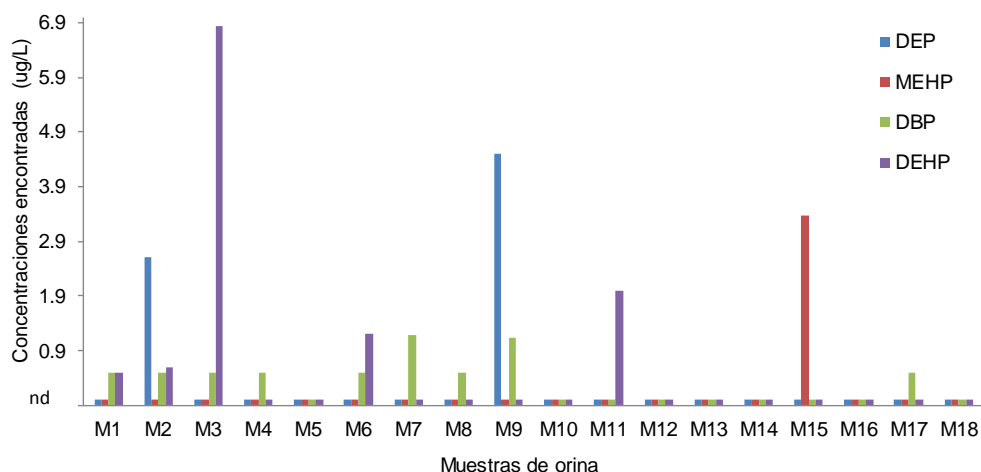


Figura 50. Perfil de los ftalatos encontrados en cada una de las muestras de orina analizada; nd significa no detectado, i.e. concentraciones por debajo de los LODs.

La **Figura 51** muestra el cromatograma para una muestra de orina (en negro), la muestra de orina fortificada con 20 $\mu\text{g/L}$ de DEP, MEHP, DBP y DEHP (en azul) y la muestra de orina fortificada e hidrolizada (en rosa). Se observa como al fortificarla los picos para el DEP, DBP y DEHP crecen mientras que no se observa MEHP en ninguno de los casos. Basando en estudios anteriores, es muy posible que el MEHP se oxide a MEHHP y MEOHP esto explicaría por qué no se observa en ninguno de los casos [220].

Además, es posible comprobar cómo después de hidrolizar la muestra siguiendo el procedimiento experimental normalmente utilizado (utilizando la enzima β -glucosidasa y a la temperatura corporal de 37°C durante 2 h), los dialquil ftalatos no se hidrolizan a monoalquil ftalatos.

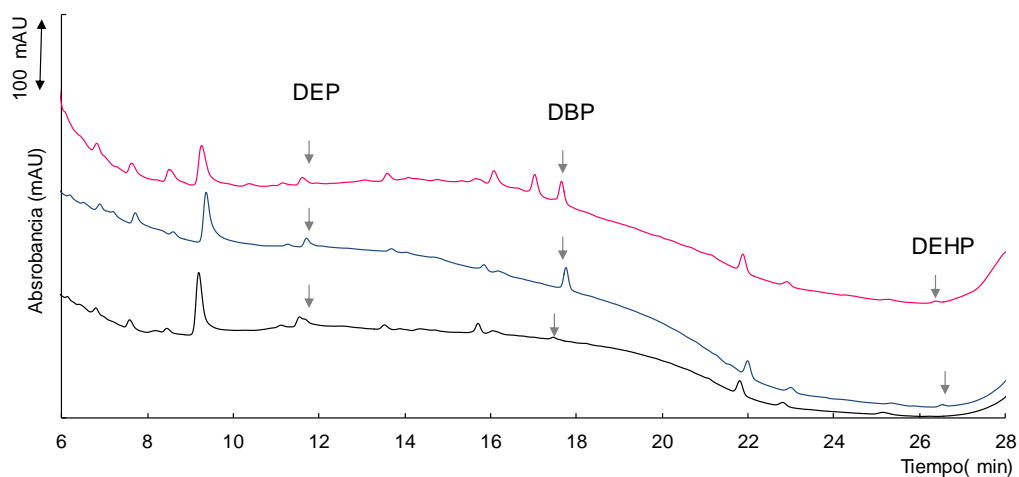


Figura 51. Cromatogramas obtenidos a 230 nm bajo las condiciones óptimas ensayadas para orina en **negro**, orina fortificada (20 $\mu\text{g/L}$) en **azul** y orina fortificada hidrolizada a 37°C durante 2 horas en **rosa**.

5.2.4 Conclusión

- a) El tratamiento de la muestra es mínimo; dilución a la mitad y acidificación reduciendo el tiempo de análisis y evitando problemas de contaminación.
- b) Los límites de detección son adecuados: 0.5-1.5 $\mu\text{g/L}$.
- c) Por primera vez, se han encontrado dialquil ftalatos; DEP, DBP y DEHP en la orina.
- e) Se ha demostrado que a pesar de hidrolizar la muestra los dialquil ftalatos no se convierten en monoalquil ftalatos
- d) Características como rapidez, simplicidad y fiabilidad, son esenciales para desarrollar métodos para el análisis de muestras. El método analítico propuesto cumple con estas características.

Capítulo 5. El PDMS como fase IT-SPME

f) Este método puede contribuir a entender mejor el metabolismo de los dialquil ftalatos en el ser humano y poder controlar así su toxicidad. También puede ser utilizado para establecer los límites de contaminación por ftalatos en la población.

e) El PDMS que contiene un 5 % de difenilo es una fase extractante adecuada para IT-SPME para la estimación en línea de ftalatos de diferente polaridad en CapLC-DAD en orina.

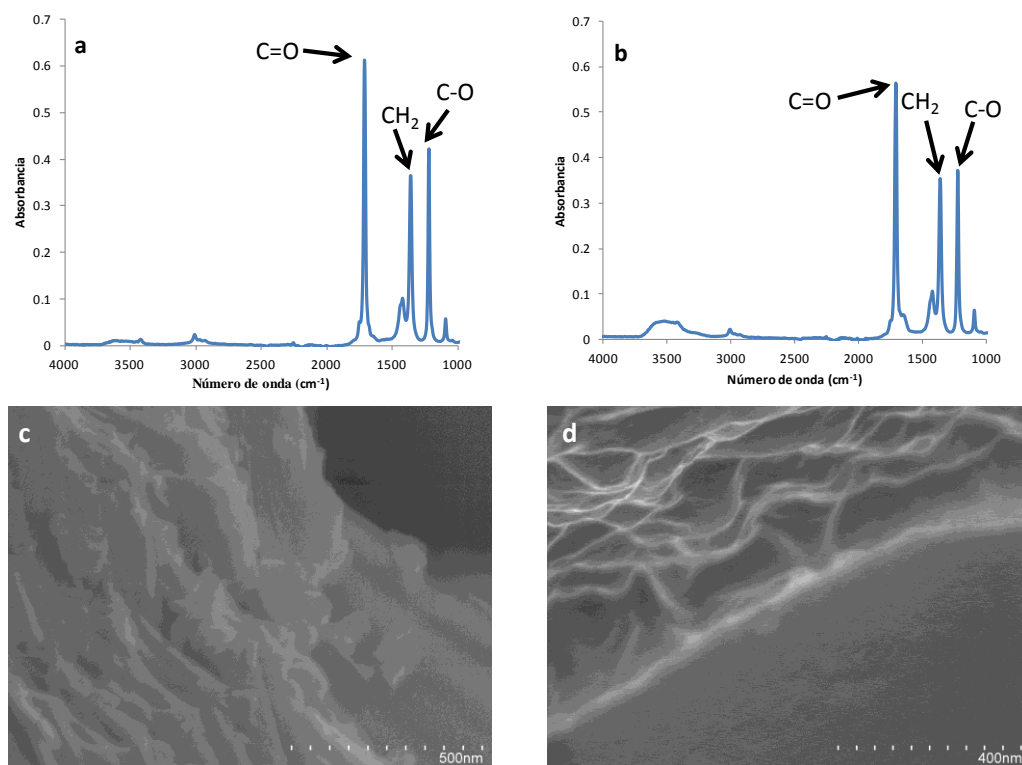
5.3. IT-SPME MODIFICADO CON CNTS PARA ESTIMAR CONTAMINANTES EN AGUAS

5.3.1 Funcionalización de la columna capilar

(Ver Sección 3.5.2 en *Funcionalización de los CNTs e Inmovilización en las columnas capilares de PDMS (TRB-5 y TRB-35)*).

5.3.2 Caracterización de los c-CNTs y la columna capilar

La caracterización de los CNTs después de su carboxilación se llevó a cabo por ATR-FTIR. La **Figura 52a y 52b** muestra los registros obtenidos para los c-SWNTs y c-MWNTs. En ambos registros se observa una banda a 1360 cm^{-1} que corresponde al CH_2 y bandas de absorción a 1120 cm^{-1} para el enlace C-O y a 1170 cm^{-1} para el enlace C=O del carbonilo. La presencia de ambos enlaces demuestra que la etapa de carboxilación se ha realizado con éxito y hay grupos carbonilos en la funcionalización de los nanotubos [221, 222]. La **Figura 52c y 52d** imágenes de SEM de la superficie interior de c) c-SWNT-PDMS TRB-5 y d) C-MWCNTs-PDMS TRB-5 columnas capilares.



La Figura 52. Espectro de IR para **(a)** c-SWNTs, **(b)** c-MWNTs y imágenes de SEM para **(c)** SWNTs-PDMS_{TRB-5}, **(d)** c-MWNTs-PDMS_{TRB-5}.

En la **Figura 52c y 52d** se observa una capa homogénea sorbente en ambos casos. Un revestimiento similar se observó en el caso de las columnas c-CNT-PDMSTRB-35 capilares (imagenes no mostradas).

5.3.3 Estudio de la capacidad de adsorción de los capilares

Se evaluó la adsorbibilidad de los capilares PDMS_{TRB-5} y PDMS_{TRB-35} y su funcionalización con NTs; c-SWNTs PDMS_{TRB-5}, c-SWNTs PDMS_{TRB-35}, c-MWNTs PDMS_{TRB-5}, c-MWNTs PDMS_{TRB-35} con los diferentes analitos.

Estudio de la capacidad de extracción para los compuestos heterocíclicos nitrogenados

Los analitos utilizados fueron 2-OH-TBA, DES-TBA, propazina, atrazina y piriproxyfeno. Una mezcla de 4 mL triazinas (50 µg/L) y piriproxyfeno (10 µg/L) fue procesado por el sistema de IT-SPME-Cap-LC. La **Figura 53** muestra la respuesta analítica de las triazinas obtenidas para las diferentes columnas capilares y la **Tabla 26** resume los LODs obtenidos bajo las condiciones experimentales descritas en la **Sección 3.5.2: Tabla 17**. Los LODs fueron calculados a partir de 3 veces la relación señal/ruido.

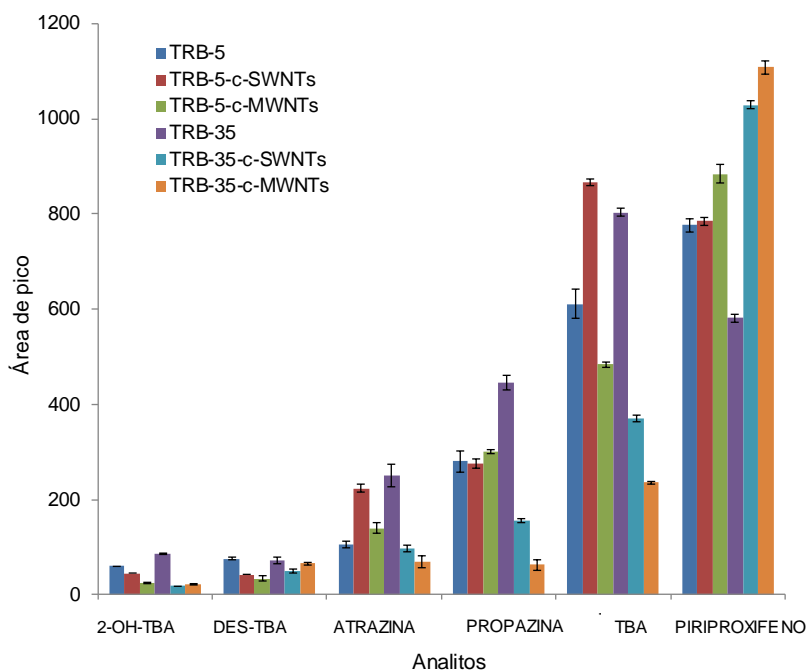


Figura 53. La respuesta analítica de triazinas (50µg/L) con las columnas capilares PDMS y c-CNT-PDMS utilizadas en el sistema IT-SPME.

Los compuestos más polares (Ver **Tabla 26** Log K_{ow}) como las triazinas (Log $K_{ow} = 1.5-3.21$, ver respuesta analítica para cada una de las triazinas en la **Figura 53**) presentan mayor afinidad por las superficies capilares más polares como el PDMS_{TRB-35}

En cambio, compuestos menos polares como el piriproxifeno (log $K_{ow} = 5.37$) quedan más retenidos en el capilar PDMS_{TRB-5} que es menos polar. El PDMS_{TRB-35} contiene un 35% de difenilo y un 65% de PDMS frente al capilar de PDMS_{TRB-5} que contiene un 5% de difenilo y un 95% de PDMS. El PDMS es un polímero muy hidrofóbico y al incrementar el porcentaje de difenilo y disminuir el porcentaje de PDMS se consigue una superficie en el capilar más polar y por tanto, más idónea para extraer analitos polares consiguiendo menores LODs (**Tabla 26**).

Los resultados obtenidos para las columnas capilares funcionalizadas con c-SWNTs y c-MWNTs carboxilados (Ver **Tabla 26**) mostraron LODs mayores para las triazinas en PDMS_{TRB35} funcionalizados por CNTs respecto PDMS_{TRB35}. Sin embargo se observaron LODs ligeramente menores para la atrazina, propazina, terbutilazina con las columnas capilares c-SWNTs-PDMS_{TRB5} respecto a PDMS_{TRB35}. Este efecto puede explicarse teniendo en cuenta que los CNTs pueden interactuar con las triazinas a través de interacciones $\pi-\pi$ y también, pueden crear interacciones de intercambio iónico con los grupos carbonílicos de los c-CNTs [223] como enlaces de hidrogeno e intercambio iónico, estas interacciones deben ser consideradas.

En el caso del piriproxifeno (**Tabla 27**) la utilización de la columna capilar de c-MWNTs-PDMS_{TRB-35} fue la mejor opción, se consiguieron LODs menores probablemente debido a las interacciones $\pi-\pi$ entre los grupos aromáticos del analito y de los CNTs inmovilizados en la superficie del capilar [224].

Estudio de la capacidad de extracción para los pesticidas organofosforados

La influencia de CNTs en el sorbente de PDMS fue también evaluada para clorpirifos. En este caso pequeñas diferencias fueron observadas para las diferentes columnas capilares propuestas. Estudios anteriores demostraron mejores extracciones de este compuesto utilizando CNTs [225, 226], sin embargo en nuestro caso no se observaron diferencias significativas para c-SWNTs o c-MWNTs, la recuperación fue del 14% [227] utilizando las columnas capilar comerciales y del 16% para las columnas capilares modificadas con CNTs.

Estudio de la capacidad de extracción del PDMS-CNTs para los PAHs

La funcionalización de los capilares con CNTs mejoró la retención de los PAHs y se observaron LODs bastante menores tanto para c-SWNTs PDMS_{TRB-5} como c-MWNTs PDMS_{TRB-5}. (Ver **Figura 54**). Debido a que los PAHs son poco polares el

capilar funcionalizado PDMS_{TRB-5} consiguió mayor retención que el PDMS_{TRB-35}. La disminución de los LODs observada en los capilares funcionalizados con CNTs puede explicarse debido a las interacciones π - π entre los anillos aromáticos de los PAHs y los CNTs.

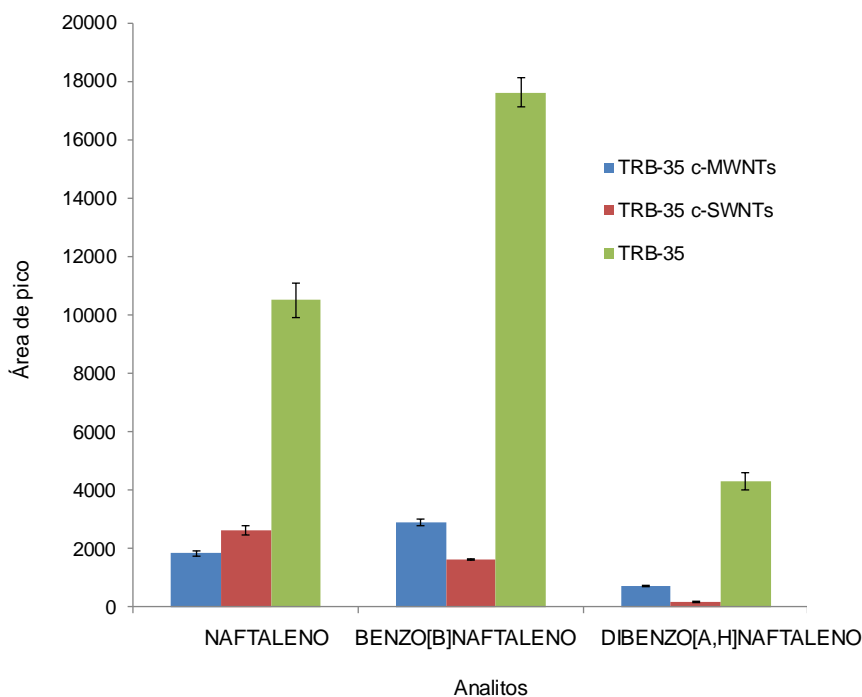


Figura 54. La respuesta analítica de los PAHs con las columnas capilares PDMS y c-CNT-PDMS utilizadas en el sistema IT-SPME.

La precisión

La precisión se evaluó para todos los analitos, utilizando una concentración de 50 $\mu\text{g/L}$ para triazinas y piriproxifeno 100 $\mu\text{g/L}$ para los PAHs. Las desviaciones estándar relativas (% RSD) obtenidas fueron inferiores al 9% (**Tabla 26**). Estos resultados indican que los valores RSD% son satisfactorios para todas las columnas capilares estudiadas. La precisión-capilar-a-capilar se evaluó comparando la eficacia de extracción obtenida para una mezcla de las triazinas (50 $\mu\text{g/L}$) o PAHs (100 $\mu\text{g/L}$) con dos columnas capilares de c-CNT-PDMS preparadas en condiciones idénticas. Los valores de % RSD-capilar-a-capilar fueron inferiores a 16 % para todos los analitos testados. Teniendo en cuenta los bajos valores de RSD se puede afirmar que las columnas capilares de PDMS modificados con c-CNTs son un método fiable y reproducible para la extracción de los analitos en IT-SPME.

Tabla 26. LODs ($\mu\text{g/L}$) y RSD (%) obtenido para cada analitos según la columna capilar utilizada.

Columnas capilares:	PDMS _{TRB 5}		c-SWNTs- PDMS _{TRB 5}		c-MWNTs- PDMS _{TRB 5}		PDMS _{TRB 35}		c-SWNTs- PDMS _{TRB 35}		c-MWNTs- PDMS _{TRB 35}	
	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
ANALITOS:												
2-OH-TBA	1.2	3.5	1.8	16	2	14	4.3	5	1.2	7	6.1	12
DES-TBA	1.9	4	1.2	6	6.5	7	5.2	4	4.1	7	3.8	9
Atrazina	3.8	1.2	3.8	3	7.7	4	7.3	3	6	1.3	6.9	2
Propazina	2.3	0.7	3.9	1.9	1.1	5	3.4	1.1	2.2	1.1	2.1	2
TBA	1.5	0.4	0.9	0.8	1.1	1.3	1.6	0.5	1.8	0.4	1.2	0.6
Clorpirifos	1.4	0.07	1.6	0.07	3	0.06	0.4	0.06	0.1	0.05	0.4	0.05
Piriproxifeno	1.8	0.1	1.2	0.06	2.2	0.050	1.6	0.08	0.8	0.08	1.2	0.07
Naftaleno	7.3	0.15	5.7	0.23	4.9	0.33	7.6	0.23	6.5	0.06	5.1	0.07
Benzo[b]fluoranteno	8.5	0.35	2.8	0.37	7.7	0.21	2.7	0.17	1.5	0.03	4	0.07
Dibenz[a,h]antraceno	4.2	3.85	6.8	0.33	6.3	0.83	6.4	0.88	8.6	0.05	4.7	0.29

Evaluación de la correlación entre la capacidad de absorción y el Log K_{ow}

Finalmente, se evaluó la correlación entre capacidad de adsorción y Log K_{ow} utilizando la siguiente ecuación:

$$PR = \frac{PA_{C-CNTs-PDMS}}{PA_{PDMS}}$$

donde PA es el área del pico para los respectivos sorbente. La **Tabla 27** muestra los valores del factor de preconcentración (PR) por cada analito para los diferentes capilares PDMS_{TRB-5}, PDMS_{TRB-35}, c-SWNTs PDMS_{TRB-5}, c-SWNTs PDMS_{TRB-35}, c-MWNTs PDMS_{TRB-35}, c-MWNTs PDMS_{TRB-35}. Los valores de RP son distintos de los valores de log K_{ow}, compuestos con polaridades muy similares como el TBA y el antraceno tienen PR muy diferentes lo que indica que el Log K_{ow} no puede explicar el factor PR observado. Hay una diferencia significativa comparada con las columnas comerciales donde las diferencias de polaridad explican la interacción de los analitos con la columna capilar IT-SPME. En el caso de las columnas capilares funcionalizadas otras interacciones como las π-π staking, enlaces de hidrogeno y interacciones de intercambio iónico deben ser consideradas.

Los PAHs tienen los PR más altos, comparados con las demás familias de compuestos, especialmente utilizando c-SWNTs PDMS_{TRB-35} lo que indica que el RP depende de las interacciones π-π entre los anillos aromáticos y los CNTs [228]. La absorción de los PAHs depende del tamaño del sistema electrónico conjugado de las moléculas orgánicas adsorbidas en la superficie de los CNTs.

Tabla 27. Factor de preconcentración (PR) y Log K_{ow} de los compuestos analizados.

Analitos	Log K _{ow} [196]	c-SWNTs- PDMS _{TRB 5}	c-MWNTs- PDMS _{TRB 5}	c-SWNTs- PDMS _{TRB 35}	c-MWNTs- PDMS _{TRB 35}
2-OH-TBA	1.82	0.6	0.4	0.2	0.2
DES-TBA	2.30	0.8	0.4	0.7	0.9
Atrazina	2.61	2.1	1.3	0.4	0.3
Propazina	2.93	1.0	1.1	0.4	0.1
TBA	3.21	1.4	0.8	0.5	0.3
Naftaleno	3.37	4.0	3.2	0.6	0.5
Clorpirifos	4.96	1.1	1.2	1.1	1.1
Piriproxifeno	5.37	1.0	1.1	1.8	1.9
Benzo[b]fluoranteno	6.04	4.9	2.4	0.9	1.7
Dibenz[a,h]anteno	6.86	6.3	3.0	1.2	4.6

La mayor respuesta analítica se ha observado para la columna capilar c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} para el análisis de PAHs en el sistema IT-SPME-Cap-LC y respuestas muy similares se han observado para las triazinas que las que se obtienen para capilar c-SWNTs-PDMS_{TRB-35}. Sin embargo, el piriproxifeno y los clorpirifos se han extraído mejor con c-MWNTs-PDMS_{TRB-35} y c-SWNTs-PDMS_{TRB-35} respectivamente, significa que las interacciones con el sorbente son diferentes dependiendo del compuesto estudiado.

5.3.4 Conclusiones

- a) La funcionalización del capilar con c-SWNTs-PDMS y c-MWNTs-PDMS se ha llevado a cabo con éxito.
- b) Analitos muy diferentes; triazinas, organofosforados, piretroides y PAHs han sido analizados por este método.
- c) La absorción del capilar funcionalizado con CNTs se ve mejorada para analitos como los PAHs, obteniéndose límites de detección menores. Donde los CNTs interactúan principalmente a través de interacciones π - π stacking con los analitos.
- d) Clorpirifos fue mejor extraído por c-MWNTs-PDMS_{TRB-5} y el piriproxifeno por el c-MWNTs-PDMS_{TRB-35}.
- e) Para un análisis de todos los analitos conjuntamente la mejor opción sería utilizar el capilar c-MWNTs-PDMS_{TRB-5}.
- f) Este estudio demuestra que la capacidad que el capilar tiene para adsorber los analitos depende no solo de la polaridad de los analitos ($\log K_{o/w}$) sino también de las diferentes interacciones que se pueden establecer con los CNTs.

CAPÍTULO 6.
EL PDMS COMO ENCAPSULANTE DE REACTIVOS
PARA SU DISPENSACIÓN Y EL DESARROLLO DE
SENSORES

En esta Tesis se propone una nueva aplicación para el PDMS; el encapsulamiento de reactivos derivatizantes para su dispensación y para el desarrollo de sensores. El PDMS resulta ser un buen soporte polimérico para el diseño de sensores sólidos (**Sección 6.1 y 6.2**) y un buen encapsulante a la vez que dispensador de reactivos en disolución acuosa (**Sección 6.3**).

En este Capítulo se analizará su función protectora e estabilizante de colorantes y otros reactivos embebidos, la difusión de los analitos al interior del PDMS en matrices en aire (**Sección 6.1**) y en matrices acuosas (**Sección 6.2**), y la difusión de los reactivos derivatizantes a las matrices acuosas (**Sección 6.3**). Con el fin de mejorar la sensibilidad se modificará la matriz polimérica para disminuir la hidrofobicidad del PDMS (**Sección 6.1.2**). Este proceso se consiguió de forma sencilla en una sola etapa (**Sección 6.1.2**). Los sensores desarrollados se utilizaron para la detección in situ de aminas (en aire) (**Sección 6.1**, ver [128]), aminas más complejas como las anfetaminas (en agua) (**Sección 6.2**, ver [153]) y amonio (en agua) (**Sección 6.3**, ver [166]).

6.1 SENSOR PARA LA DETERMINACIÓN IN SITU DE AMINAS VOLÁTILES

En este trabajo se describe un método nuevo para la modificación de PDMS a partir de Sylgard PDMS 184. Este método está basado en la adición de un compuesto de silicio más hidrófilo, el tetraetilortosilicato (TEOS) [229, 128]. Diferentes cantidades de TEOS, (como precursor de las reacciones de policondensación sol-gel) han sido ensayadas para el diseño de los sensores. El reactivo derivatizante se ha embebido a través de su disolución con TEOS y adición a la matriz polimérica durante el proceso de curado (Ver **Figura 55A**). Este método de síntesis de los sensores presenta varias ventajas: 1) TEOS modifica la estructura de la matriz pero no modifica su composición, así es posible impartir hidrofobicidad evitando reacciones no deseadas en la matriz; 2) la estabilidad de la estructura se mantiene en la matriz híbrida, y 3) la matriz protege los colorantes incorporados y conserva sus propiedades ópticas. Además, permite que la reacción de derivatización tenga lugar en el interior de la matriz polimérica, y el sensor sólido cambie de color (Ver **Figura 55B**). Los sensores desarrollados han dado lugar a la **Patente ES248247B1** y se han utilizado para la estimación in situ y la discriminación de aminas volátiles a través de una detección pasiva.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

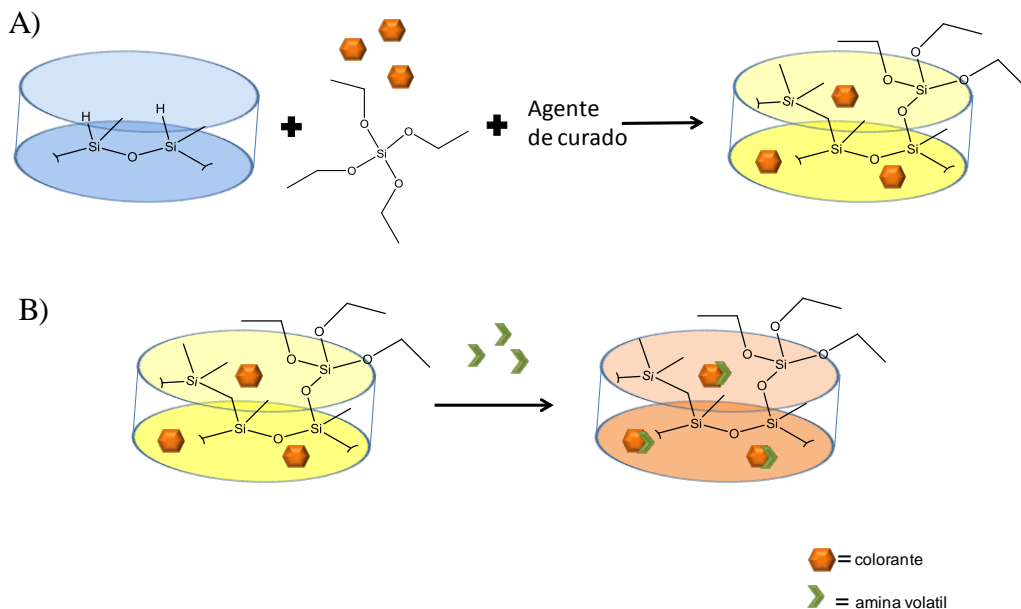


Figura 55. A) Síntesis de los sensores mediante la inmovilización del reactivo, primero se disuelve el TEOS, se añade el elastómero base de PDMS y finalmente, se añade el agente de curado. B) Representación esquemática de la respuesta de los sensores a aminas volátiles.

6.1.1 Preparación del sensor

El kit de PDMS Sylgard Elastomer 184 contiene dos partes: un elastómero base que es dimetilvinil-terminal dimetilsiloxano y un agente de curado el metilhidrógeno dimetilsiloxano (**Figura 56**). La formación del polímero de PDMS se basa en la reacción entre el grupo hidruro de silicio (Si-H) y el grupo vinilo (Si-CH = CH₂) en presencia de un catalizador de platino [230]. Se basa en una reacción de hidrosililación catalizada por un metal de transición. El ciclo catalítico tiene dos rutas alternativas; ambas rutas comienzan con la adición oxidativa de hidrosilano ((R)₃-Si-H), seguido por la inserción migratoria del alqueno coordinado ya sea en el enlace MH (hidrometalación) o en el enlace MSI (sililmetalación). El paso final es una eliminación reductora, que libera el producto y el catalizador se recicla (**Figura 56**).

(Ver **Sección 3.4.1** sobre la síntesis de los sensores, así como la **Tabla 15**).

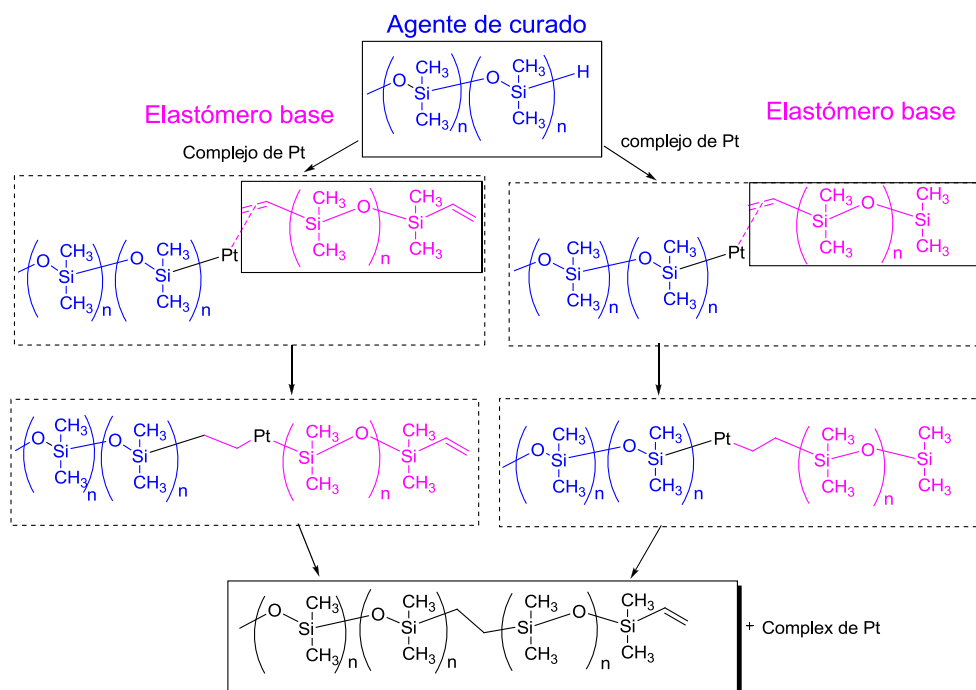


Figura 56. Síntesis del PDMS utilizando el kit PDMS Sylgard 186.

Elección del disolvente

Disolventes con diferentes polaridades fueron evaluados con el fin de establecer la mejor afinidad entre disolvente-colorante-PDMS en ausencia de TEOS. El disolvente fue elegido considerando: a) su solubilidad en PDMS, b) la solubilidad del colorante en PDMS, c) no debe reaccionar con el colorante, y no debe afectar al proceso de solidificación del PDMS y, finalmente, d) su toxicidad. Se observó que cuando se empleaba el etanol (films de PDMS (F1a-F1c), **Tabla 28**) y el cloroformo (F6) el film necesitaba tres días para ser curado, mientras que con acetona (F8a-b) con un día era suficiente. Además, admitía una mayor cantidad de disolvente para la preparación del PDMS. Cuando se utiliza agua (F7) se observa una pérdida de color y la formación de burbujas, el resultado es una mala homogeneización y compactación del gel.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

Mediante el parámetro de solubilidad establecido en [39] (**Tabla 28**) es posible predecir el comportamiento del polímero frente al disolvente sin necesidad de conocer otro aspecto más del mismo. De esta forma, los disolventes que tienen un parámetro de solubilidad similar a la de PDMS, generalmente, mostraron una alta solubilidad en PDMS. Tanto el cloroformo como la acetona, no polares y apróticos, mostraron una alta solubilidad en el polímero. El etanol, con una solubilidad moderada mostró buena compatibilidad con PDMS usando cantidades inferiores a las que se puede utilizar con cloroformo. Finalmente, el agua ($\delta = 23.4$) que presenta un parámetro de solubilidad bastante diferente del PDMS muestra una baja solubilidad en PDMS ($\delta = 7.3$). Queda demostrado que los films de PDMS se pueden obtener usando diferentes tipos de disolventes, con un volumen de disolvente adecuado. Se estableció que los solventes con parámetro de solubilidad en el rango $9.9 < \delta \leq 12.9$ permitían volúmenes de 0,35 ml/g de polímero, y los solventes con $7.3 < \delta \leq 9.9$ admitían hasta 0.7 ml/g de polímero. Resulta útil conocer las cantidades óptimas para los diferentes disolventes, con el fin de poder extender la metodología y inmovilizar diferentes colorantes con diferente solubilidad.

Tabla 28. Características químico-físicas de los disolventes evaluados. Ver **Tabla 15** para conocer la composición de los sensores.

Dispositivo	Disolvente	Volumen (mL)	Polaridad	Parámetro de solubilidad (δ , cal ^{1/2} cm ^{-3/2})
F1a	Etanol	0.7	Polar prótico	12.9
F1b-c	Etanol	0.35	Polar prótico	12.9
F6	Cloroformo	0.7	Aprótico	9.9
F7	Agua	0.35	Polar prótico	23.4
F8a-b	Acetona	0.35	Apolar Protico	9.4
PDMS	-	-	Hidrofóbico	7.3

Elección de los reactivos embebidos en el PDMS

Se utilizaron dos reactivos derivatizantes para la detección de aminas; el 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) y el 4-(N,N-dioctilamino)-4' trifluoroacetilazobenceno (ETH^T 4001). El NQS fue seleccionado para determinar y discriminar aminas primarias y secundarias. El NQS cambia de color de amarillo a marrón-gris o a naranja-rojo en presencia de aminas primarias y secundarias respectivamente. El ETH^T 4001 fue seleccionado para determinar aminas terciarias, el reactivo cambia de color en presencia de aminas terciarias de rojo a amarillo. Aunque este último no es selectivo para aminas, también muestra respuesta frente a grupos hidroxilos, en los sensores de PDMS, la hidrofobicidad del PDMS evita esta reacción no deseada. El NQS fue previamente disuelto en etanol mientras que se utilizó acetona para disolver el ETH^T 4001 (evitando la

presencia de grupos OH) y fueron embebidos en el PDMS. En el caso de los sensores híbridos se suspendieron en TEOS (Ver **Sección 3.4.1**).

6.1.2 Caracterización del sensor

Para caracterizar la composición de la matriz se utilizaron diferentes técnicas; Espectroscopía de infrarrojo de transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) y Resonancia Magnética Nuclear de estado sólido para el ^{29}Si (^1H RMN-MAS). En la **Figura 57** se pueden ver las bandas características del PDMS para los enlaces de balanceo $-\text{CH}_3$, extensión $\text{Si}-\text{CH}_3$ ($753, 785 \text{ cm}^{-1}$), estiramiento simétrico $\text{Si}-\text{O}$ (800 cm^{-1}), estiramiento asimétrico $\text{Si}-\text{O}$ ($1000-1150 \text{ cm}^{-1}$), deformaciones simétricas $\text{Si}-\text{CH}_3$ at 1257 cm^{-1} y C-H extensión en $-\text{CH}_3$ ($2901, 2960 \text{ cm}^{-1}$). Por otro lado para el TEOS podemos ver sus bandas características de balanceo para el CH_3 , así como para el $\text{Si}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ($950, 1066, 1100, 1167 \text{ cm}^{-1}$). Se seleccionaron sensores de PDMS y PDMS híbridos F2 (70:30) F3 (50:50) F4 (60:40) y F5 (20:80) de (PDMS:TEOS) para estudiar las propiedades del film al incrementar la concentración de TEOS. Como era de esperar las bandas para el enlace $\text{Si}-\text{CH}_3$ del PDMS disminuyeron al disminuir el porcentaje de PDMS (Ver en la **Figura 57A** del film F1b al F4 films). Sin embargo, se observó que la banda $\text{Si}-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_3$ ($950, 1066, 1100, 1167 \text{ cm}^{-1}$) debida al TEOS desapareció en los films F2-F4, pero continuaba presente en el film F5. La banda $\text{Si}-\text{O}$ a $1020-1100 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al PDMS aumentaba con la concentración de TEOS. La ausencia de la banda para el TEOS y el incremento de la banda de estiramiento asimétrico $\text{Si}-\text{O}$ band ($\sim 1055 \text{ cm}^{-1}$) del film híbrido para F2 al F4 podría explicarse como consecuencia de un proceso sol gel. (Ver **Figura 57**). De esta manera el TEOS podría haberse hidrolizado y condensado para formar enlaces $\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$ durante el proceso de hidrosilación.

Para el film híbrido F5 (que contiene la mayor cantidad de TEOS) los registros de IR mostraron, además de las bandas características del TEOS, un grupo funcional vinilo $\text{C}=\text{C}$ (1597 cm^{-1}). Esto demuestra que el TEOS no se ha visto modificado y el elastómero base no se ha polimerizado para formar PDMS, por tanto en el sensor F5 la polimerización no fue efectiva (Ver en **Figura 57A**, la banda $\text{C}=\text{C}$ a 1597 cm^{-1})

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

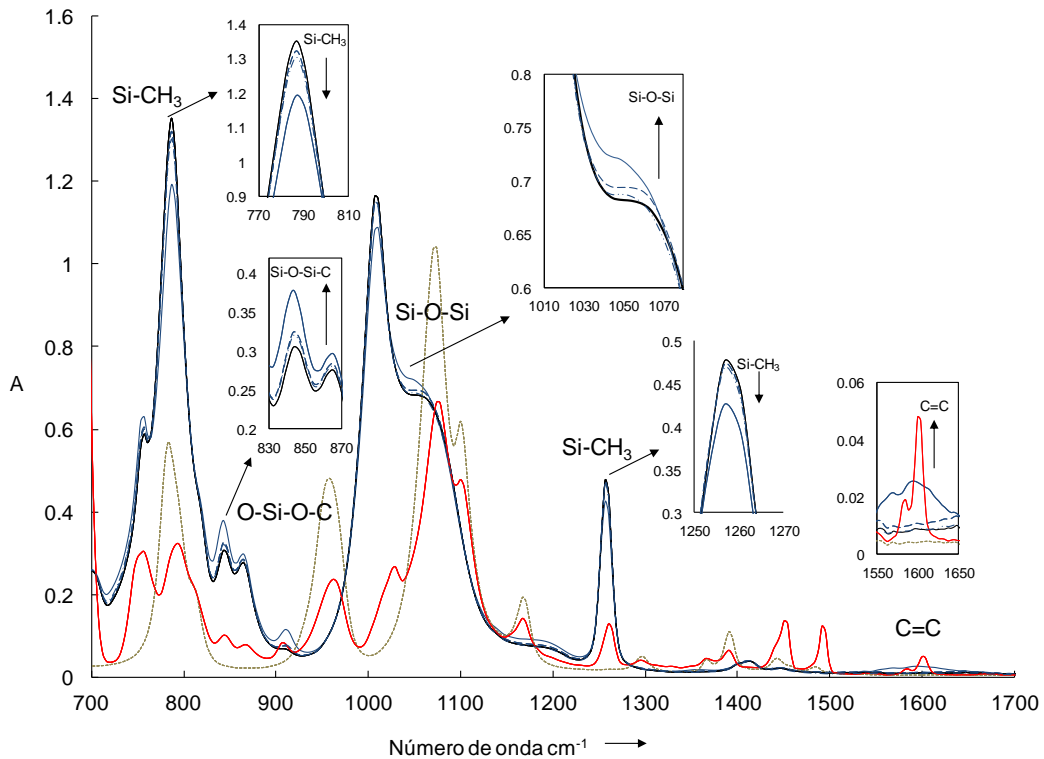


Figure 57. A) Espectra de ATR-FTIR de los films de PDMS y PDMS/TEOS. — F1, - - - F2, . . . F3, — F4, F11 and — F5. Se añadió también el espectro del TEOS - - - -.

El pico a 908 cm^{-1} podría asignarse al PDMS: Si-O de estiramiento en Si-OH y dos picos a 842 y 862 cm^{-1} podrían asignarse al grupo Si-O-Si-CH₃. La intensidad de estos dos picos aumenta desde F1b (PDMS puro) a los híbridos F2, F3 y F4. Si la hidrólisis del TEOS tiene lugar, pueden ocurrir diferentes procesos (**Figura 58**): a) autocondensación del TEOS hidrolizado (derivado de la ausencia de las bandas a 950 , 1066 , 1100 , 1167 cm^{-1}), b) copolimerización de TEOS y fragmentos de PDMS (presencia de bandas Si-O-Si-CH₃ a 842 y 862 cm^{-1}) y c) autocondensación de los grupos PDMS-OH (presencia de banda a 908 cm^{-1} para PDMS-OH). Los films F2-F4 con cantidades adecuadas de TEOS (Ver **Tabla 15**) son eficientemente hidrolizadas y el proceso de curado del PDMS no se ve afectado, los films solidifican.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

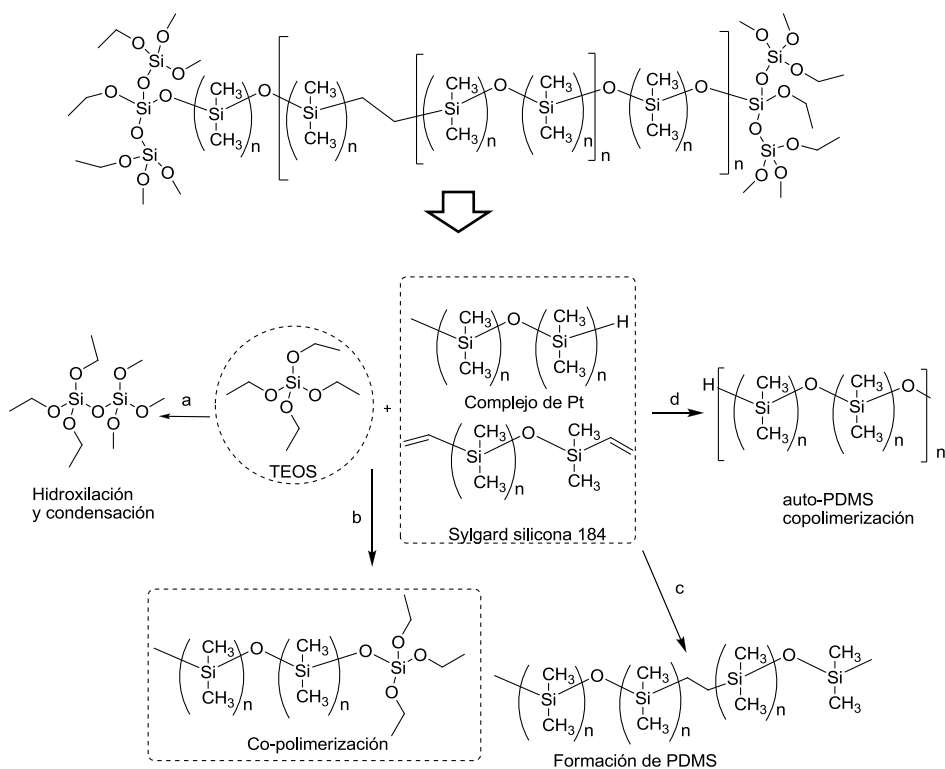


Figura 58. Estructura idealizada del híbrido TEOS_PDMS y sus posibles reacciones de formación.

También se realizaron estudios de RMN de estado sólido para ^{29}Si (RMN-MAS) (Ver **Figura 59**). El espectro observado para los films F1-F4 es bastante similar. Pueden distinguirse dos regiones, la región orgánica (unidades D) a campo bajo y la región inorgánica (unidades Q) a campo alto. En la región orgánica hay dos bandas, una banda a -12 ppm debida a la cadena terminal de grupos $[\text{OSi}(\text{CH}_3)_2]_n$ y otra a los -22 ppm que puede ser asignada a los grupos $(\text{SiO}_4)\text{Si}$ presentes en el agente de entrecruzamiento (tetra(trimetilsiloxano)silano en un porcentaje del <10% en la silicona Sylgard 184. La intensidad de la banda no depende del porcentaje de PDMS. Esta observación sugiere que el TEOS podría actuar como agente de entrecruzamiento si la cantidad de PDMS decrece (**Tabla 15**) facilitando la polimerización del PDMS (banda a 22 ppm en **Figura 59**). La banda a -80 ppm podría indicar la presencia de unidades Q^3 como $(\text{SiO}_3)\text{-OH}$ que podrían explicar la hidrólisis del TEOS.

Las siliconas son susceptibles de hidrolizarse en presencia de agua, bajo condiciones de alta acidez o basicidad. En los experimentos realizados no se han utilizado estas condiciones, con lo que no cabe esperar que la hidrólisis se produzca, sin embargo

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

es posible que se dé un proceso no hidrolítico. Estudios anteriores [231, 232] muestran esta posibilidad en ausencia de agua y en presencia de un grupo hidroxilo y un alcoxilano. La hidrólisis consiste en un ataque nucleófilo del oxígeno del grupo hidroxilo (-OH) y la pérdida del grupo $-OC_2H_5$. En este caso, los grupos OH pueden provenir del etanol en los films F1b. En los films F4 (PDMS-H/TEOS) se sugiere que el catalizador podría contener trazas de agua, alcohol o ácidos suficientes para envenenar el catalizador [233] y desencadenar la hidrólisis.

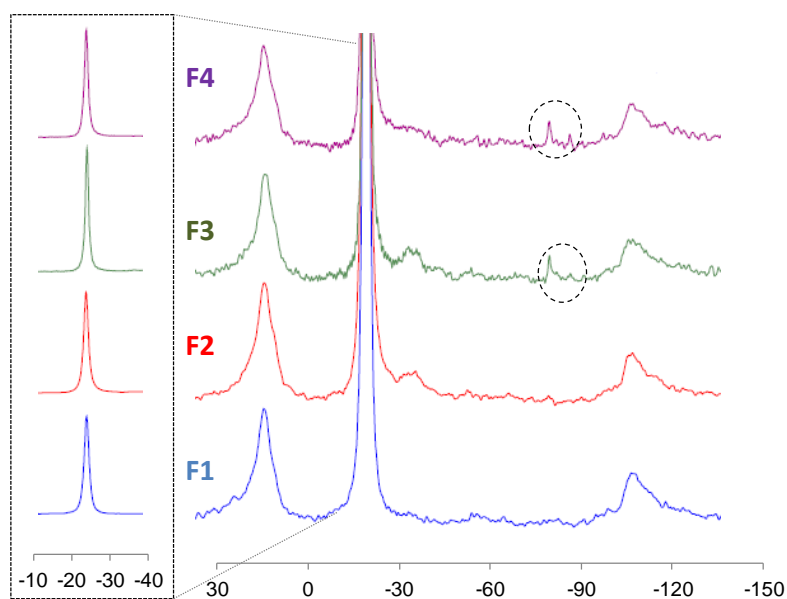


Figura 59. Espectro de ^{29}Si RMN-MAS para los films de PDMS/TEOS: — F1 — F2 — F3 — F4.

La morfología de los films fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM). Como se puede ver en la **Figura 60** es posible diferenciar dos zonas entre el film F1b y el F4 (Ver **Tabla 15**) para conocer la composición de los films. Así, en el film híbrido F4 se pueden observar dos zonas, una correspondiente a la superficie y otra a la parte interna del polímero (**Figura 60**).

Esta observación respalda el comportamiento observado de los films, la elasticidad y hidrofobicidad (**Figura 61**) que decrecen del film F1 al F4. Ambas propiedades fueron evaluadas cualitativamente. En la **Figura 61** se muestra el ángulo de contacto de una gota de agua sobre un film a) de PDMS y b) PDMS/TEOS. Se observa que es el PDMS es hidrofóbico ($117^\circ > 90^\circ$) mientras que el film F4 de PDMS/TEOS es hidrofílico ($78^\circ < 90^\circ$).

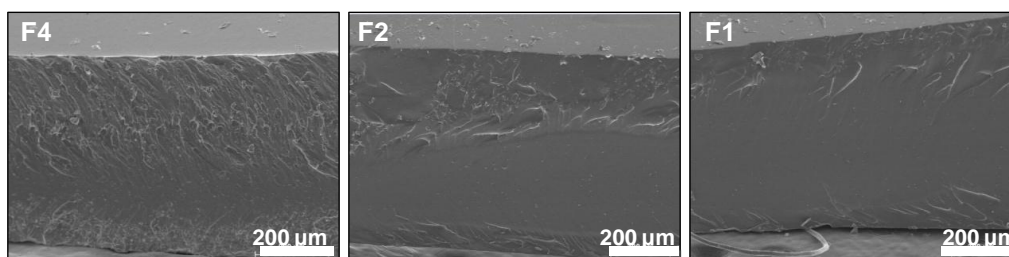


Figura 60. Imágenes de SEM para una cantidad creciente de TEOS en los films F1, F2 y F4.

En la **Tabla 29** se muestran diferentes procesos químicos para impartir hidrofiliicidad a la superficie del PDMS. El proceso [128] propuesto solo consta de una etapa y utilizada dos reactivos.

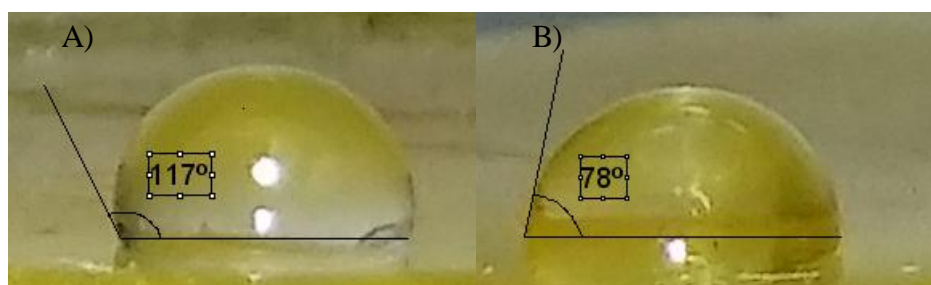


Figura 61. Ángulo de contacto en a) film de PDMS (F1) y b) film híbrido PDMS-TEOS (F4).

6.1.3 Respuesta del sensor y parámetros analíticos

La respuesta de los sensores en patrones gaseosos fue evaluada considerando dos factores, el tiempo de exposición del sensor y la concentración de aminas en aire (Ver **Sección 3.2: Figura 26** para conocer el montaje utilizado y **Sección 3.5.5: Tabla 18** para conocer las condiciones experimentales empleadas para la obtención de la respuesta del sensor). Los mejores resultados se observaron para el sensor F4. En la **Figura 62** se pueden ver las respuestas visuales de los sensores; para los sensores de NQS se observaron colores marrones-grises para las aminas primarias y colores rojos-ananjados para las secundarias (**Figura 62A**).

Tabla 29. Procesos químicos para impartir hidrofiliidad al PDMS Sylgard 184

Etapas	Materiales	Aplicación	Ref	
<p>Impartiendo hidrofiliidad al PDMS-H comercial mediante tratamiento químico</p> <p>Adhesión del hidrogel al PDMS utilizando un polisacárido como adhesivo</p>	<p>La superficie de PDMS se modificó químicamente en la superficie con alginato:</p> <p>1) Oxidación: PDMS-OH 2) Siliación con APTES: PDMS- NH₂ 3) El acoplamiento entre grupos amino y el ácido carboxílico: PDMS-alginato 4) la <i>crosslinking</i> iónico con los iones de calcio o <i>crosslinking</i> covalente con AAD.</p>	<p>1) El kit de Silicona Elastomero 184 Sylgard 2) Peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico 3) 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) 4) Alginato 5) Sulfonato N-hidroxisuccinimida, ácido adípico 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) carbodiimida y dihidrazida (AAD)</p>	<p>Estudiar el efecto de la fuerza mecánica externa en células adheridas al hidrogel</p>	234
<p>Preparación de una nanopelícula antiadherente en PDMS imitando el glicocálix</p>	<p>El Si-H residual de PDMS se modificó superficialmente con un polisacárido:</p> <p>1) PDMS se sumergió en una solución acuosa de polisacárido metilado 2) La muestra se lavó varias veces con agua y se secó con un flujo de aire</p>	<p>1) El kit de Silicona Elastomero 184 Sylgard 2) Metilcelulosa</p>	<p>Nanofilm antiadhesivo para algunas proteínas y bacterias</p>	235

Impartiendo hidrofilicidad al PDMS-H comercial mediante tratamiento químico*	Etapas	Materiales	Aplicación	Ref
Funcionalización del PDMS utilizando Thiol–Ene Click Chemistry	<p>El PDMS se modificó con grupos tioles vía catalítica con MTS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Un disco de PDMS fue introducido en una disolución de base / MT con ultrasonidos 2) Se lavó con metanol y se somió. 3) Se extrajo en DCM fresco y se secó con nitrógeno. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Kit de Silicona Elastomero 184 kit Sylgard 2) (3-Mercaptopropil)trimetoxisilano (MTS) 3) KOH, metanol and diclorometano (DCM) 	-	236
PDMS funcionalizado con 3-aminopropiltrietosilano (APTES) y etilenglicol (PEG-s).	<p>PDMS funcionalizado con APTES y PEG-s:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) silanación por incubación con una solución de H₂O₂, H₂O: HCl 2) Se lavó con agua y se secó bajo una corriente de nitrógeno. 3) Una solución de APTES y PEG-silano se disolvió en etanol y se calentó. 4) Se enjuagó varias veces con etanol y se secó bajo una corriente de nitrógeno 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Kit de Silicona Elastomero 184 Sylgard 2) 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) 3) Polietileno Glicol (PEG-Silane) 4) Tampón lisis 5) Agua, peróxido de hidrógeno, cloroformo y etanol. 	<p>Microdispositivo para la purificación y transcripción reversa del mRNAs</p>	237
Hidrofilicidad del PDMS en una sola etapa embebiendo tetraetilortosilicato (TEOS)	<ol style="list-style-type: none"> 1) El PDMS y TEOS se mezclan y se dejan a T ambiente durante 2-5 días. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Kit de Silicona Elastomero 184 Sylgard 2) Tetraetilortosilicato (TEOS) 	<p>Sensor óptico para la discriminación in situ de aminas volátiles</p>	128 En esta Tesis

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

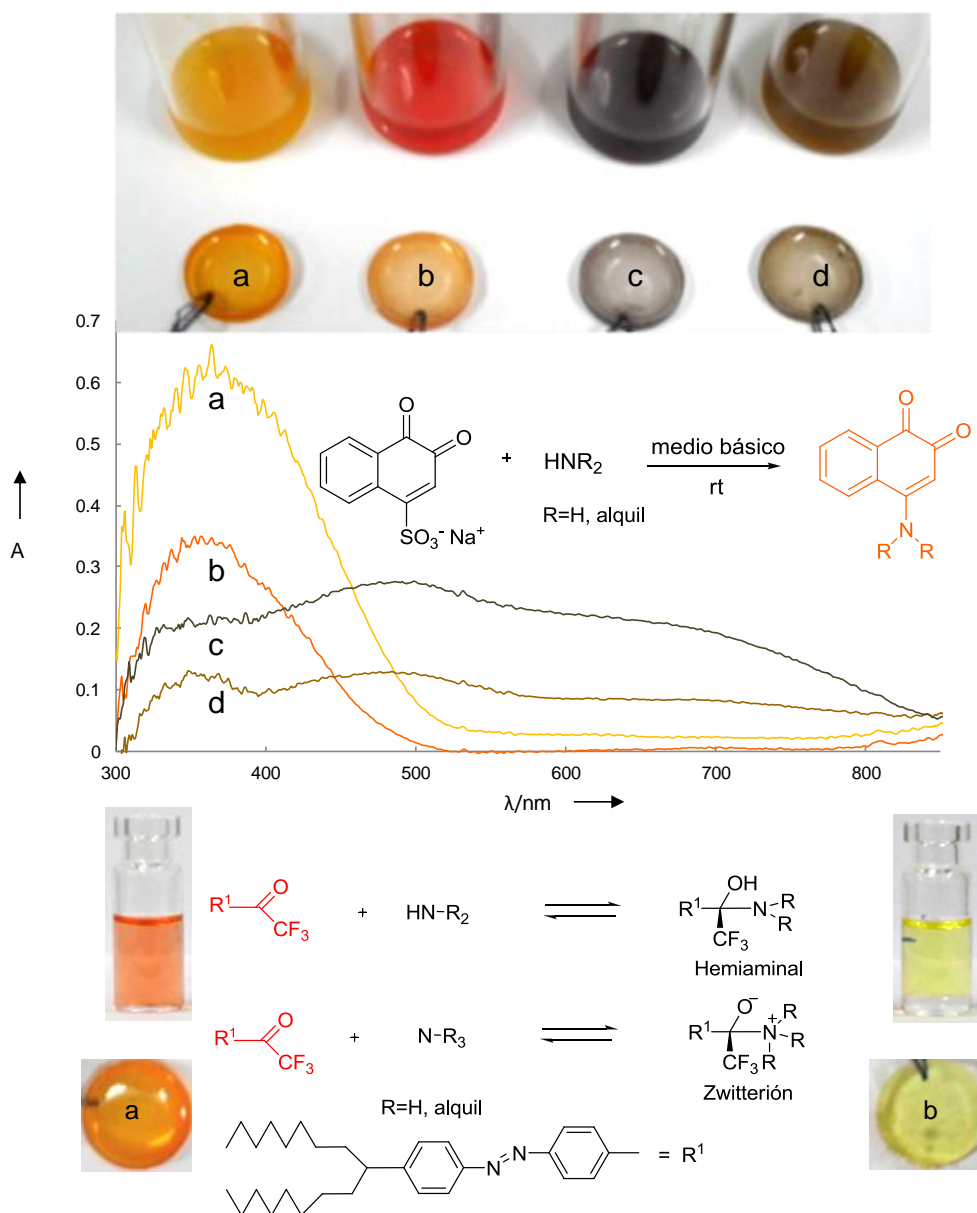


Figura 62. A) Respuesta del 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) en presencia de a) dimetilamina, b) dietilamina, c) metilamina and d) etilamina en agua y en aire con el sensor F1b. Respuesta del N,N-dioctilamino)-4' trifluoroacetilazobenzeno (ETH^T 4001) en presencia de trimetilamina en agua y en aire con el sensor F8a.

En el caso de los sensores de ETH^T 4001 se observaron colores amarillos para las aminas terciarias (**Figura 62B**). Los LODs para la detección de metilamina y

dimetilamina por el sensor NQS-PDMS/TEOS fueron de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ en 1 hora. (**Figura 63A, 63B**). Además, se observó que es posible mejorar los LODs en un factor de 2.5 aumentando el tiempo de muestreo a 4 h. Se obtuvieron LODs y LOQs similares para los sensores no híbridos (NQS-PDMS) pero con un tiempo de exposición de 8 h en vez de 1 h como en el sensor híbrido F4 (Ver la **Figura 63C, 63D**). También la respuesta de los sensores a la presencia de amonio fue evaluada como posible interferente en la detección de aminas, los sensores muestran respuesta después de 24 h (Ver **Tabla 30**). Los compuestos evaluados fueron metilamina, etilamina, dimetilamina y dietilamina. El sensor después de estar expuesto a estos compuestos muestra colores característicos para cada una de las aminas, se puede apreciar como las aminas primarias poseen tonalidades marrón-gris y las secundarias rojo-naranja (**Figure 63A**). En cuanto a la reproducibilidad, la RSD para la respuesta del sensor F4 (n=5) fue de 9% y la RSD entre la respuesta de sensores obtenidos con diferentes síntesis (n=3) fue de 10%. Los dispositivos pueden ser utilizados para estimar el valor límite umbral (TLV) para las aminas (i.e. in 8 h: $3,8 \text{ mg m}^{-3}$ de aire a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ y $1.013 \times 10^5 \text{ Pa}$ o $2 \text{ ppm (m}^{-3}\cdot\text{ml)}$), y el de exposición corta de: $9.4 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ o 5 ppm valores legislados para dimetilamina [238]. La normativa Europea establece un porcentaje del 25% de tiempo de exposición (8 h) si la atmosfera es uniforme. Si el muestreo es de 1 h, solo dos muestras son necesarias. El límite de detección expresado como $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ considerando 60 minutos de muestreo y a $30 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ fue 1.1 para un método de muestro activo [239]. El sensor pasivo F4 propuesto en este trabajo consigue unos LODs similares a un muestreo activo sin necesidad de una fuente de energía externa (ver **Tabla 30**).

Tabla 30. Respuesta de los sensores para patrones gaseosos de aminas.

Sensor	Amina	Color sensor	Color respuesta	(mg m^{-3})/ Tiempo(h)	LQ $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$	LD $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$
F4	MeNH_2	amarillo	marrón	5-50/ 1	5	1.5
F4	Me_2NH	amarillo	naranja	5-50 / 1	5	1.5
F1b	MeNH_2	amarillo	marrón	5-50 / 8	5	1.5
F1b	Me_2NH	amarillo	naranja	5-50 / 8	5	1.5
F1b	NH_3	amarillo	marrón	10 / 24	10	3
F8a	MeNH_2	naranja	amarillo	50-500/ 8	50	15
F8b	Me_3N	naranja	amarillo	10^3 - 10^4 / 8	1000	300

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

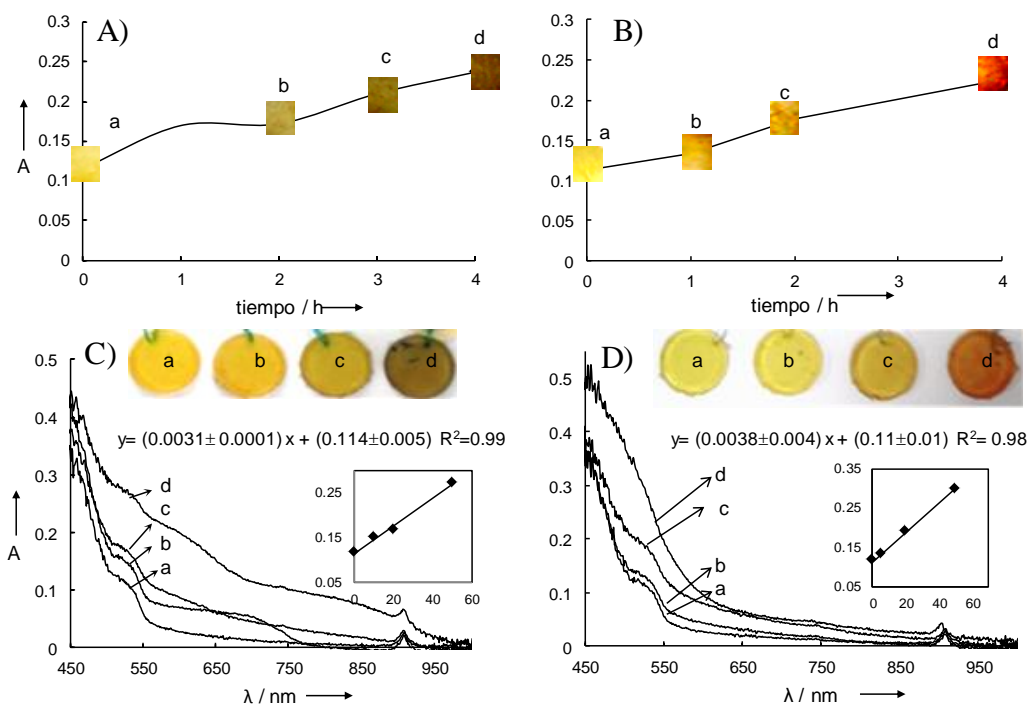


Figura 63. Representación de la absorbancia a 525 nm para el sensor F4 para A) metilamina, B) dimetilamine 5 mg·m⁻³ durante a) 1, b) 2, c) 3, d) 4 h. Representación de la absorbancia a 525 nm para el sensor F1b para A) metilamina, B) dimetilamine en concentraciones a) 0, b) 10, c) 20, d) 50 mg·m⁻³ durante 8h. Las mediciones se llevaron a cabo por reflectancia difusa.

Las aminas terciarias no reaccionan con el NQS, así que el ETH^t 4001 fue utilizado para la detección de trimetilamina y trietilamina (Sensores F8a, F8b y F9). En este caso el color del sensor cambió de naranja a amarillo después de una exposición de 1 g·m⁻³ para la trimetilamina y de 5 g·m⁻³ para la trietilamina durante 8 horas. La reversibilidad de la reacción ETH^t 4001 con las aminas observadas en disolución, también se observó en el sensor, por tanto los sensores F8a, F8b y F9 son sensores reversibles.

6.1.4 Aplicación a muestras reales

Los sensores F4 se utilizaron para detectar pescado en mal estado. Se observó un cambio de color en el sensor después de 5 días de dejarlo dentro de la bolsa hermética con el pescado a temperatura ambiente (Ver **Figura 64**). Este experimento demuestra que es

posible utilizar los sensores como indicadores del estado de alimentos como el pescado. Tecnologías similares se están desarrollando con el fin de conseguir que se evite el desperdicio de comida en buen estado.



Figura 64. Imagen de una bolsa hermética con pescado y un sensor F4 fuera de la bolsa (1) y dentro de la bolsa (2) después de 5 días a temperatura ambiente. Si el sensor se deja 6 días la respuesta es mayor y el sensor tiene un color mucho más oscuro (3).

6.1.5 Conclusiones

a) Los sensores desarrollados permiten la discriminación y cuantificación por inspección visual o reflectancia difusa de diferentes aminas mediante un muestreo pasivo.

b) Por primera vez, ha sido posible impartir hidrofiliidad al PDMS de forma rápida, en una sola etapa, y sencilla mediante la simple adición de TEOS en el proceso de curado. A partir de los datos obtenidos de la composición de film, se propone como posible explicación que este proceso de hidrolización del PDMS puede haber tenido lugar a través de un proceso catalítico de sol-gel no-hidrofílico, donde compuestos con grupos OH o agua a nivel de trazas pueden envenenar el ciclo catalítico normal de polimerización y desencadenar un proceso de sol-gel en parte del material.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

c) El límite de detección del sensor F1b y F4 fue de $1.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ tanto para la dimetilamina como la metilamina en 8h y 1h respectivamente. La normativa Europea limita la exposición de dimetilamina a 3.8 mg m^{-3} of air a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and $1.013\times 10^5 \text{ Pa}$.

d) Los sensores son estables con el tiempo (2 años) y tanto su síntesis como su respuesta muestra una reproducibilidad adecuada.

e) El método desarrollado es un método simple (por inspección visual, sin necesidad de preparación de los sensores de ningún tipo), respeta el medio ambiente (el PDMS es un material inerte y no requiere de una fuente de energía) y además, tanto la preparación de los sensores como sus prestaciones lo hacen un método económico y potencialmente comercializable (**Patente ES248247B1**).

6.2 SENSOR PARA LA DETERMINACIÓN IN SITU DE ANFETAMINAS

En este trabajo se propone una alternativa económica y rápida para la detección in situ de drogas anfetamínicas. Se ha desarrollado un sensor de PDMS y TEOS dopado con nanopartículas de SiO₂ [240, 241] con NQS embebido [128] (**Sección 6.2.1**) para el análisis in situ de anfetaminas (AMP), metanfetamina (MAMP) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y 3,4-metilendioxianfetamina (MDA). La síntesis del sensor esta basado en la **Patente ES248247B1**. La muestra se disuelve en un vial que contiene el tampón básico y el sensor. El sensor cambia de color a los pocos minutos de forma que es posible un análisis semicuantitativo de estos compuestos por simple inspección visual. En cuanto al análisis cuantitativo, es posible hacerlo mediante la intensidad del color de una imagen digitalizada o por reflectancia difusa. El kit se aplicó a muestras de éxtasis y la exactitud del método se validó por cromatografía líquida (LC) (**Sección 6.2.4**). Se estudiaron factores como la estabilidad del reactivo (NQS) embebido en la matriz polimérica comparándolo con el reactivo en disolución. La estabilidad del NQS en el sensor queda demostrado en este trabajo (**Sección 6.2.2**). [153]

6.2.1 Preparació del sensor

(Ver **Sección 3.4.2: Tabla 16** para conocer las condiciones experimentales para la preparación de los sensores)

Se ensayaron diferentes formas y tamaños del sensor. En primer lugar, se probaron sensores cuadrados (2x2 mm de lado, de 1 mm de espesor) que se introdujeron en una disolución básica de 0.01 g/mL de AMP. La coloración del sensor empezó en los bordes después de 5 min y hasta los 20 min no se observó una coloración completa del mismo. Se fabricaron sensores circulares para aumentar la superficie de contacto y obtener una respuesta más rápida. Estos sensores circulares fueron elaborados con 3 mm de diámetro y 1 mm de espesor. Se hizo el mismo ensayo con los sensores circulares y cuadrados, y los sensores circulares mostraron una respuesta más rápida. A los 10-15 min el sensor cambió completamente de color, con lo que se decidió utilizar esta forma.

Por otra parte, la composición de sensor se estudió con el fin de obtener una buena polimerización (y por tanto mayor homogeneidad del reactivo) así como la mayor accesibilidad del analito por el reactivo (es decir una mayor sensibilidad). Los films PDMS solidificaron después de 3 horas a 30 °C. Sin embargo, los films PDMS/TEOS necesitaron un tiempo de solidificación o polimerización de 1 día a 30 °C. La cantidad de TEOS se evaluó de acuerdo con la respuesta analítica de los films frente a la presencia de compuestos como la anfetamina (Ver **Figura 65A y 65B**). El sensor seleccionado fue el dispositivo elaborado con (50/50) relación en peso de (PDMS/TEOS), ya que

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

proporcionaba la señal analítica más alta y la distribución del color más homogéneo (Ver Figura 65C). Se utilizaron SiO₂ NPs para evitar la disminución del espesor de los films y mejorar la gelación. Estudios anteriores demuestran que la adición de NPs SiO₂ aumenta la porosidad de la matriz y reduce el agrietamiento del sensor durante la fase de secado [240, 241]. A partir de estos resultados, se propuso finalmente una película con 50/50 relación en peso de PDMS/TEOS, 0.1% (w/w) de NQS y 0.1% (w/w) de SiO₂ NPs.

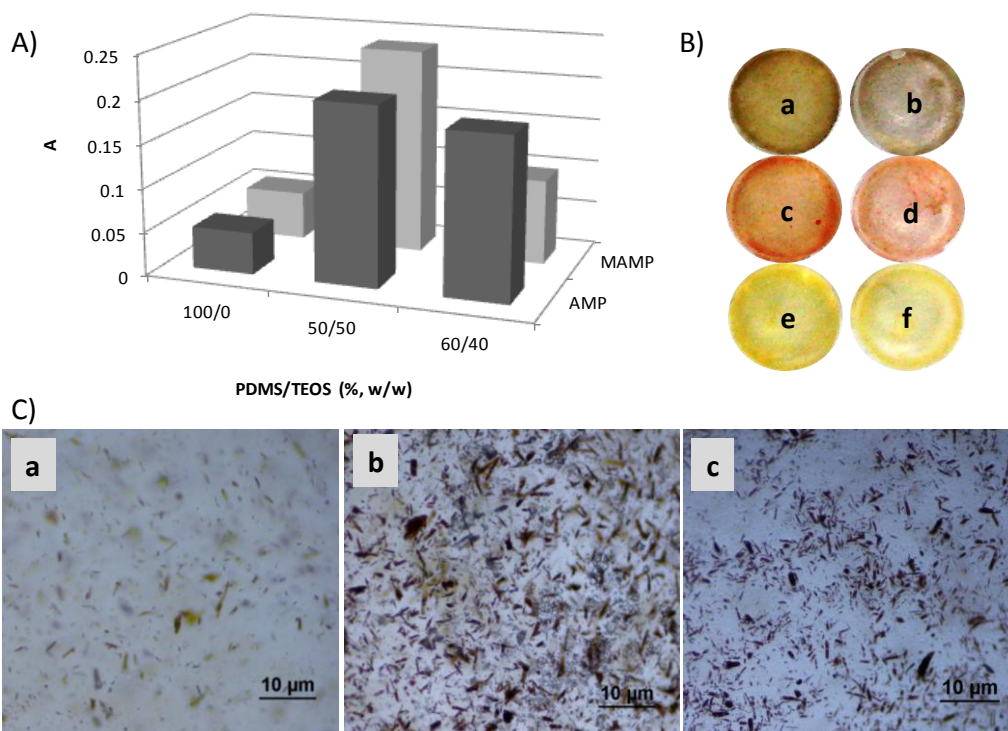


Figura 65. Optimización del sensor A) Efecto de diferentes relaciones en peso PDMS / TEOS sobre la respuesta analítica. Condiciones: 0.01 g/ml de AMP y MAMP, 5 minutos de exposición, sensores con 0.1% NQS y 0.1% SiO₂ NPs. B) Las imágenes fotográficas de sensores que contienen 50/50 (izquierda) y 60/40 (derecha) de PDMS/TEOS (/w) expuestos a 0.01 g/ml de AMP (a, b) y MAMP (c, d) durante 8 min y los sensores (e, f), C) fotografías con microscopio óptico de los sensores con diferentes relaciones en peso de PDMS / TEOS después del contacto con 0.01 g/ml de AMP durante 8 min a) 100/0, b) 50/50, c) 40/60 PDMS/TEOS (w/w), en un aumento de 10x.

6.2.2. Estudio de la estabilidad del NQS en el sensor

La estabilidad del reactivo de derivatización en solución acuosa se evaluó midiendo la absorción de la disolución acuosa de NQS con el tiempo tanto en la

oscuridad como expuesto a la luz solar durante 9 días. La **Figura 66** muestra la variación en el espectro de absorción de una disolución de NQS (24 mmol/L). Los resultados demostraron una estabilidad limitada de la disolución de NQS con el tiempo, incluso en la oscuridad y a temperatura ambiente. La disolución en la oscuridad mostró una disminución de la respuesta después de 1 día y siguió disminuyendo de forma significativa en los siguientes 9 días (Ver **Figura 66** en azul). La disolución expuesta a la luz solar, presentó una disminución de la absorbancia durante los 30 primeros minutos y una más pronunciada después de 1 día (Ver **Figura 66** en rojo). Los espectros registrados revelaron un cambio en el perfil con el tiempo, tanto en la oscuridad como expuestos a la luz solar. Se observó una disminución de la banda 380 nm y la aparición de una nueva banda a 330 nm que crece con el tiempo. (Ver **Figura 66** núm. 5). Como puede verse en la fotografía dentro de la **Figura 66**, la solución NQS presenta un color amarillo cuando esta recién preparada y la disolución se vuelve incolora en presencia de la luz solar a los 5 min. Sin embargo, después de una semana la solución se volvió amarilla y después de un mes apareció un color marrón intenso. Estos cambios de color se atribuyeron a la inestabilidad de la NQS en disolución acuosa. De hecho el NQS como reactivo colorimétrico en solución requiere de una preparación en el momento de la medición y esto supone una limitación importante para el análisis in situ.

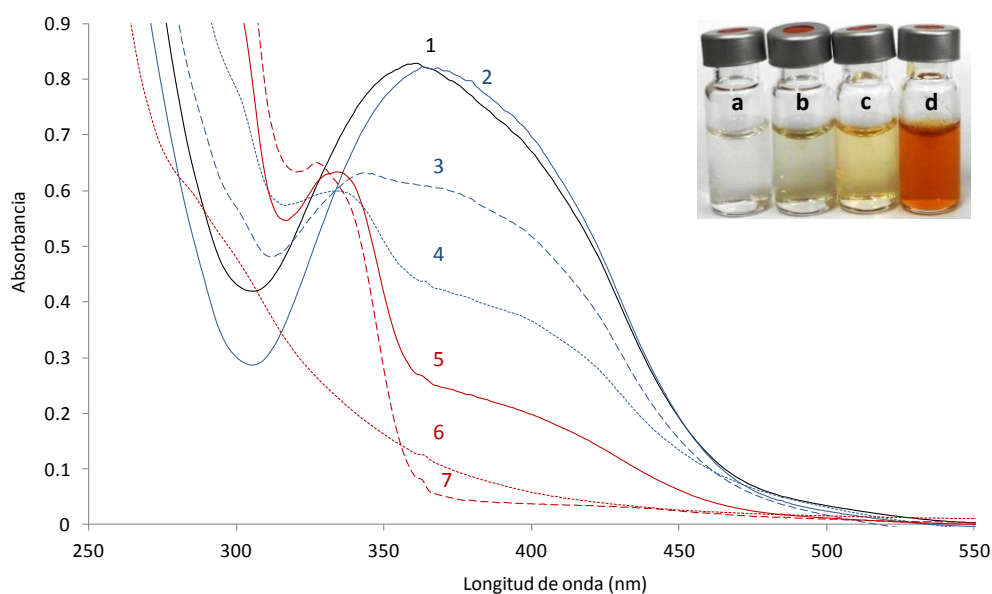


Figura 66. Espectros de absorbancia para evaluar la estabilidad del NQS en disolución acuosa (1: disolución acabada de preparar) en oscuridad (líneas azules 2: 5 min, 3: 4 días, 4: 9 días) y expuesta a luz solar (líneas rojas 5: 5 min, 6: 15 min, 9: 9 días) con el tiempo. Concentración de NQS $2,4 \times 10^{-4}$ M. Recuadro: Fotografía de respuestas colorimétricos de la disolución de NQS a la luz solar en a) 5 min, b) 7 días, c) 0 min, d) 30 días.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

El NQS se mantuvo estable dentro de la matriz polimérica de PDMS/TEOS al menos 8 meses. RSD para las mediciones de absorbancia de los sensores almacenados tanto en oscuridad como a la luz solar fue del 5% para el blanco y del 4% para la respuesta en presencia de 0.01 g/mL de MAMP y tampón (Ver **Sección 3.5.3**).

6.2.3 Respuesta del sensor y parámetros analíticos

(Ver **Sección 3.5.3: Tabla 18** para conocer las condiciones experimentales empleadas para la obtención de la respuesta de los sensores).

Se estudió el tiempo de reacción entre NQS y los grupos amina de los diferentes compuestos en el sensor (Ver **Figura 67**). Para este propósito, se midió la absorbancia del sensor después del contacto con 0.02 g/mL de solución de compuestos anfetamínicos a diferentes tiempos. El cambio de color se inició después de 1 min y continuó aumentando con el tiempo. Se eligió 10 min como tiempo óptimo .

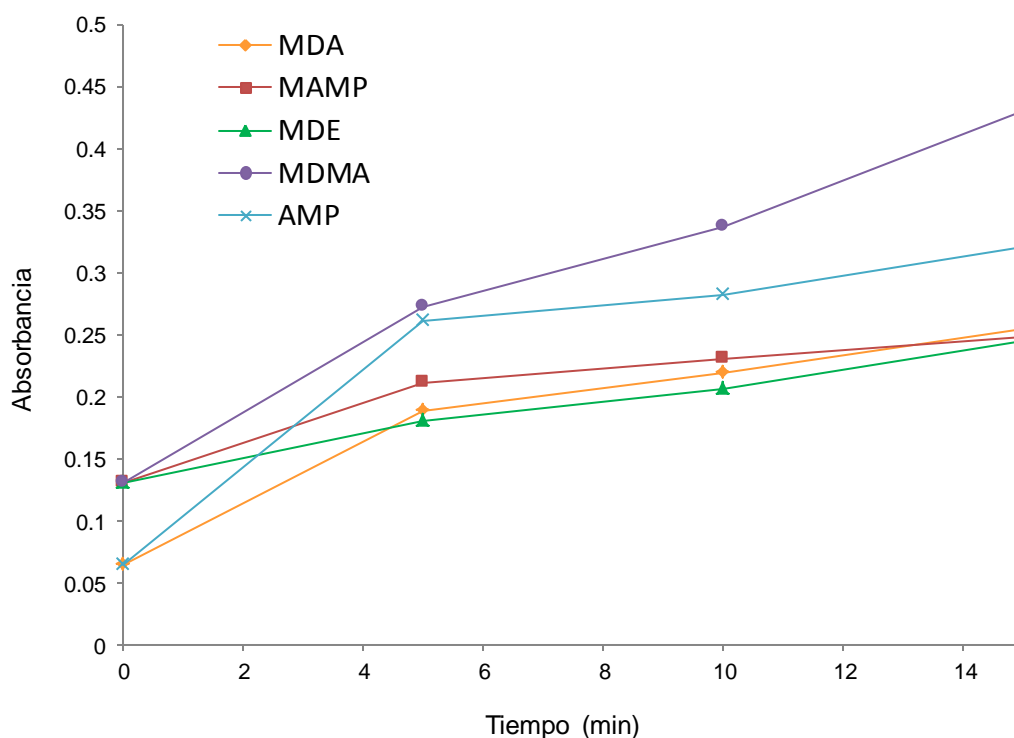


Figura 67 La absorbancia a 525 nm para aminas primarias y 600 nm para aminas secundarias correspondiente de los productos de reacción en el sensor, MAMP y MDMA NQS o AMP y MDA-NQS, registrado contra un blanco de reactivo a diferentes tiempos de reacción. Condiciones: Composición del sensor: 0.1% NQS, 0.1% NP, 50:50 PDMS:TEOS; concentración de analito: AMP y MAMP 0.02 g/mL, MDMA y MDA 0.01 g/mL.

El kit colorimétrico fue ensayado para la detección de AMP, MAMP, MDMA y MDA. La reacción de sustitución nucleófila tiene lugar entre el grupo amino de las drogas y el grupo sulfonato de la NQS en medio alcalino [242]. Diferentes colores se observaron en función del grupo amino del compuesto analizado: naranja para aminas secundarias y gris-marrón para aminas primarias (Ver **Figura 68**). Estos estudios demuestran que la estimación cualitativa o cuantitativa de las drogas puede ser estimada visualmente y también se puede medir la absorbancia o intensidad de color de los sensores por reflectancia difusa. La **Figura 68** muestra la respuesta de los sensores en función de la concentración de analito.

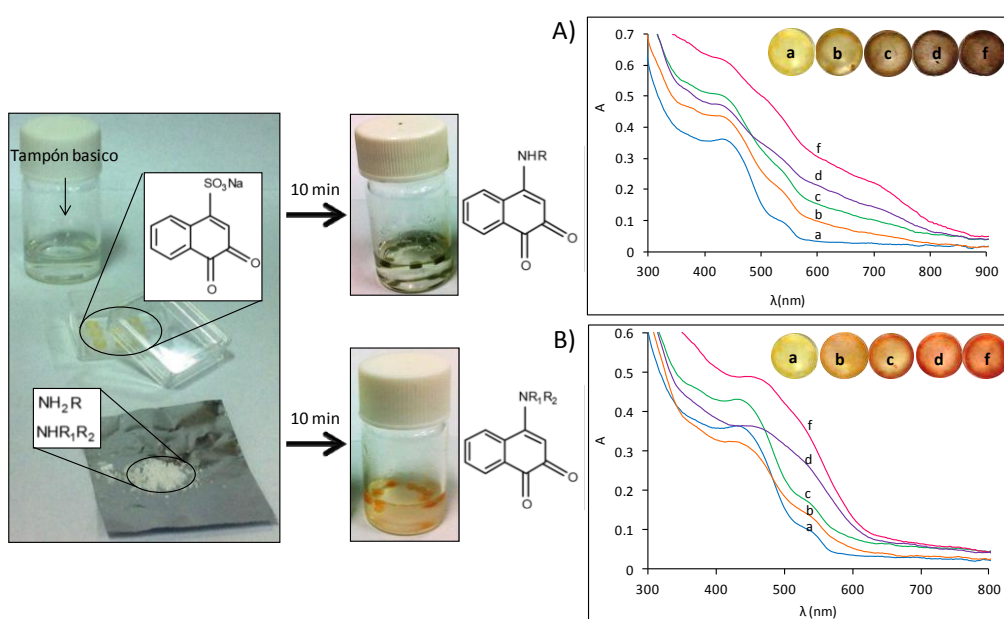


Figura 68. Fotografía del análisis de droga en polvo utilizando el kit colorimétrico (tampón básico y sensor) para la AMP (arriba) y MAMP (abajo) en 0,02 g ml⁻¹, junto con los espectros de absorción a diferentes concentraciones a) 0 b) 0.005, c) 0.01, d) y e) 0.03 f) 0.05 g/mL de A) AMP y B) MAMP.

Se compararon las respuestas de los sensores con las obtenidas en disoluciones acuosas de AMP, MAMP, MDA y MDMA en las mismas condiciones. Las concentraciones estudiadas fueron de 0.025 a 0.05 g/mL para drogas amino primarias y de 0.0025 a 0.025 g/mL para amino secundarias. La **Tabla 31** muestra las rectas de calibrado obtenidas. En cuanto a la precisión, se evaluó mediante la obtención de las desviaciones estándar relativas (RSD) intra e inter-día para 0.015 g/mL de cada droga. También se comparó la respuesta de los sensores preparados en tres lotes diferentes en condiciones idénticas. Ambos procedimientos dieron resultados satisfactorios (Ver **Tabla 31**) con valores de la RSD inferiores a 15% en todos los casos. Estos resultados indicaron

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

que la precisión fue satisfactoria. Los límites de detección (LOD) obtenidos fueron inferiores a 0.007 g/mL (calculado como $3S_a/b$, donde S_a del blanco es la desviación estándar de la ordenada en el origen y b es la pendiente de la curva de calibración lineal). Las diferencias entre ambos métodos (utilizando como señal analítica la reflectancia difusa o utilizando la intensidad de color de los sensores) no fueron grandes.

Con el fin de establecer posibles interferentes, el procedimiento propuesto se aplicó a sustancias usadas comúnmente como adulterantes y diluyentes. Los compuestos examinados fueron cafeína, efedrina, procaína, paracetamol, ibuprofeno, ácido acetilsalicílico, levamisol, almidón, manitol, sacarosa, glucosa, lactosa y sulfato magnésico (0.005 g/mL). El sensor no cambió de color en presencia de los compuestos ensayados individualmente, a excepción de la efedrina y la procaína. Ambas presentan grupos aminos que reaccionan con el NQS y son también estimulantes.

6.2.4 Aplicación a muestra reales: éxtasis

Con el kit colorimétrico se analizó una muestra ilegal que contiene droga y otros aditivos en porcentajes variables. Los resultados obtenidos se compararon con los resultados obtenidos por cromatografía líquida (LC), además la muestra también se caracterizó por FTIR-ATR.

Para validar la respuesta obtenida por los sensores, se derivatizaron las muestra con FMOC y se analizaron por LC con un detector de fluorescencia según el procedimiento descrito en [243]. Se emplearon 0.125 ml de muestra y 0.125 ml de tampón de hidrogenocarbonato (10% w/v) a pH 10.0. A continuación, se añadió 0.250 ml de reactivo de derivación y la mezcla resultante se dejó reaccionar durante 5 min. Finalmente, alícuotas de 20 μ l de la solución de reacción se inyectaron en el sistema cromatográfico. La derivatización se realizó a temperatura ambiente y la muestra se ensayó por triplicado.

Tabla 31. Parámetros analíticos para la determinación de AMP, MAMP MDA y MDMA utilizando dos procedimientos distintos

Analito	Absorbancia (Reflectancia difusa)						CI (GIMP)		
	Linealidad ^a $y = a + bx$	Intra-día (%)(n=3)	Inter-día (%)(n=3)	LOD (g/mL)	Linealidad ^b $y = a + bx$	Intra-día (%)(n=3)	Inter-día (%)(n=3)	LOD (g mL ⁻¹)	
AMP	$a \pm S_a: 0.050 \pm 0.010$	11	14	0.006	$a \pm S_a: 0.0141 \pm 0.0008$	2	7	0.005	
	$b \pm S_b: 5.3 \pm 0.4$				$b \pm S_b: 0.42 \pm 0.03$				
	$R^2 = 0.985$				$R^2 = 0.968$				
MAMP	$a \pm S_a: 0.119 \pm 0.005$	4	15	0.003	$a \pm S_a: 0.0123 \pm 0.0003$	3	7	0.004	
	$b \pm S_b: 5.2 \pm 0.2$				$b \pm S_b: 0.212 \pm 0.013$				
	$R^2 = 0.992$				$R^2 = 0.981$				
MDA	$a \pm S_a: 0.032 \pm 0.003$	10	13	0.006	$a \pm S_a: 0.0128 \pm 0.0003$	7	11	0.007	
	$b \pm S_b: 3.7 \pm 0.5$				$b \pm S_b: 0.13 \pm 0.02$				
	$R^2 = 0.982$				$R^2 = 0.983$				
MDMA	$a \pm S_a: 0.048 \pm 0.006$	7	11	0.002	$a \pm S_a: 0.0143 \pm 0.0003$	5	9	0.003	
	$b \pm S_b: 7.9 \pm 0.5$				$b \pm S_b: 0.28 \pm 0.02$				
	$R^2 = 0.996$				$R^2 = 0.994$				

a: ordenada, *b*: pendiente, s_a and s_b desviación standard de la ordenada y la pendiente respectivamente R^2 : determinación del coeficiente $RSD_{intra-día}$ and $RSD_{inter-día}$: reproducibilidad and repetibilidad, respectivamente, LOD: límite de detección ^aAbsorbancia a 525 y 600 nm para aminas primarias y secundarias respectivamente.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

Los cromatogramas obtenidos para la muestra de éxtasis revelaron que la MDMA es el único compuesto anfetaminico presente en la muestra (Ver **Figura 69A**). La concentración de esta droga se calculó a partir de las curvas de calibración obtenidas de patrones acusos de MDMA entre 0,5 y 20,0 g/mL. La linealidad se evaluó mediante la representación del área del pico frente a la concentración del analito. Las ecuaciones de calibración obtenidas fueron $a \pm sa = (3.4 \pm 1.7) \times 10^5$, $b \pm sb = (6.3 \pm 1.2) \times 10^5$ (g/mL), $R^2 = 0.9998$, $s_{yx} / b = 0.33$, $n = 5$ (donde a: ordenada en el origen; b: pendiente; sa y sb: desviación estándar de la ordenada y la pendiente, respectivamente; R^2 : coeficiente de determinación, y s_{yx} / b : desviación estándar del procedimiento).

Los valores de MDMA en la muestra por CL fueron 36.1 ± 1.4 (w/w) y midiendo el sensor por reflectancia difusa de $36 \pm 6\%$. Ambos valores fueron calculados a partir de las curvas de calibración obtenidas en cada caso mediante calibración externa. Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias significativas entre los valores de MDMA calculados en la muestra de éxtasis en un nivel de confianza del 95%. se puede concluir que los dos métodos proporcionan resultados comparables.

Finalmente, FTIR-ATR se aplicó con el fin de caracterizar la muestra y corroborar los resultados obtenidos por LC y el sensor propuesto. Para este propósito, la muestra y sus posibles adulterantes/diluyentes como sustancias puras de referencia fueron analizados por FTIR-ATR. Los espectros obtenidos se compararon para encontrar similitudes (**Figura 69 B**). Como era de esperar, se observaron las bandas características para la MDMA en el espectro de la muestra, Entre sus bandas características destacar a 2.710 cm^{-1} (NH de estiramiento), 2454 cm^{-1} (CH de estiramiento en el grupo CH_3), 1488 cm^{-1} (CH de balanceo), 1244 y 1030 cm^{-1} (COC de estiramiento en el metoxi) y 930 cm^{-1} (CO de estiramiento). Se observó que las bandas para el espectro de la muestra eran menores que las bandas del espectro MDMA puro. Por otra parte, se observó una banda adicional a 3300 cm^{-1} probablemente de un adulterante que contiene grupos OH en su estructura : lactosa, almidón, manitol, o paracetamol. Aunque también podría tratarse de la efedrina el análisis por LC descartó esta posibilidad.

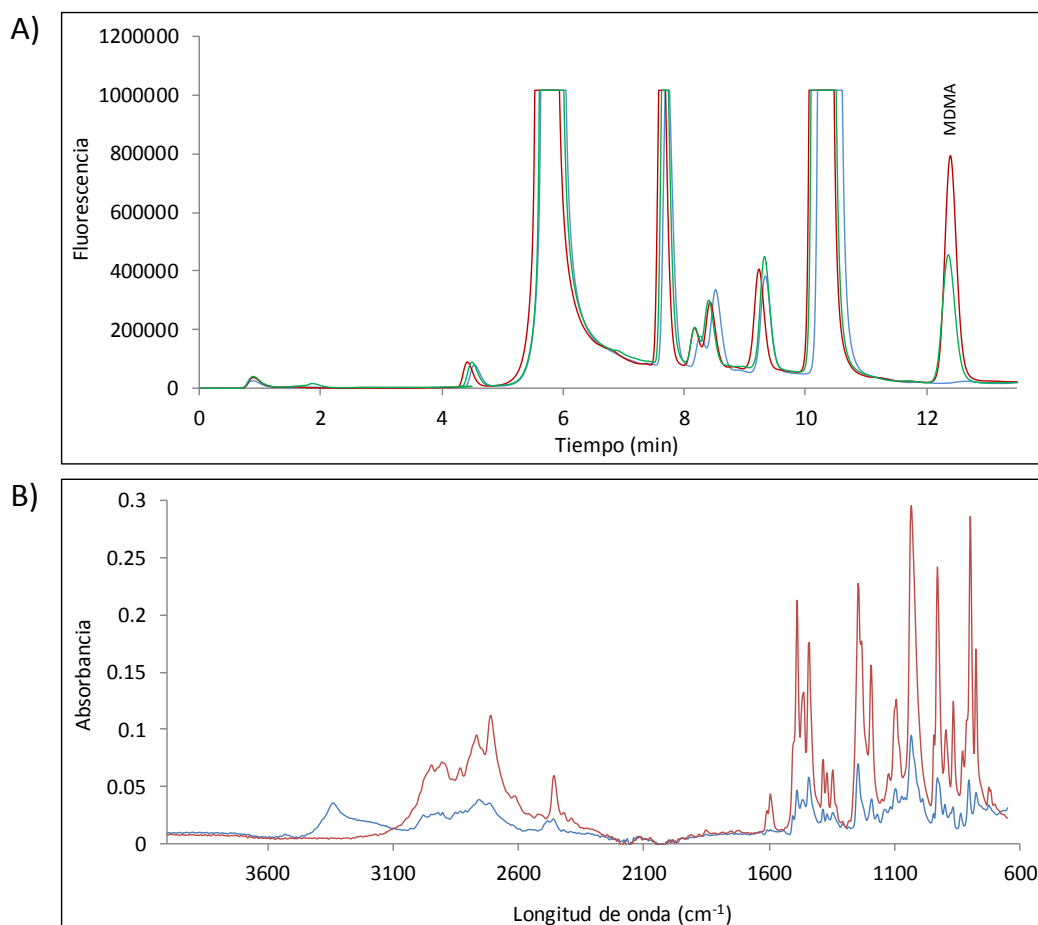


Figura 69. A) Los cromatogramas obtenidos para un blanco (agua), 16.5 mg/ml de MDMA y la muestra de éxtasis, obtenida por derivación FMOC con detección fluorescente. B) los espectros de FTIR-ATR de MDMA en polvo como referencia y la muestra éxtasis en polvo.

6.3.5. Conclusiones

1) Se ha conseguido que un reactivo derivatizante inestable a la luz como el NQS permanezca estable con el tiempo (al menos 8 meses) mediante su encapsulación en un polímero de PDMS/TEOS y NPs de SiO₂.

2) Se ha desarrollado un kit (sensor + tampón) para el análisis de drogas como la MAMP y MDMA. Además es capaz de diferenciar entre AMP, MDA (aminas primarias marrón-gris) y MAMP, MDMA (aminas secundarias naranja-rojo).

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

3) El sensor permite un análisis semi-cuantitativo por inspección visual del cambio de color y cuantitativo mediante reflectancia difusa o medida de la intensidad del color. Además, presenta adecuada linealidad, precisión y exactitud para las drogas ensayadas.

4) La respuesta del sensor se comparó con el método de derivatización de MDMA con FMOC y análisis mediante LC, mostrando resultados muy similares.

5) El kit propuesto no necesita instrumentación específica ni personal entrenado, es portátil, fácil de usar, rápido y económico. Con lo que podría ser una herramienta muy útil para la determinación in situ de drogas ilegales en controles policiales rutinarios.

6.3 DISPOSITIVO DISPENSADOR DE REACTIVOS PARA LA ESTIMACIÓN COLORIMÉTRICA DE AMONIO.

En este trabajo se propone utilizar el PDMS como encapsulante y dispensador de reactivos para el análisis de analitos. Los reactivos de derivatización se inmovilizan en la matriz polimérica y cuando el dispositivo se pone en contacto con las muestras, los reactivos son liberados, de manera que se forman los derivados en disolución [244]. Este método supone una alternativa a los métodos colorimétricos en los que el reactivo se prepara en disolución, ya que es necesario una etapa previa de preparación de reactivos y se requiere un control de la estabilidad de los mismos. En caso de utilizar reactivos con cierta toxicidad, al embeberlos en la matriz polimérica de PDMS (material biocompatible) su manipulación es más segura que la necesaria en muchos de los métodos colorimétricos propuestos (Ver **Sección 6.3.5**). El dispositivo ha sido diseñado a partir de polidimetilsiloxano (PDMS)-timol/nitroprusiato (Ver **Sección 3.4.3**) y se ha utilizado para el monitoreo de amonio en muestras de agua y también en extractos de PM₁₀ (Ver **Sección 3.5.3**). Los niveles de amonio en aguas y de sulfato de amonio en aire son indicadores importantes de la contaminación en ambas matrices.

6.3.1 Preparación del dispositivo

Los dispositivos de PDMS-timol, PDMS-timol/NaOH y PDMS-timol/nitroprusiato se prepararon siguiendo el procedimiento experimental descrito en la **Sección 3.4.3**.

La reacción derivatizante (o respuesta del sensor) tiene lugar cuando los reactivos embebidos en el PDMS son liberados a la disolución. En la primera etapa el hipoclorito sódico reacciona con el ion amonio para formar las cloraminas. En la segunda etapa la imina generada reacciona con el timol en presencia de un catalizador adecuado (acetona, sulfato de magnesio o nitroprusiato sódico) para formar el azul de indotimol [245, 246] medible entre 630-720 nm. (Ver **Figura 70**).

6.3.2 Optimización del dispositivo

El PDMS es un polímero hidrofóbico donde los reactivos orgánicos como el timol quedan retenidos. Sin embargo, trabajando en las condiciones adecuadas el reactivo o reactivos son liberados a la disolución. En este estudio se ha observado que dos de los factores limitantes para el desarrollo de los sensores han sido: a) el proceso de polimerización que conlleva a la solidificación del gel y b) la difusión del reactivo a la disolución.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

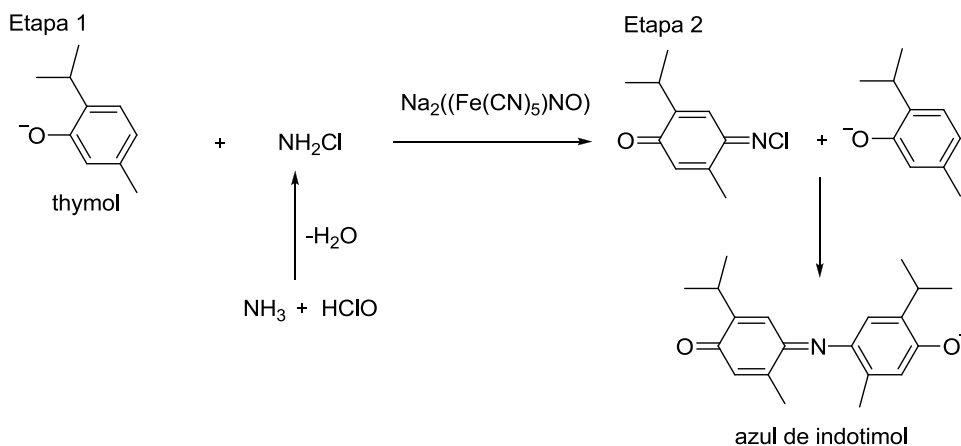


Figura 70. Reacción de Berthelot.

En cuanto al primer aspecto; la solidificación de los sensores, en los sensores PDMS-timol, PDMS-timol/NaOH y PDMS-timol/nitropsusiato los reactivos fueron embebidos sin causar problemas en la polimerización y curado del PDMS. La **Figura 71** muestra los sensores después del curado y la encapsulación de los reactivos.



Figura 71. Fotografías de los sensores de PDMS

Sin embargo, cuando los reactivos embebidos se combinaron de la siguiente forma; PDMS-timol/NaOH/nitroprusiato o PDMS-timol/nitroprusiato/NaOCl, el proceso de curado del PDMS no se desarrolló con normalidad y el gel no solidificó. La acetona fue utilizada como disolvente de los reactivos, a la vez que catalizador de la reacción. La acetona permitió una rápida y adecuada solidificación (a diferencia de otros disolventes muy polares o acuosos) debido a su volatilidad a temperatura ambiente. En cuanto al segundo aspecto; el proceso de difusión de los reactivos a la disolución se observó que volúmenes pequeños de muestra favorecían la difusión. Se calcularon rectas de

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

calibrado para cada uno de los sensores y también en disolución para dos volúmenes de muestra (0.5 y 2 mL) siguiendo el procedimiento experimental descrito en [247] (**Tabla 32a**). Las pendientes obtenidas en todos los casos son muy similares (con un nivel de confianza del 95%) (**Tabla 32b**).

Tabla 32a. Comparación de las rectas de calibrado obtenidas para los dispositivos de PDMS-timol y la disolución de derivatización.

		n	b₀ ± S_{b0}	b₁ ± S_{b1}	S_{yx}	R
Volumen de muestra (mL)	Disolución de derivatization 2 mL	5	0.004±0.008	0.206±0.007	0.011	0.099804
	0.5 mL	6	0.03±0.02	0.181±0.005	0.04	0.99861
Sensores						
	Timol	7	0.05±0.03	0.187±0.007	0.06	0.99638
	Timol + NaOH	5	0.054±0.012	0.1253±0.0018	0.019	0.99967
	Timol + Nitroprusiato	4	0.04±0.02	0.18 ±0.004	0.03	0.99940
Sensores con el protocolo simplificado						
	Timol + Nitroprusiato	4	0.04 ± 0.03	0.224±0.0012	0.04	0.99719

Tabla 32b Comparación estadística de las pendientes de los dispositivos y de la disolución de derivatización

	Disolución de derivatización, 2mL	Disolución de derivatización, 0.5mL	PDMS-timol	PDMS-timol/NaOH	PDMS timol/nitro-prusiato
Disolución derivatización 0.5 mL	Pendientes iguales ^a	-	-	-	-
PDMS-timol	Pendientes iguales ^a	Pendientes iguales ^a	-	-	-
PDMS-timol/NaOH	Pendientes diferentes	Diferentes	Pendientes diferentes	-	-
PDMS-timol/nitro-prusiato	Pendientes iguales ^a	Pendientes iguales ^a	Pendientes iguales ^a	Pendientes diferentes	-
PDMS-timol/nitro-prusiato	Pendientes iguales ^a	Pendientes iguales ^a	Pendientes iguales ^a	Pendientes diferentes	Pendientes diferentes

a: Varianzas no homogéneas para S_{yx} para el 95% de confianza

La reducción del volumen de 2 mL a 0.5 mL no supuso una pérdida de sensibilidad. Además, la difusión de los reactivos desde la matriz polimérica a la

disolución se mejoró al aumentar la superficie de contacto dividiendo el sensor en 6 fracciones pequeñas. Es de destacar también, que la cantidad de hipoclorito sódico se redujo del 5% al 1.25% con el fin de obtener una banda de absorción (a 690 nm) más definida.

6.3.3 Respuesta del dispositivo dispensador en la estimación colorimétrica de amonio y parámetros analíticos

Para la respuesta de los tres sensores se procedió según **Sección 3.5.3: Tabla 18**.

Se realizaron estudios para cada uno de los dispositivos, PDMS-Timol, PDMS-NaOH y PDMS-nitroprusiato. Primero se estudió el dispositivo PDMS-Timol, el cual mostró una buena difusión del timol a la disolución. En presencia de NaOH y nitroprusiato de sodio el indotimol se formó a los 5 min al igual como ocurre en el método convencional de derivatización en disolución. A continuación se estudió el comportamiento del dispositivo PDMS-timol/NaOH, el cual requirió más tiempo (20 min) para obtener una respuesta similar a la del dispositivo de PDMS-timol (20 min). Finalmente, se estudió la respuesta del sensor PDMS-timol/nitroprusiato. En este caso el dispositivo con dos reactivos embebidos mostró una sensibilidad comparable a la obtenida por los métodos convencionales en un tiempo de respuesta de 5 min. Por todo ello, se decidió utilizar este dispositivo. En la **Figura 72** se compararon las cinéticas de los dispositivos PDMS-timol/nitroprusiato y PDMS-timol/NaOH y en la **Figura 73** se compararon los espectros de ambos dispositivos a diferentes concentraciones de amonio (1 y 5 mg/L).

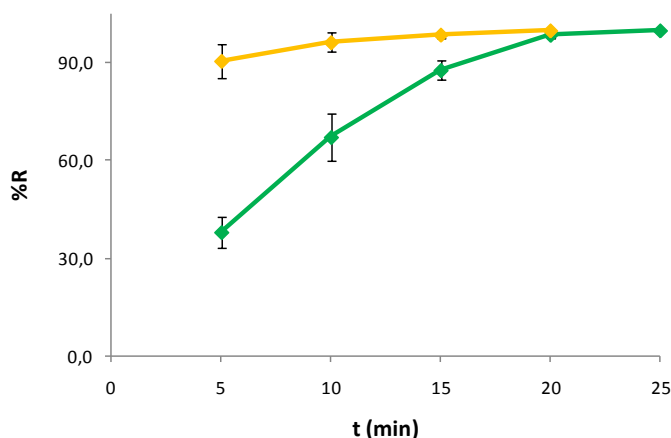


Figura 72. Cinética de Berthelot para el NH_4^+ ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) con a) PDMS-timol/NaOH (en verde) y b) PDMS/timol/nitroprusiato (en amarillo). %R=porcentaje de respuesta analítica respecto a la respuesta máxima.

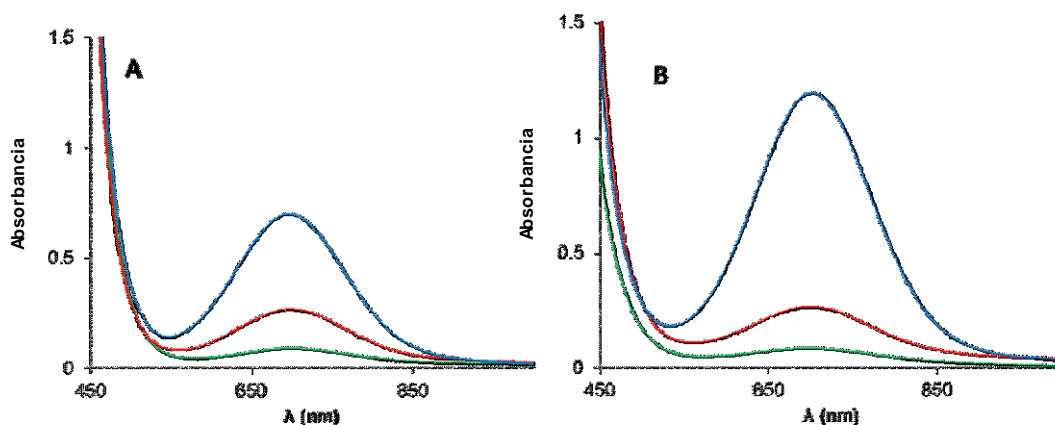


Figura 73. Espectro de UV-vis obtenido para A) un blanco (en verde), 1 mg/L (en rojo) y 4 mg/L (en azul) de NH_4^+ utilizando el sensor timol/NaOH. B) un blanco (en verde), 1 mg/L (en rojo) y 5 (en azul) mg/L de NH_4^+ utilizando el sensor PDMS/timol/nitroprusiato mediante un procedimiento siminal en ambos casos.

Parámetros analíticos

Los resultados obtenidos utilizando los dispositivos se compararon con los resultados obtenidos en disolución a partir de las rectas de calibrado de las absorbancias medidas a 690 nm, (banda característica del azul de indotimol) frente a la concentración de amonio (0-10 mg/L). Se observó una buena linealidad en ambos casos. El dispositivo que menor sensibilidad presentó fue el PDMS-timol/NaOH mientras que el dispositivo PDMS-timol/nitroprusiato presentó mayor sensibilidad. Los límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) del sensor; 0.4 y 0.7 mg/L respectivamente, fueron adecuados para la monitorización de amonio en muestras de aguas y aguas residuales. La precisión del dispositivo PDMS-timol/nitroprusiato fue evaluada para dos concentraciones (0.1 y 0.3 mg/mL). Los valores de desviación estándar (%RSD) intra-día fueron 5.4 y 5% (n=3) para 0.1 y 0.3 mg/mL respectivamente y los valores de desviación estándar inter-día fueron 7.6 y 6% (n=3) para 0.1 y 0.3 mg/mL respectivamente. La precisión lote a lote se hizo a partir de 6 síntesis, y el %RSD fue de 8.7 y 8% (n=3) para 0.1 y 0.3 mg/mL respectivamente, demostrando su buena precisión. Además, los dispositivos se mostraron estables durante 12 meses con un % RSD de 7% similar al % RSD inter día.

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

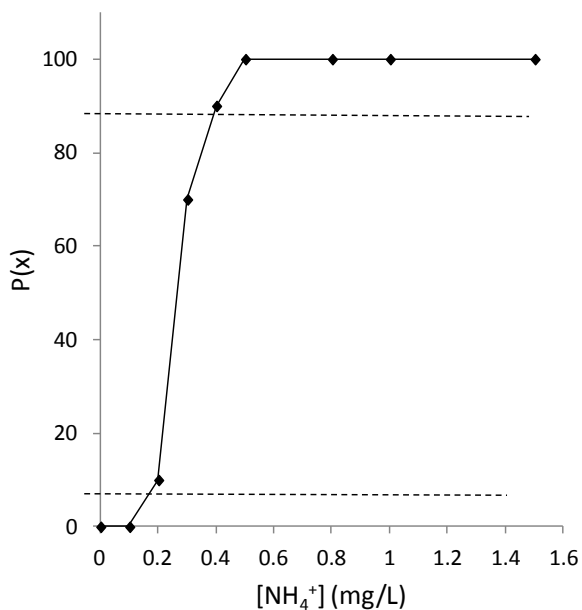


Figura 74. Gráfico sobre la probabilidad de detección según la concentración de amonio en muestras reales

Analisis cualitativo

El dispositivo PDMS-timol/nitroprusiato puede servir como método de cribado Si/No; respuesta positiva (disolución color verde) y respuesta negativa (disolución color amarillo). Así se estudió su fiabilidad a partir de la probabilidad de respuestas positivas (P(x)) en función de la concentración de amonio en las muestras de agua. En la **Figura 74** se muestra como el método tan sólo no resultaría fiable para determinar amonio en muestras con concentraciones de amonio entre 0.2-0.4 mg/mL. La probabilidad de tener falsos negativos en el LODs fue solo del 10%. Se puede concluir que el método es fiable para cribar muestras de agua conteniendo o no amonio por debajo o por encima del intervalo 0.2-0.4 mg/mL.

6.3.4 Aplicación a muestras reales

La aplicabilidad del dispositivo PDMS-timol/nitroprusiato se evaluó a partir del análisis de muestras de aguas (ríos y aguas de lavado) y muestras de extractos acuosos de PM₁₀. Los valores obtenidos se compararon con los valores en disolución acuosa (**Tabla**

33). Se aplicó el F-test para variaciones homogéneas y no se obtuvieron diferencias significativas, concluyendo que ambos eran igual de precisos. Se prepararon rectas de calibrado para ambos métodos y se interpolaron los valores obtenidos en ambas rectas para calcular el % recuperación (Tabla 33). Se fortificaron las muestras (1 mg/L) y se evaluó el efecto matriz. No se observó efecto matriz para un nivel de confianza del 95% (Tabla 34).

Los resultados obtenidos indican que el método utilizado es una buena alternativa para el desarrollo de un sensor colorimétrico de amonio fiable y reproducible para su monitorización en ambientes reales.

Tabla 33. Concentración de amonio en muestras de agua y extractos acuoso de PM₁₀ con el dispositivo kit PDMS-NH₄⁺ y la disolución convencional de derivatización.

	Disolución de derivatización	Dispositivo PDMS-NH ₄ ⁺
[NH ₄ ⁺] (mg/L)		
Muestra de agua 1	13.3 ± 0.7	12 ± 1
Muestra de agua 2	8.1 ± 0.2	7.2 ± 0.7
Muestra de agua 3	14.4 ± 0.6	14.1 ± 0.7
[NH ₄ ⁺] (µg/m ³)		
PM ₁₀ extracto acuoso	1.69 ± 0.03	1.77 ± 0.15

Tabla 34. Valor medio de las recuperaciones obtenidas para el análisis de muestras de agua y extractos acuoso de PM₁₀ con el dispositivo kit PDMS-NH₄⁺ y la disolución convencional de derivatización. Las muestras se fortificaron con 1 mg/L de amonio n=3.

Recuperación	Disolución de derivatización	Dispositivo PDMS-NH ₄ ⁺
Muestras de agua	83 ± 5	86 ± 7
PM ₁₀ extracto acuoso	109 ± 15	108 ± 10

6.3.5 Comparación con otros métodos ópticos

Para demostrar la calidad del sensor PDMS-NH₄⁺ propuesto se compararon algunas características analíticas y características de otro tipo (toxicidad, costes, portabilidad) con varios métodos normalmente utilizados para determinar amonio (Ver Figura 75). Entre ellos están, técnicas espectrofotométricas UV-vis (método Nessler y indofenol), técnica de espectroscopía de reflectancia difusa (Método de extracción en fase sólida-indothymol), técnicas espectrofluorimétricas (método y luminol método de Roth modificado) y la técnica electroanalítica (electrodo selectivo de iones (ISE)) [248,

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

249]. Características analíticas tales como, límite de detección (LOD) y la selectividad / especificidad fueron evaluadas. También, se evaluaron otros parámetros, que aunque no están directamente relacionados con las propiedades analíticas, resultan importantes en el procedimiento de selección para los propósitos de monitoreo, tales como: reactivos utilizados (Cantidad, toxicidad, peligro y seguridad), instrumentos (coste), el análisis tiempo, la portabilidad y la muestra volumen. En la **Figura 75** se comparan propiedades analíticas y complementarias [249]. Las características diferentes han sido evaluados en una escala de 1 a 5. La puntuación de 5 ha sido asignada al método que ofrece la mejor opción en términos de sensibilidad, selectividad, tiempo de análisis, coste, portabilidad, toxicidad y residuos generados mientras que proporcionalmente se han asignado las calificaciones de los otros métodos [249].

Los principales requisitos de una prueba de control son la portabilidad y la rapidez de la respuesta. Entre todos los procedimientos de comparación, el sensor PDMS-NH₄⁺ muestra los mejores resultados, tanto en cuánto a la rapidez como portabilidad. En cuanto al coste, el ISE es el procedimiento de más bajo coste, sin embargo el sensor PDMS-NH₄⁺ no necesita de instrumentación para llevar a cabo una determinación semicuantitativa de amonio por simple inspección visual in situ. Además, el sensor PDMS-NH₄⁺ es un método más sostenible que los métodos ISE y métodos de Roth en cuanto a los residuos generados y la toxicidad. La toxicidad en comparación con el método SPE-indothymol se ve reducida ya que no se necesita la manipulación del reactivo de derivatización. El kit propuesto en este trabajo mostró los mejores resultados en términos generales de coste, rapidez y portabilidad.

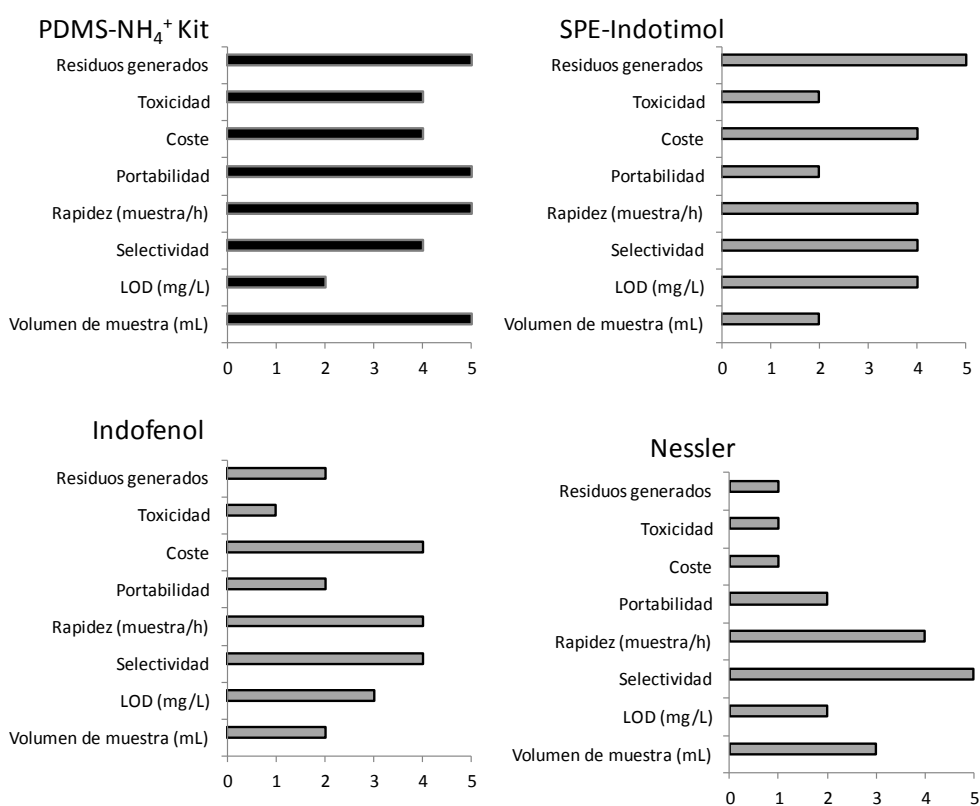
Teniendo en cuenta que los principales inconvenientes del método SPE-indotimol, indofenol, Nessler y luminol son la toxicidad de los reactivos empleados. Aunque por ejemplo el método Nessler podría ser ventajoso en términos de rapidez. los residuos generados, la toxicidad y el coste hacen que este procedimiento no sea en ningún caso una buena alternativa para el análisis rutinario.

La utilización de procesos de preparación de muestra miniaturizados supone un atractivo en cuanto a que permite un análisis de alta velocidad, bajo costo de operación, bajo consumo de disolvente y de generación de residuos. Además, en muchas aplicaciones, la baja cantidad de muestra disponible es el factor limitante del análisis. En lo que a esto respecta, el sensor PDMS-NH₄⁺ propuesto proporciona características similares que el método de luminol, procedimiento que necesita volúmenes de muestras menores.

Características analíticas como la selectividad y la sensibilidad del sensor propuesto son comparables a las obtenidas con SPE-indothymol y el método de Roth modificado, e incluso más altas que las obtenidas por otros procedimientos. El método

Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

más sensible sería el método basado en la reacción del luminol. Este método podría recomendarse cuando las concentraciones de amonio son muy bajas sin embargo la baja selectividad podría ser un factor limitante. Cabe señalar que los procedimientos de análisis deben cumplir con las regulaciones de agua. Teniendo en cuenta los valores y LOD legislados obtenidos con el procedimiento propuesto, podemos concluir que el sensor PDMS-NH₄⁺ permite la monitorización de amonio con una sensibilidad satisfactoria.



Capítulo 6. El PDMS como encapsulante de reactivos para su dispensación y el desarrollo de sensores

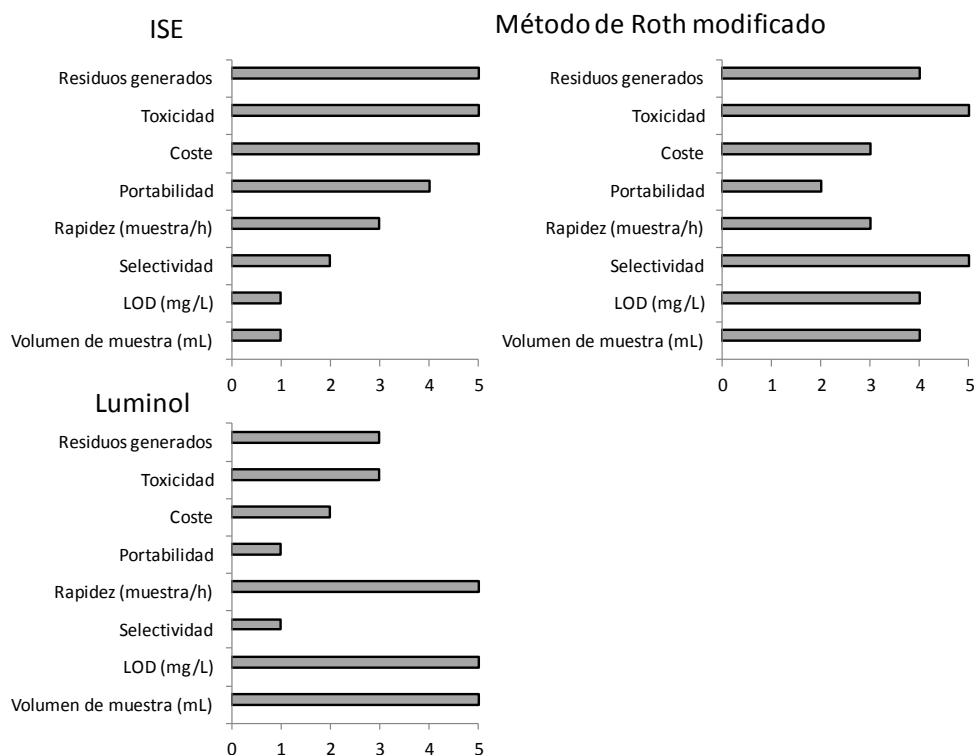


Figura 75. Estudio comparativo de las propiedades analíticas y otras propiedades complementarias entre el kit PDMS-NH₄⁺ propuesto con diversos métodos de determinación de NH₄⁺. Se ha utilizado una escala del 1 al 5, siendo el 5 la mejor puntuación.

Finalmente, haciendo una evaluación conjunta de todos los procedimientos, el método basado en OPA-NAC (modificado Roth) resulta una buena alternativa para el análisis rutinario de amonio. Las principales ventajas son la selectividad y LODs bajos. Por otra parte, es un método rentable, rápido y respetuoso con el medioambiente. El sensor PDMS-NH₄⁺ propuesto demostró características similares, pero con las ventajas de que proporciona portabilidad y velocidad en la monitorización y el análisis cualitativo y cuantitativo.

6.3.6 Conclusiones

a) La utilización del dispositivo de PDMS-timol/nitroprusiato evita tener que preparar todas las disoluciones de derivatización en el momento. Se trata de un método donde se producen menos residuos y se minimiza la toxicidad en la manipulación de los reactivos.

b) Los LODs y RDS son adecuados para la estimación de amonio en aguas.

c) El método ha sido validado por comparación de los valores obtenidos con los valores de la derivatización en disolución. Además, se han analizado sus ventajas e inconvenientes comparándolo con otros métodos analíticos para la determinación de amonio.

d) Los dispositivos son estables durante al menos 12 meses.

e) Se trata de un método simple, selectivo, rápido y portátil. Permite la determinación de amonio in situ por inspección visual en 5 minutos. Desde el punto de vista de la sostenibilidad es el que resulta óptimo.

f) Se ha demostrado su aplicación como método de cribado y cuantitativo del contenido en amonio considerando la legislación en aguas y en el particulado atmosférico (PM).

CHAPTER 7.
ZEIN AS ENCAPSULANT/DELIVERY FILM OF
CHEMICALS AND ENZYMES

7.1 ZEIN AS ENCAPSULANT/DELIVERY FILM OF CHEMICALS AND ENZYMES

Zein can be self-assembled into fibers, micelles or films depending on the conditions used. For solutions cast onto surfaces (as used here), [249] reports that assembly into a film is first driven by interactions with the underlying surface, the evaporation of the ethanol and reorganization of zein in the aqueous over layer. It is also reported, that zein can immobilize enzyme to preserve their activity. Therefore, in 2006 antimicrobial food packaging was developed [65]. In this study alkaline phosphatase (ALP), present during the casting, is expected to become trapped in the zein matrix, possibly with some change in film morphology but preserving their activity.

Zein films are generally brittle with low water vapor [250]. In order to improve the effectiveness of active enzyme immobilization, plasticizers with polar groups like glycerol, sugars, polyethylene glycol, will generate numerous hydrogen bonds with the zein polypeptide chain [250,252]. In this work, different concentrations of glycerol embedded into the film were tested. Finally, a sensor based on the inhibition of ALP immobilized on zein film in presence of a fluorescent substrate (OMFP), was developed for inorganic phosphate detection in water samples. See [197].

7.1.1 Preparation of the biodevice and procedures

See Section 3.4.4 for device preparation.

Procedures

Free alkaline phosphatase activity in solution was measured by fluorescence molecular spectrometry in a vial containing Tris HCl buffer (2 mL, 100 mM, pH = 9.0), alkaline phosphatase (100 DEA units/mg) and the artificial substrate 3-O-methylfluorescein phosphate (OMFP) (2.4 μ M) (See **Table 18**). The OMFP was hydrolyzed by alkaline phosphatase to yield 3-O-methylfluorescein (OMF) that was detected by excitation at 485 nm and recording its emission at 513 nm in a quartz cuvette of 1 cm (path length). All the emission measurements were carried out at room temperature every 30 seconds for 5 minutes. The variation of the fluorescence intensity (RFI) over time, $\Delta(\text{RFI})/\Delta t$, was used to determine the initial rate (V). For the calibration of free ALP activity in aqueous solution, a calibration linear curve was obtained : initial rate vs ALP concentration from 2.5 to 500 units/mg. A linear calibration curve of inhibition by P_i (i =inorganic) was also obtained: initial rate vs P_i concentration from 0.5 to 5 mg/L in presence of 100 units/mL of ALP. Finally, the inhibition efficiency was obtained by the logarithm of P_i concentration vs the percentage of inhibition. The percentage of inhibition was calculated as follows:

$$\%INH = \frac{V - V_p}{V} \times 100$$

Where V is the initial rate without phosphate and, V_p is the initial rate with phosphate.

For the biodevice, measurements were carried out in a vial containing the enzyme disc and Tris HCl buffer (2 mL, 100 mM, pH = 9.0), followed by OMFP (2.4 μ M) addition after 30 seconds. The spiked and unspiked water samples were prepared in buffer Tris HCl (100 mM, pH 9.0) and all the emission measurements were carried out at room temperature every 30 seconds for 5 minutes. The emission values obtained were processed following the above mentioned procedure. A calibration curve was obtained: initial rate vs log of P_i concentration from 0.5 to 5 mg/L. In order to compare the response provided by immobilized ALP with respect to free ALP in solution, the following ratio called % relative activity were calculated by using the expression:

$$\% \text{ relative activity} = \frac{V_{\text{immobilized_ALP}}}{V_{\text{free_ALP}}} \times 100 \quad \text{Equation 1}$$

For the kit which contains OMFP-device and ALP-device the experimental process was: the OMFP-device was added to the buffer solution (2 mL, 100 mM, pH = 9.0) followed of addition of the ALP-device after 30 seconds. A calibration linear curve was obtained: initial rate vs log P_i concentration from 0.5 to 5 mg/L. All the emission measurements were carried out at room temperature every 30 seconds for 5 minutes. The same ratio established in equation 1 was calculated.

ALP, present during the casting, is expected to become trapped in the zein matrix, possibly with some change in film morphology. The immobilized ALP activity (**Figure 76**) and delivery from the zein biofilm (**Figure 77**) were tested by the fluorescent assay using the substrate OMFP in buffer. Free ALP in solution from 2.5 to 500 units/(mg·L) were analyzed every 30 seconds for 5 minutes (**Figure 76**).

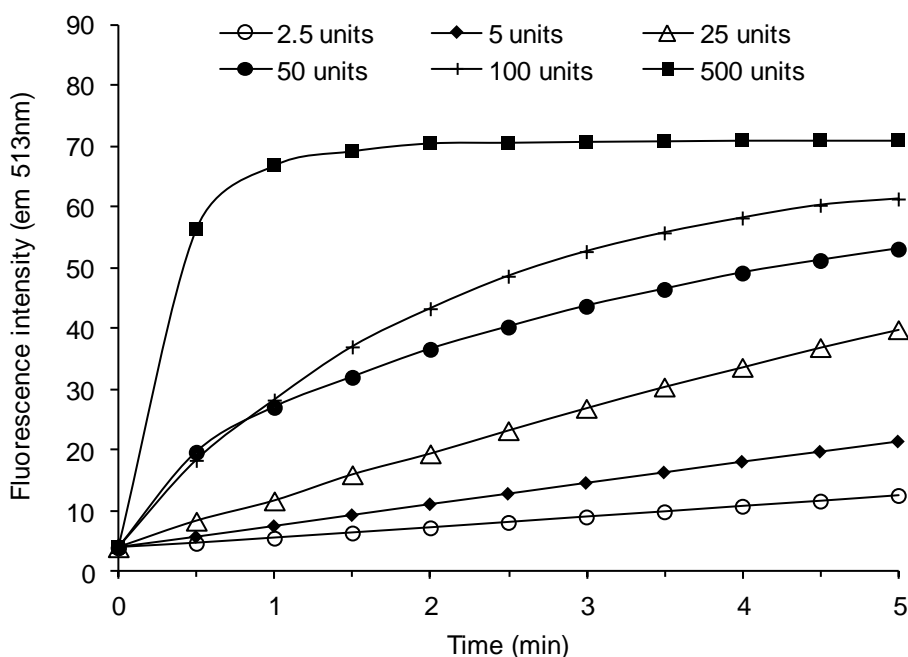


Figure 76. The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the initial rate for free ALP at concentrations from 2.5 to 500 units/mg. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM, pH=9.0) with $2.4\mu\text{M}$ of OMFP the fluorescence was recorded every 30s for 5 min.

7.1.2 Study of glycerol effect on zein film

Zein is a storage protein isolated from the maize endosperm. It consists of a mixture of polypeptides, dominated by α -zein (~20-25kDa, 70-85%), which is rich in leucine, proline, alanine, serine and glutamine, and γ -zein (~15k-30Da, 10-20%), which also has a high cysteine content. This creates an amphipathic structure which combines an antiparallel α -helical structure from α -zein, with the N-terminal driven polyproline II [253] type structure from α -zein, held together by disulfide bridges and inter- and intra-chain hydrogen bonding. Despite the polar glutamine and serine, this results in a rather hydrophobic insoluble material. Rhys and Dougan, for example have shown that hydrogen bonding between the side chain and backbone, associated with the polyglutamine sequence causes an insoluble structure due to side-chain/backbone internal hydrogen bond formation taking preference over hydrogen bonding with water [254] Nevertheless, ~50% of the amino acid content of zein is polar and side chain interactions provide a potentially well-stabilized environment for incorporation and stabilization of other proteins.

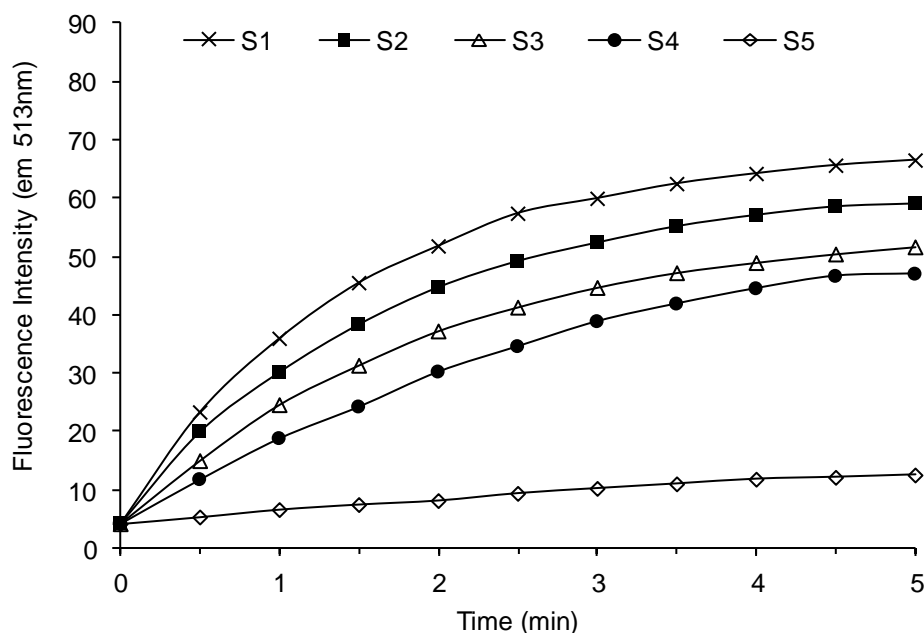


Figure 77. The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the initial rate for sensor of immobilized ALP at concentrations from 2.5 to 500 units/mg. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM, pH=9.0) with 2.4 μ M of OMFP the fluorescence was observed every 30s for 5 min.

Zein will self assemble into fibers, micelles or films depending on the conditions used. For solutions cast onto surfaces (as used here), [249] report that assembly into a film is first driven by interactions with the underlying surface the thence evaporation of the ethanol and reorganization of zein in the aqueous overlayer. ALP, present during the casting, is expected to become trapped in the zein matrix, possibly with some change in film morphology.

The immobilized ALP activity and delivery from the zein biofilm were tested by the fluorescent assay using the substrate OMFP in buffer. Free ALP in solution from 2.5 to 500 units/(mg·L) (**Figure 76**) and also immobilized ALP in zein from 50 to 500 units/(mg·L) (**Figure 77**) were analyzed every 30 seconds for 5 minutes. The fluorescent signal rate increased with increasing enzyme concentration until saturation, the enzyme activity in both cases; free ALP and ALP-biodevice followed a classical Michaelis-Menten behavior (**Figure 76 y 77**). As expected, the biodevices synthesized with different concentration of ALP showed increasing fluorescent rate according to the amount of enzyme immobilized. However, we showed that the initial rate of ALP immobilized was lower (**Figure 76**) than free ALP (**Figure 77**).

Zein films are generally rather brittle with low water vapor permeability (Xu et. al., 2012). Zein films are generally brittle with low water vapor permeability [250] In order to improve the effectiveness of active ALP immobilization, a more flexible film with higher water vapor permeability (and higher substrate and analyte permeability) is interesting. Different concentrations of glycerol embedded into zein films were tested. The film was prepared by 0%, 30%, 50%, 70% and 90% glycerol in zein by weight and was tested by the fluorescent assay using the substrate OMFP in buffer (**Figure 77**). Zein films are generally rather brittle with low water vapor permeability [251]. In order to improve the effectiveness of active ALP immobilization, a more flexible film with higher water vapor permeability (and higher substrate and analyte permeability) is required. Plasticisers with polar groups like glycerol, sugars, polyethylene glycol, will generate numerous hydrogen bonds with the zein polypeptide chain reducing the intermolecular forces between zein chains and increasing water vapor permeability [250, 252]. The effectiveness of active ALP immobilization was expressed as a % relative ALP activity (See **Section 7.1 Procedures**), calculated from initial rates for free ALP and immobilized ALP at different % of glycerol (**Figure 77 y 78**).

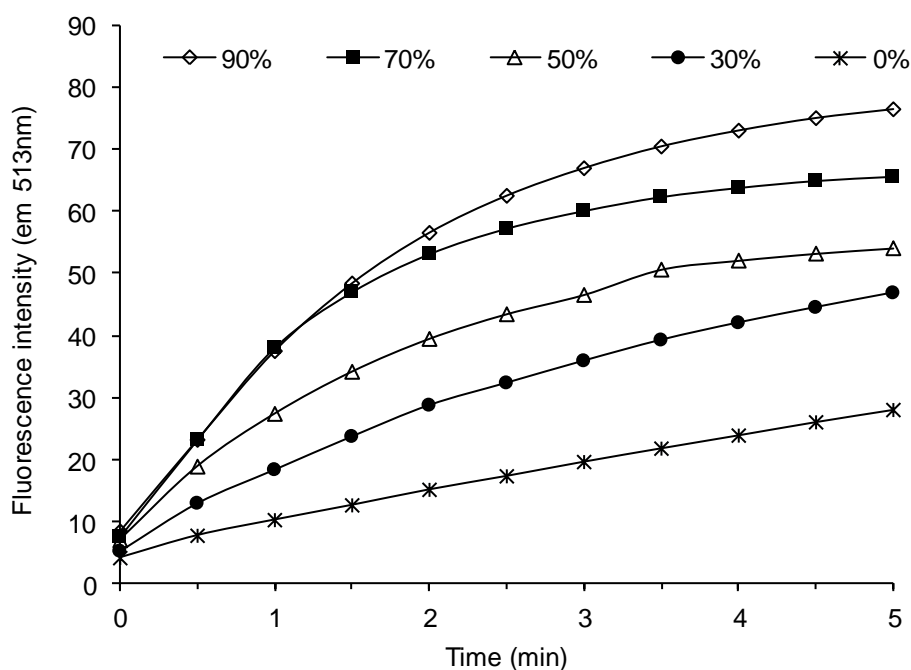


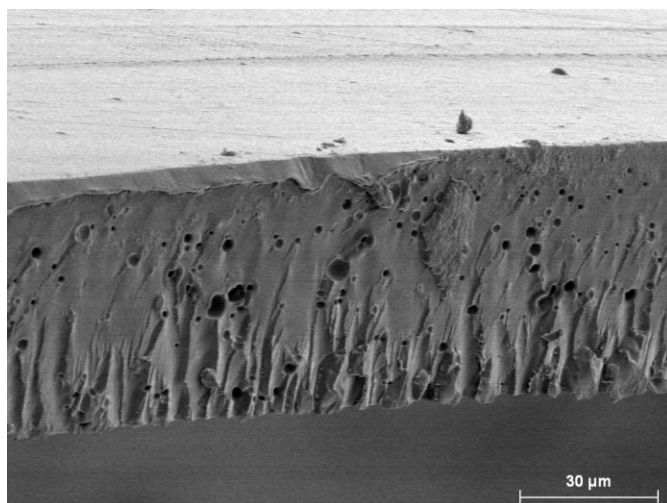
Figure 78. The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the initial rate of immobilized ALP (S1; 500 ALP units/mg) in a zein film prepared with different amounts of glycerol. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM, pH=9.0) with 2.4 μ M of OMFP the fluorescence was observed every 30s for 5 min.

Chapter 7. Zein As Encapsulant/Delivery Film of Chemical and Enzymes

As expected from this more hydrophilic plasticized film, we showed an increasing relative activity of ALP from 2% to 22% according with increasing % of glycerol. The glycerol is a biodegradable common polyol plasticizer; it is usually used as plasticizer in zein films to improve their physical properties, by polymer swelling as a result of diffusion of water molecules into the polymeric film matrix. Therefore, the increase of hydrophilicity of the film helps the ALP diffusion to solution and then, the fluorescent response increases. However, an overloaded of glycerol has a detrimental effect on the overall film physical properties. This has been seen in other studies, as an anti-plasticizing effect caused by high glycerol concentration, which can damage the continuity of the polymer network of a composite matrix resulting in a reduced integrity of the film [255]. When 90% glycerol in zein by weight was used, the ALP-biofilms are not completely formed and are brittle. Finally, 70% of glycerol was chosen as an optimal plasticizer amount for ALP- biodevice preparation. **Figure 79** showed that the porosity of the selected film S1 (**Figure 79B**) is higher compared with a film prepared without glycerol (**Figure 79A**). The porosity of the film in S1 stimulates the ALP delivery and that fact can explain the increasing of % relative activity according to increasing the % of glycerol. The relative enzymatic activity observed for this biodevice (~22%) is comparable with that reported for a sol-gel alkaline phosphatase (21%) [256].

Also, devices by OMFP immobilization into film were prepared. Non plasticizing effect was observed at 90% of glycerol on a zein weight basis and we decided to use this amount for developing the OMFP-device. Finally, we proposal a kit contained the OMFP-device and the ALP-device. Despite several optimization, the % of ALP activity showed using the kit was ~ 7%.

A)



B)

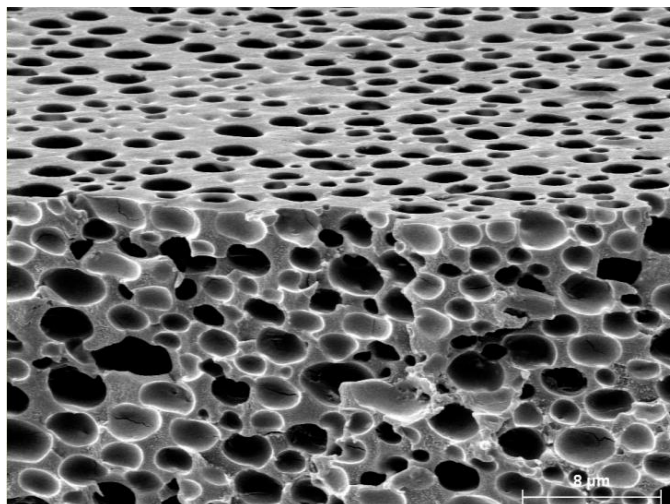


Figure 79. SEM images of zein device with ALP immobilized using A) 0% of glycerol (Scale bare 30 μm) and B) 70% of glycerol (Scale bare 8 μm) The porosity is higher in presence of glycerol.

7.1.3 Study of the ALP inhibition by phosphate

ALP catalyses the non-specific hydrolysis of orthophosphoric monoesters to alcohols. The biosensor is based on the inhibition of alkaline phosphatase (ALP) by hydrolyzing non-fluorescent OMFP to fluorescent OMF and phosphate (**Figure 80**). The OMFP was selected for this initial study due to its high binding, efficient hydrolysis and the simple enzyme kinetics compared to the diphosphate substrates. Their product OMF, is fluorescent ($\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 513\text{ nm}$) and also, yellow in solution (450 and 485 nm absorption maxima). Both color intensity and fluorescence increase over time [257]. Inorganic phosphate acts as an inhibitor of ALP competing with the substrate for the enzyme active site and results in the interference of enzyme for substrate specificity. Since the fluorescence intensity is proportional to the product concentration, resulting from the hydrolysis reaction, the decrease of the fluorescence caused by P_i inhibition was used for monitoring the P_i concentration (**Figure 80**).

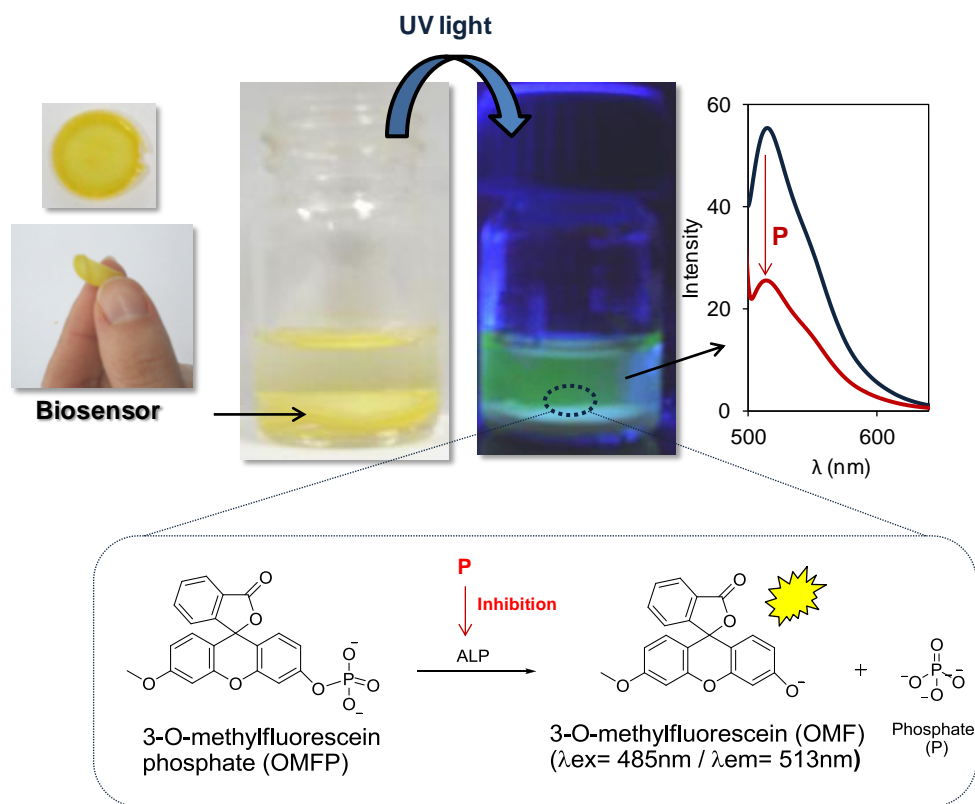


Figure 80. Picture of biodevice and schematic representation of alkaline phosphatase based fluorescent biodevice assay where the alkaline phosphatase (ALP) that hydrolyzed unfluorescent OMFP to fluorescent OMF is inhibited by inorganic phosphate in buffer solution at pH=9.

The substrate concentration for inorganic phosphate was investigated by varying it from 0.6 to 11.9 μM in buffer (pH 9.0) to find the maximum difference between the active enzymatic response to enzymatic inhibition caused by P_i (**Figure 81**). For 2.4 μM of OMFP the difference in emission values observed was around 26% while for 6 μM OMFP in solution it was 19% and for 0.6 μM , only 5%. Therefore, 2.4 μM of OMFP was selected as optimal substrate concentration.

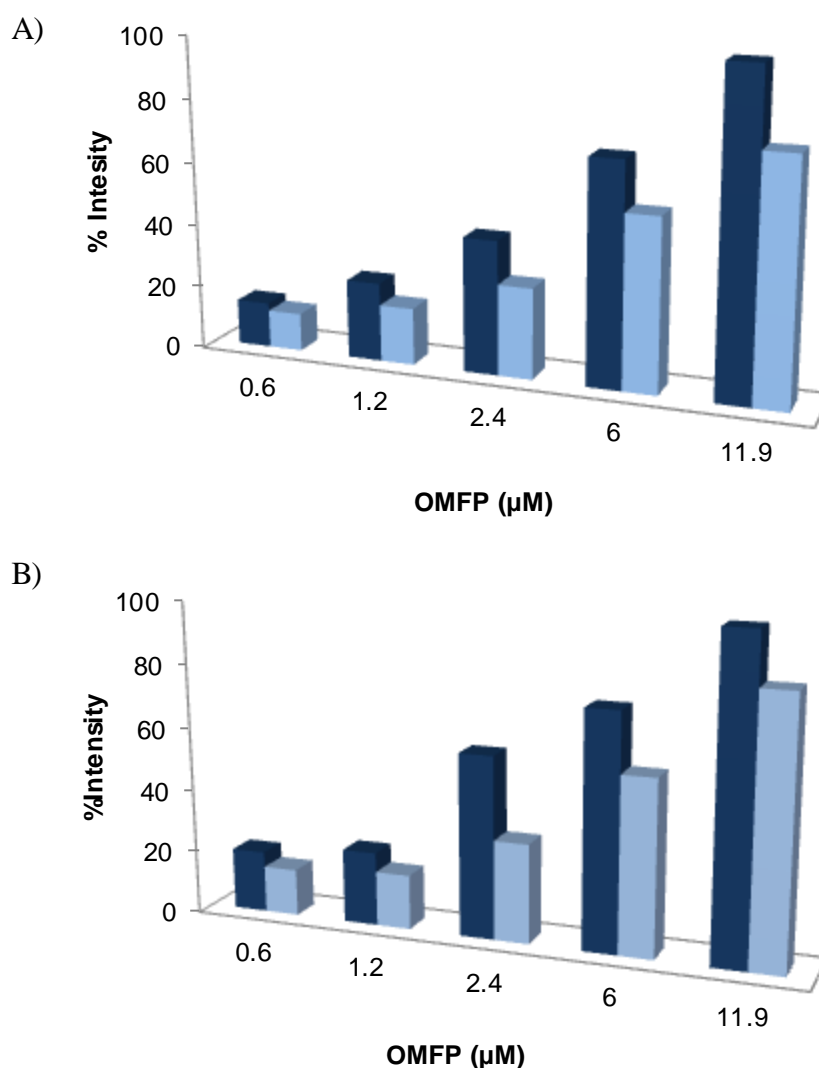


Figure 81. Effect of varying the OMFP concentration response in absence (navy blue) and presence of inhibitor (sky-blue) in free ALP in solution (up) and using the sensor S1 (down). Both experiments, the biodevice was measured in Tris HCl buffer (100 mM) and (b) at concentration 2.4 μM OMFP. The concentration of phosphate was 1 mg/L.

Also, it is important to determine the pH optimum for all enzyme assays to maximize the signal window between active enzymatic response and the inhibition response. The biodevice was monitored at different pH in order to show the variation in the response with and without inhibitor at substrate concentration 2.4 (μM) in buffer (Tris HCl 100 mM). We showed maximum variation in fluorescent signals at pH 9 and non variation signals at pH >9 (**Figure 82**). This is consistent with the normal optimum pH for alkaline phosphatases. The pH 9 was selected as optimal pH for Pi detection.

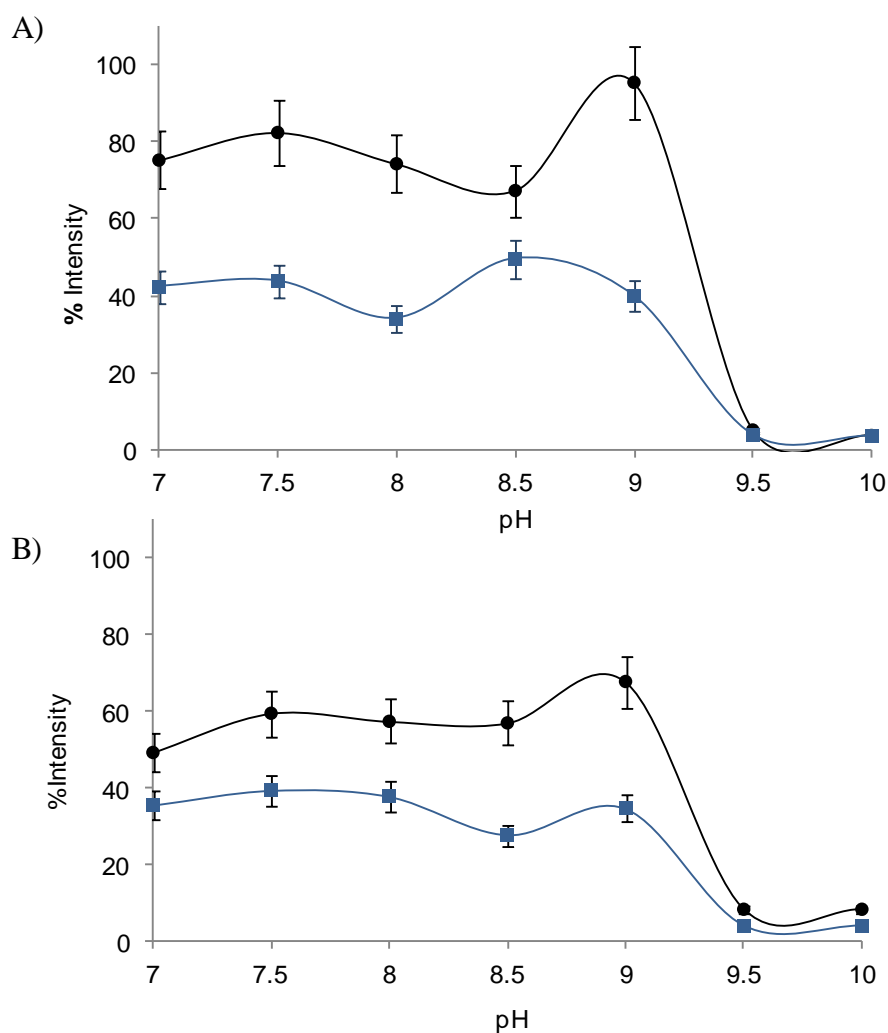


Figure 82. Effect of varying pH in solution (up) and on the biodevice response (down) in absence (navy blue) and presence of inhibitor (sky-blue). Both experiments, the biodevice was measured in Tris HCl buffer (100 mM) and (b) at concentration 2.4 μM OMFP. The concentration of phosphate was 1 mg/L.

The inhibition efficiency curves for phosphate were obtained by varying the inhibitor concentration (maintaining a constant substrate concentration, 2.4 μM of OMFP in solution) for 0.5 to 129.5 μM immobilized enzyme as shown in **Figure 83** enzymatic catalysis were calculated. To determine K_m for the selected substrate and biodevice, we varied the substrate concentration OMFP from 2.4 to 47.5 μM using six substrate concentrations and enzymatic response was measured at every 30 seconds for a total of 5 min. The **Figure 84** confirms the competitive nature of the phosphate ion inhibition, as an

increment in the value of Michaelis constant (K_m) from $9.4 \mu\text{M}$ to $37.6 \mu\text{M min}^{-1}$ which a similar V_{max} of $250 \mu\text{M min}^{-1}$. The inhibition constant (K_i) was also calculated for P concentration of 1mg/L . The K_i value was $108.6 \mu\text{M}$.

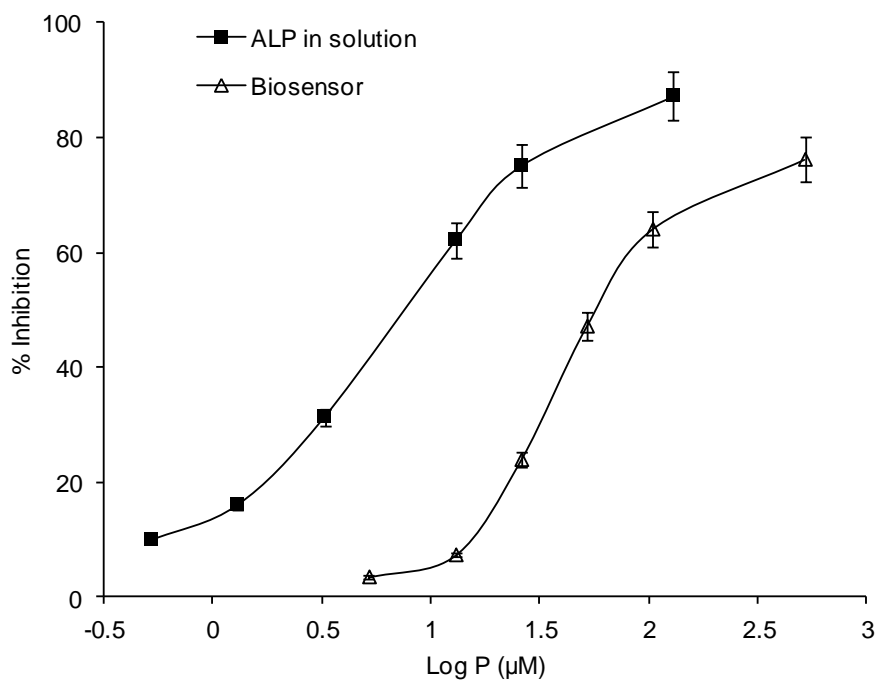


Figure 83. Inhibition efficiency curves for the free and immobilization ALP in the presence of P. The biodevice and free ALP (100 units/mg) was measured in Tris HCl buffer (100 mM, pH= 9.0).

The detection limit (LOD) using the ALP-biofilms was experimentally found at 0.2 mg/L (concentration that gives a three-times higher analytical signal than the blank) of P_i and the linear range was from 0.5 to 5 mg/L , being the lowest value the limit of quantitation (LOQ). The calibration equation was : Initial rate (V) = $-7.6708 \log\text{P}_i + 11.062$ ($R^2=0.99$). When both biodevices, ALP-biofilm and OMFP-biofilm, were employed the linear range was from 1.5 to 10 mg/L , LOD achieved was 0.5 mg/mL and the calibration equation was: $V = -2,1295 \log\text{P} + 6.8238$ ($R^2=0.99$)

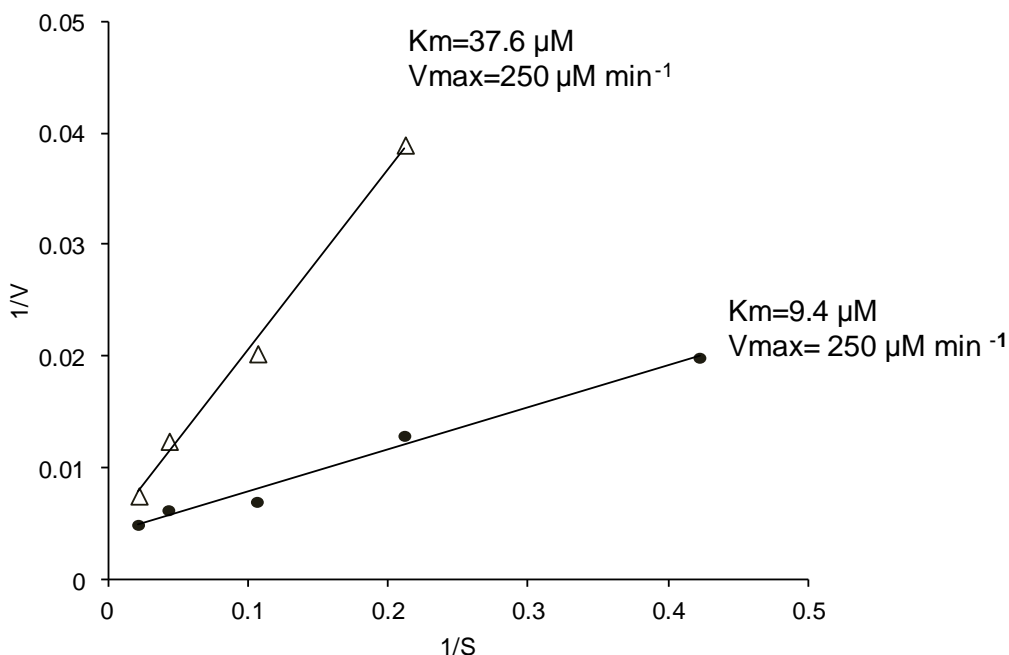


Figure 84. Lineweaver-Burk plot for immobilized ALP in the presence of P at 1 mg/L. All measurements were carried out in Tris HCl buffer (100 mM, pH=9.0) and at concentration 2.4 μM OMFP.

7.1.4 Application in water samples

The application of the biodevice was investigated for tap water, sea (Caracola beach, code DP007), river (Jucár river, code TJU3) and transition waters (Cullera lake, code TES3) collected at different points along the coast of the Comunidad Valencia area (Spain). The samples were prepared in buffer Tris HCl (100 mM, pH 9.0). The fluorescent substrate was added to the biodevice in buffer after 30s and the fluorescence intensity signal was measured. **Table 35** shows the concentrations of phosphate found using the ALP-biodevice compared with those provided by ALP in solution. As can be seen the results achieved by the two methods are in agreement. For all samples, the phosphate concentration was lower than 1 mg/L, according to maximum concentration of phosphate in coastal and surface waters allowed by legislation. Also tap water was in accordance with legislation (lower than 1mg/L). The phosphate recoveries obtained from all the samples spiked at 1.25 mg/L and at 5 mg/L were near 100 %, so the matrix effect is absent. The samples were also, analyzed by the conventional ammonium-molybdate method [258]. The mean concentrations of P_i found by the ammonium molybdate method for samples TJU3, TES3, DP007 and tap water are in agreement with those found by the

enzyme methods as can be seen in **Table 35** considering that the LOD is 1.0 mg/L for this method. The calibration equation was: $Abs = 0.0411 [P] + 0.1976$ ($n=5$, $R^2 = 0.999$).

The samples were also tested by using the kit containing both biofilms, in accordance of the results shown in **Table 35**, all samples except tap water were positively screened.

Table 35. Phosphate recovery from water samples by fluorescence inhibition of free ALP and ALP immobilized biodevice

Water sample	Standard method	Free ALP	Biodevice	Spiked [P]	Biodevice	Spiked [P]	Biodevice	Recovery (%)
TJU3	≈1(LOD)	0.8±0,1	0.9±0,1	1.25	2.4±0,2	5	6.5±0,5	112, 98
TES3	nd	0.5±0,1	0.4±0,1	1.25	1.6±0,2	5	5.4±0,5	97, 100
DP007	nd	0.5±0,1	0.4±0,1	1.25	1.5±0,2	5	4.7±0,5	103, 89
Tap	nd	nd	nd	1.25	1.4±0,2	5	4.9±0,5	112, 98

nd-not detected

[P]-phosphate concentration at mg/L

Precision and stability of biofilms

The precision of the immobilized ALP back to back was assessed by carrying out six synthesis using the same experimental process. The biodevice was tested by fluorescence to show that the relative standard deviation (RSD) was 6.6 % ($n = 6$). The precision for phosphate detection at 1 mg/L was calculated for $n=3$ measurements for 5 days and the relative standard deviation (RSD) was 6.2 %. The storage stability was assessed by measuring activity after storage at room temperature, at 4°C and at -20°C for 20 days (**Table 36**). The activity is not markedly modified as can be derived from **Table 35**. The **Table 36** showed the % of ALP for different storage conditions.

Table 35. Stability of devices after 20 days in different conditions of storage.

Device	Day 0	-20C	4°C	Room temperature
S1	6%	6%	6%	6%
S1_30%	8%	19%	8%	7%
S1_50%	16%	12%	14%	12%
S1_70%	18%	22%	13%	12%
S1_90%	22%	26%	29%	10%

Measurements were day after 20 days of the synthesis device, S1 is the device prepared by zein, S1_30%, 50%, 70%, 90% is the devices prepared by zein and % of glycerol.

7.1.5 Conclusions

a) A simple disposable environmentally friendly biodevice for phosphate determination in natural waters was developed.

b) The biodevices were successfully applied to the measurement of P_i in river, lake, coastal water and tap water samples. The detection limit achieved by the ALP-biodevice was 0.2 mg/L of P_i and the linear range from 0.5 to 5 mg/L, which covers the legislative range, which specifies maximum annual mean total concentration of 1-2 mg/L, is fulfilled.

c) The LOD found, employing the two devices, ALP-biofilm and OPFP biofilm, was 0.5 mg/L, useful for sample screening analysis.

d) Suitable immobilization of both, the OMFP and ALP showed in this work, is of interest to develop green devices based on the utilization of biodegradable materials [259].

e) In conclusion, the methodologies reported represent reliable and green alternatives to the conventional colorimetric method of phosphate due to its sensitivity, simplicity and low cost. The biofilms can be a useful tool for on-site monitoring of phosphate in the environmental field.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

Se han utilizado nuevos materiales para el desarrollo de metodologías analíticas más sostenibles;

IT-SPME-CapLC-DAD: se trata de una alternativa verde a la utilización de la LC convencional. LC Capilar es una miniaturización de la CL convencional, se utilizan cantidades menores de disolventes. Además, el IT-SPME permite introducir la muestra directamente en el sistema, se reducen e integran etapas en línea de forma que se automatiza todo el proceso de análisis.

Se ha desarrollado un método para IT-SPME-CL-Cap-DAD para la detección de los dialquiloftalatos (DEHP, DBP, DEP) más comunes y el monoalquiloftalato (MEHP) en muestras de agua y orina con el fin de estudiar la degradación del DEHP. El IT-SPME preconcentra y extrae los analitos sin necesidad de realizar ninguna etapa de tratamiento de la muestra fuera de línea. Este método presenta ventajas frente a los métodos GC normalmente utilizados para la detección de ftalatos, la utilización del método descrito para IT-SPME-CL-Cap-DAD reduce el riesgo de contaminación de la muestra, ya que la muestra se introduce directamente en el sistema (sin ser tratada). La separación e identificación de los 4 ftalatos se ha realizado con éxito mediante optimización de la fase móvil y la acidificación de la muestra que permitió extraer de forma más efectiva el MEHP. El método propuesto en esta Tesis es el primer método para la estimación de dialquiloftalatos en orina.

Se han modificado las columnas capilares utilizadas en IT-SPME con CNTs y se ha conseguido disminuir los LODs para compuestos como los PAHs. Se ha demostrado que la retención no solo depende de la polaridad de los compuestos analizados sino que también está regida por las interacciones entre los analitos y los CNTs. La selectividad de las columnas capilares con la incorporación de los cambia, se puede mejorar en selectividad del proceso y evitar etapas de tratamiento de muestra en el caso de matrices complejas.

Dispositivos sólidos como encapsuladores y dispensadores de reactivos o sensores: se trata de una alternativa verde a la utilización de técnicas o equipos complejos en cuanto no se requiere de una fuente de energía externa. Supone una alternativa verde también a la utilización de reactivos derivatizantes o enzimas en disolución, ya que no se generan tantos residuos. La seguridad del operador durante el análisis es mayor ya que los reactivos se encuentran embebidos dentro de la matriz y se reduce su toxicidad. Además, estos sensores permiten una monitorización de los analitos en el lugar de origen y en tiempo real. Es importante destacar que otra de las ventajas de estos dispositivos es su aplicabilidad, cualquier operador puede utilizarlos y presentan un coste bajo.

Capítulo 8. Conclusiones

En esta Tesis, se ha desarrollado un sensor colorimétrico a partir de AuNPs que permite la detección de SPN de forma sensible (a nivel nM) y selectiva (es capaz de distinguir entre compuestos de una misma especie, poliaminas biogénicas). Se ha aplicado a voluntarios sanos y pacientes con cáncer mostrando diferencias significativas. Este método presenta ventajas frente a otros métodos (como los métodos cromatográficos) que requieren de un coste superior, operadores especializados, tratamientos de muestra más complejos, derivatización de las aminas y tiempos de análisis relativamente altos. Por otra parte, presentan ventajas frente a los métodos fluorimétricos en los cuales se utilizan diversos tipos de sensores los cuales su diseño y síntesis resulta complejo. Los métodos ópticos permiten la detección por inspección visual y no requieren de ninguna fuente de energía externa. La sensibilidad y selectividad observada en este ensayo, no se consigue con ninguno de los métodos colorimétricos reportados para la detección de aminas biogénicas.

Existen pocos métodos de detección de aminas volátiles que permitan su detección de forma pasiva con una sensibilidad adecuada (mg/m^3). En este trabajo se ha desarrollado un sensor para la discriminación y estimación de aminas volátiles de forma pasiva con niveles de detección sensibles a los $1\text{-}10 \text{ mg/m}^3$. La mayoría de métodos requieren de muestreo activo. Los sensores presentados en esta Tesis permiten la detección y cuantificación de los analitos por inspección visual directa, mientras que la mayoría de métodos sensibles a aminas y otros compuestos volátiles utilizan mapas distintivos que requieren de interpretación. Otra de las ventajas destacables de estos sensores, es su estabilidad con el tiempo, y su coste bajo.

Los métodos utilizados para la determinación de compuestos amfetemínicos en drogas en controles policiales deben ser portátiles y presentar un tiempo análisis breve. Para ello se ha desarrollado un sensor que permite la determinación de AMP, MAMP, MDA y MDMA en éxtasis. En este sentido, el sensor desarrollado presenta ventajas frente a los métodos colorimétricos en disolución, en cuanto que no es necesario preparar los reactivos, ni presenta problemas de estabilidad de los mismos. Además, también presenta ventajas frente a los métodos de FTIR portátiles los cuales para la identificación de los principios activos utilizan bibliotecas espectrales de compuestos. Estas bibliotecas son limitadas y cuando la droga presenta diferentes excipientes, que es en la mayoría de los casos, resulta difícil la identificación de los compuestos amfetamínicos. Las etapas cruciales para el desarrollo de los sensores han sido, a) la solidificación de los sensores, b) la selectividad frente a otros excipientes, c) la validez del método para la detección de drogas. Todas y cada una de ellas han sido evaluadas. En el primer caso se han utilizaron NPs SiO_2 que permitieron desarrollar sensores con mejor gelificación así como también más resistentes, la selectividad del sensor frente a excipientes comunes se evaluó, mostrando respuesta a la efedrina y la procaina. Finalmente, la validez del método se ha

comprobado por LC mostrando resultados muy similares y también mediante la caracterización de la muestra por FTIR.

En este trabajo, se ha desarrollado un sensor para la determinación de amonio en aguas y muestras de extractos de PM₁₀. La optimización de la etapa de encapsulación y estudio de las condiciones de difusión y dispensación de los reactivos ha sido una parte importante del desarrollo del sensor. Se han conseguido embeber dos de los tres reactivos necesarios para la reacción de derivatización (timol y nitroprusiato), la dilución de los reactivos a la disolución se ha facilitado reduciendo el volumen de muestra (sin que esto afecte en la sensibilidad) e incrementando la superficie de contacto dividiendo el sensor en fracciones. Las ventajas del método han sido comentadas comparando con métodos y se ha desarrollado un método de cribado para amonio en aguas.

Se ha desarrollado un sensor a partir de la inmovilización de la enzima ALP en un soporte biodegradable para la determinación de P_i en aguas. Las propiedades del film han sido mejoradas al añadir glicerol. Los films se vuelven menos quebradizos. Se ha comprobado por SEM que aumenta considerablemente la porosidad del film y la dispensación a la disolución de la ALP disolución es mejor con lo que se incrementa la sensibilidad para la detección de P_i. La mayoría de métodos utilizados para detección de fosfatos presentan ciertos problemas: la selectividad no es buena (muchos de ellos utilizan receptores que también son complejados por otros iones) el intervalo de concentraciones de fosfato no es el adecuado para su detección en aguas (existen métodos muy sensibles o poco sensibles) y los métodos colorimétricos (que son los más comunes) utilizan reactivos tóxicos. El sensor desarrollado no presenta toxicidad alguna y además es biodegradable. La sensibilidad y selectividad son adecuadas, se ha probado en muestras de aguas y se ha demostrando su validez por comparación con el método colorimétrico comúnmente utilizado [197].

La importancia de la elección de los materiales en el desarrollo de metodologías analíticas queda demostrada:

Las **AuNPs** sintetizadas pueden utilizarse como sensores colorimétricos sensibles y selectivos de biomarcadores en muestras biológicas de voluntarios sanos y pacientes de cáncer. Se presenta una síntesis de AuNPs nueva que permite obtener AuNPs semi-desnudas. Se ha demostrado que las AuNPs semi-desnudas presentan mayor sensibilidad y selectividad que las AuNPs recubiertas de ligandos.

El **PDMS** tiene múltiples aplicaciones, una de ellas es como fase extractante. EL PDMS actúa como fase extractante y posibilita el pre-tratamiento de muestra en línea mediante IT-SPME. Otra de sus aplicaciones es como encapsulante. El PDMS es un buen

Capítulo 8. Conclusiones

encapsulante y protector de la estabilidad de los reactivos. Puede actuar como dispensador de los reactivos embebidos a la disolución o como sensor sólido donde la derivatización del reactivo tiene lugar en su interior. En este trabajo se ha modificado la matriz polimérica del PDMS con TEOS y también, con MPs de SiO₂ con éxito. Por primera vez, se ha conseguido hidrofilar el PDMS mediante un proceso simple, en una sola etapa utilizando TEOS.

Los **CNTs** tienen un área superficial muy elevada y presentan una gran estabilidad. Son fases extractivas ideales para IT-SPME, sobre todo para compuestos donde las interacciones electrónicas π - π consiguen extraer mayor cantidad de analito. Se ha demostrado que su aplicación a IT-SPME permite incrementar los porcentajes de extracción y la sensibilidad.

La **zeína** es un material biodegradable que puede utilizarse como soporte estabilizante y dispensador de reactivos. La zeína consigue estabilizar enzimas en un soporte sólido sin que estas pierdan su función. Supone una alternativa más ecológica a los polímeros no biodegradables.

En la siguiente página se resumen los métodos analíticos propuestos en esta Tesis y se resaltan algunas de sus características más importantes.

The results obtained with the advanced materials studies proposed in this Thesis contribute to develop green analytical methodologies. In this work, optical devices and automated/miniaturized methods were used to analyte estimation in real samples (Table 37: Green analytical aspects of proposed methods in this Thesis).

Method	IT-SPME-CapLC-DAD	Optical devices
Material studied	PDMS and PDMS modified with CNTs	PDMS, Zein and AuNPs
Green principles of GAC	<ul style="list-style-type: none"> • Automated/miniaturized analysis • Integration of analytical processes on-line • Direct sample analysis • Minimization of wastes • No toxic reagents • No derivatization reactions • Safe procedures 	<ul style="list-style-type: none"> • In situ measurements • No external energy source • Minimization of waste • Direct sample analysis • Renewable sources (zein) • Minimization of waste • Minimization of reagent toxicity • Safe procedures
Analytes	Phthalates, PAHs, pyrethroids, triazines, organophosphorus	Volatile amine, amphetamine compounds, ammonium and inorganic phosphate
Matrix	Urine and water	Water and air
Some green alternatives to make analytical method greener	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC-Capillary is a green alternative. It is a miniaturized method. • IT-SPME is a green alternative. The analysis can be made online. 	<ul style="list-style-type: none"> • Optical devices are green alternative to electrochemical devices due to non required energy source. • Optical devices are green alternatives to colorimetric test in solution due to generated less wastes.

Study of materials properties is crucial to select appropriate materials for sensing and extraction applications. On one hand, sensing applications require highly sensitive and predictable responses over suitable analyte concentrations range. On the other hand, extraction application required materials with suitable partition properties and permeability properties to be good adsorbents.

Based on the materials used and the results obtained it can be concluded that:

a) "Naked" AuNPs are highly sensitive sensors for analyte detection; the LODs are ppb or (nM).

b) PDMS has many applications; is an excellent extractive phase due their coefficient partition and properties and stability and also, is an optimal

Capítulo 8. Conclusiones

encapsulant/disperser of dyes due to permeation properties and transparent aspect. The hydrophobicity is an important limitation that has been settled by addition of TEOS. That is, for the first time, a simple process reported in this Thesis.

c) CNTs immobilized on commercial capillary column is an excellent extractive phase mainly for analytes that can interact through π - π stacking interaction.

d) Zein is a natural polymer that could replace non-biodegradable polymers. The preparation of zein films is easy and allow the immobilization of chromophores and enzyme which remains their activity.

The following **Table 38** compare the results obtained in this Thesis for the materials used and the context in which was used for developing the application.

Table 38. Summary of materials and analytical methods proposed in this Thesis.

Materials	AuNPs	PDMS	PDMS- CTNs	PDMS- TEOS- NQS	PDMS- TEOS- NQS- SiO ₂	PDMS- thymol/ Nitropru- ssiate	zein
Disposition of material	In solution	Coating of column capillary	Coating of column capillary	Film	Film	Film	Film
Sample	Urine of healthy and unhealthy donors	Water samples and washing samples	Water sample	Fish odors	Power extacis	Water samples and PM ₁₀ extracted	Water samples
Sample preparation	SPE	IT-SPME	IT-SPME	-	-	-	-
Analyte	SPN	DEP, DBP, DEHP, MEHP	PAHs, pyrethroids, triazines, organophosphorus	Primary and secondary amines	AMP, MAMP, MDA, MDMA,	NH ₄ ⁺	P _i
Strategy of analysis	AuNPs aggregation	-	-	Derivatization	Derivatization	Derivatization	Inhibition
Separation technique	-	CapLC	CapLC	-	-	-	-
Detection technique	Absorbance	DAD	DAD	Absorbance	Absorbance	Absorbance	Fluorescence
LOD	25 ppb	0.15 ppb	0.03 ppb	50 ppmv	2500 ppb	400 ppb	200 ppb
Time	20 s	30 min	30 min	60 min	10 min	10 min	30-300s
Cost	€€	€€€	€€€	€	€	€	€
Portability	yes	no	no	yes	yes	yes	yes
Toxicity	No	no	no	no	no	yes	no

Perspectivas Futuras

El diseño de dispositivos para análisis in situ es cada vez más necesario. La monitorización del medioambiente es esencial para controlar la contaminación ambiental y garantizar la preservación de nuestro entorno.

El desarrollo de dispositivos que sean simples, que cualquier persona; sin ser experta, ni tener conocimientos previos pueda utilizarlos, que no resulten tóxicos para las personas ni para el medioambiente y que además, presenten un coste económico bajo, son características muy importantes para asegurar la funcionalidad y aplicabilidad de los dispositivos desarrollados.

En este sentido, y desde un punto de vista de la necesidad de la transferencia de los conocimientos adquiridos en esta Tesis a la sociedad, algunas de nuestras perspectivas futuras se centran en estudiar las aplicaciones específicas de los sensores propuestos, por ejemplo, para controlar los niveles de contaminantes en procesos industriales según la legislación. Actualmente, nuestro grupo de investigación mantiene un contacto directo con empresas, las cuales están probando algunos de nuestros dispositivos (**Patente ES248247B1**). Mejorar las prestaciones de los dispositivos dependiendo de las necesidades concretas y específicas de cada caso, es una de las propuestas planteadas para próximas investigaciones.

En el campo de la Medicina; la detección y control de biomarcadores in situ supone un campo en evolución. La medicina preventiva por ejemplo, aboga por el control y la prevención de las enfermedades antes que la curación, para ello, los métodos de cribado o screening de a partir de biomarcadores son importantes. El ensayo colorimétrico con AuNPs desarrollado en estas Tesis puede utilizarse como método de cribado para la detección del cáncer y más apropiadamente, para evaluar la efectividad de los tratamientos contra el cáncer en el paciente. Actualmente, el ensayo desarrollado en esta Tesis se encuentra en fase de investigación translacional (**Proyecto Translacional PROGRAMA VLC-BIOMED**). Extender el estudio a un grupo poblacional más amplio y representativo, así como mejorar características de aplicabilidad del ensayo (inmovilizar las AuNPs en un soporte sólido, evitar el tratamiento de la orina etc) son aspectos interesantes a considerar con el fin de desarrollar el test colorimétrico.

En cuanto al análisis de trazas, los equipos automatizados cromatográficos son una de las alternativas más utilizadas para su análisis. La miniaturización de estos equipos como es el caso de la CL capilar permiten utilizar cantidades menores de disolventes así como generar menos residuos, reduciendo la contaminación y los costes económicos. La IT-SPME (como miniaturización de la SPME) se ha convertido en una técnica muy utilizada. Aumentar la eficiencia en la extracción y separación de analitos, es posible funcionalizando las columnas capilares con nanomateriales. La mayoría de

Capítulo 8. Conclusiones

nanomateriales tienen una área superficial muy grande en comparación con su tamaño, con lo que pueden ser buenas especies adsorbentes. Partiendo de los trabajos realizados con capilares modificados con CNTs en esta Tesis, futuras experiencias se centrarán en introducir modificaciones en el IT-SPME con el fin de permitir análisis más sensible, rápidos y reproducibles, y con un consumo más reducido de disolventes. Solventando así una de las desventajas de la CL que es la utilización de cantidades considerables de disolvente que garanticen la extracción de los analitos.

Los films de zeína desarrollados en esta Tesis son capaces de embeber diferentes reactivos y enzimas. Actualmente, se encuentra en desarrollo un kit de detección de organofosforados en aguas y en pesticidas comerciales. También se encuentra en desarrollo un sensor para la estimación de alcalina fosfatasa en saliva por simple inspección visual.

Los nanomateriales y también, los materiales poliméricos biodegradables como son los nuevos materiales de este siglo. Estudiar su comportamiento y sus propiedades, considerando alternativas más sostenibles y con mayor aplicabilidad, han sido los principios generales en los que se ha basado esta Tesis. Estos mismos principios serán objetivos clave, para la elaboración y desarrollo de las investigaciones científicas futuras.

BIBLIOGRAFIA

- [1] C. Mijangos, J.S. Moya. *Nuevos Materiales en la Sociedad del Siglo XXI*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Madrid, 2007.
- [2] M. Farré, S. Pérez, C. Gonçalves, M.F Alpendurada, D. Barceló. *Trends in Analytical Chemistry*, 2010, 29, 11.
- [3] C.L. Arthur, J. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*. 1990, 62, 2145.
- [4] S.A.S. Wercinski, J. Pawliszyn. *Solid Phase Microextraction: A Practical Guide*. Marcel Dekker, New York, USA, 2009.
- [5] L. He, C.-S. Toh. *Analytical Chimica Acta*. 2006, 556, 1.
- [6] M. de la Guardia, K.D. Khalaf, B.A. Hasan, A. Morales-Rubio, V. Carbonell. *Analyst*. 1995, 12, 231.
- [7] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008, 27, 6.
- [8] P.T. Anastas, J.C. Warner. *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford University Press, New York, 1998.
- [9] K.A. Willets, R.P. Van Duyne, *Annual Review of Physical Chemistry*. 2006, 58, 267.
- [10] M.E. Stewart, C.R. Anderton, L.B. Thompson, J. Maria, S.K. Gray, J.A. Rogers, R.G. Nuzzo. *Chemical Reviews*. 2008, 108, 494.
- [11] M. Valcárcel, A.I. López-Lorente. *Comprehensive Analytical Chemistry: Gold Nanoparticles in Analytical Chemistry*. Wilson and Wilson's, Elsevier, 2014.
- [12] L.S. Otto, R.G. Finke. *Inorganic Chemistry*. 2006, 45, 8382.
- [13] G.B. Khomutov, V.A. Koksharon. *Advances Colloid and Interface Science*. 2006, 122, 199.
- [14] W. Ostwald. *Lehrbuch der Allgemeinen Chemie*, vol. 2, part1. Leipzig, Germany. 1896.
- [15] J. Polte, R. Erler, A.F. Thünemann, S. Sokolov, T.T. Ahner, K. Rademann, F. Emmorling, R. Kraehnet. *ACS Nano*. 2010, 4, 1076.
- [16] J. Turkey. P.C. Stevenson, J. Hillier. *Discussions Faraday Society*. 1951, 55.
- [17] M.B. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R.J. Whyman. *Chemical Society, Chemical Communications*. 1994, 801.
- [18] N. Jorner-Martínez, M. González-Béjar, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, Julia Pérez-Prieto. *Analytical Chemistry*. 2014, 86, 1347.

Bibliografía

- [19] K. Saha, S.S. Agasti, C. Kim, X. Li, V.M. Rotello. *Chemical Reviews*. 2012, 112, 2739.
- [20] R.R. Liu, R.S. Liew, H. Zhou, B.G.Xing. *Angewandte Chemie International Edition*. 2007, 46, 8799.
- [21] Y. Jiang, H. Zhao, Y. Q. Lin, N.N. Zhu, Y.R. Ma, L.Q. Mao. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, 49, 4800.
- [22] G.-H. Chen, W.-Y. Chen, Y.-C. Yen, C.-W. Wang, H.-T. Chang, C.-F. Chen. *Analytical Chemistry*. 2014, 86, 6843.
- [23] A. K.M. Jamil, E. L. Izake, A. Sivanesan, P. M. Fredericks. *Talanta* 2015, 134, 732.
- [24] L. Beqa, A. K. Singh, S. A. Khan, D. Senapati, S. R. Arumugam, P. C. Ray. *Applied Materials Interface*. 2011, 3, 668.
- [25] P. Liu, X. Yang, S. Sun, Q. Wang, K. Wang, J. Huang, J. Liu, L. He. *Analytical Chemistry*. 2013, 85, 7689.
- [26] J. Hu, H. Dai, Y. Sun, P. Ni, Y. Wang, S. Jiang, Z. Li. *RSC Advances*, 2014, 4, 43998.
- [27] K. Esumi, N. Takei, T. Yoshimura. *Colloidal Surfaces B: Biointerfaces*. 2003, 32, 11.
- [28] D. Philip. *Physica E*. 2010, 42, 1417.
- [29] A.L. Parry, N.A. Clemson, J. Ellis, S.S.R. Bernhard, B.G. Davis, N.R. Cameron, *Journal of the American Chemical Society*, 2013, 135, 9362.
- [30] C. J. Bueno-Alejo, C. D'Alfonso, N.L. Pacioni, M. González-Béjar, M. Grenier, O. Lanzalunga, E. I. Alarcon, C. J. Scaiano. *Lagmuir*. 2012, 28, 8183.
- [31] J. Zeng, Y. Cao, J. Chen, X. Wang, J. Yu, B. Yu, Z. Yan, X. Chen. *Nanoscale* 2014. DOI: 10.1039/c4nr02560a
- [32] J. Boken, S. Thatai, P. Khurana, S. Prasad, D. Kum. *Talanta*. 2015, 132, 287.
- [33] R. Zou, X. Lou, H. Ou, Y. Zhang, W. Wang, M. Yuan, M. Guan, Z. Luo, Y. Liu. *RSC. Advances*. 2012, 2, 4636.
- [34] A. Izuka, H.H. Winter, T. Hashimoto. *Macromolecules* 1992, 25, 2442.
- [35] J. Biggs, K. Danielmeier, J. Hitzbleck, J. Krause, T. Kridl, S. Nowak, E. Orselli, X. Quan, D. Schapeler, W. Sutherland, J. Wagner. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013, 52, 2.

- [36] P.S. Dittrich, A. Manz, *Nature Reviews Drug discovery*. 2006, 5, 210.
- [37] V. R. Sastry. William Andrew Publishing, Norwich, 2009.
- [38] P.S. Dittrich, A. Manz, *Natural Reviews Drug Discovery*. 2006, 5, 210.
- [39] J.N. Lee, C. Park, G.M. Whitesides. *Analytica Chemistry*. 2003, 75, 6544.
- [40] S. Seethapathy, T. Górecki. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218, 143.
- [41] Sylgard Elastomer 184 Kit Product Information (Dow Corning).
- [42] K. Ma, J. Rivera, G.J. Hirasaki, S.B. Biswal, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2011, 363, 371.
- [43] H. Mao, W. Wu, D. She, G. Sun, P. Lv, J. Xu. *Small* 2014, DOI: 10.1002/smll.201300036.
- [44] C. Cha, E. Antoniadou, M. Lee, J. H. Jeong, W. W. Ahmed, T. A. Saif, S. A. Boppart, H. Kong. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013, 52, 6949.
- [45] S. Seethapathy, T. Górecki. *Analytica Chimica Acta*. 2012, 750, 48. S.A.S.
- [46] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, *Analytica Chimica Acta*. 2009, 655, 8.
- [47] J. Wu, J. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*. 2001, 73, 55.
- [48] Y. Saito, K. Jinno. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1000, 53.
- [49] J. Chen, J. B. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*. 1995, 67, 2530.
- [50] R. Eisert, J. Pawliszyn. *Analytical Chemistry*. 1997, 69, 3140.
- [51] H. Bagheri, A. Salem. *Chromatographia* 2004, 59, 501.
- [52] D. Globig, C. Weickhard. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2005, 381, 656.
- [53] C. Cháfer Pericás, R. Herraéz-Hernández, P. Campíns-Falcó. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1125, 159.
- [54] M.C. Prieto-Blanco, C. Cháfer Pericás, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1188, 118.
- [55] M. C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó. *Analytical Chemistry*. 2009, 81, 5827.
- [56] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herraéz-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez. *Chromatography A*, 2010, 1217, 2695.

Bibliografía

- [57] Y. Moliner-Martínez, H. Prima-Garcia, A. Ribera, E. Coronado y P. Campíns-Falco. *Analytical Chemistr.* 2012, 84, 7233.
- [58] R. A. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, H. Prima-Garcia, A. Ribera, P. Campíns-Falcó, R. J. Zaragozá. *Nanomaterials.* 2014, 4, 242.
- [59] Y. Moliner-Martínez, P. Serra-Mora , J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó P. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2015, 407,1485.
- [60] N. Jornet-Martinez, P. Serra-Mora, Y.Moliner-Martinez, R.Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó. Artículo en revisión en la revista *Chromatography.*
- [61] R. Reiners, J. Wall, G. *Inglett, Industrial Uses of Cerals.* American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN, 1973, 285.
- [62] R. Shukla, M. Cheryan. *Industrial Crops and Products.* 2001, 13, 171.
- [63] J. Core. *Agricultural Research Magazine.* 2002, 50, 20.
- [64] J. Luecha, A. Hsiao, S. Brodsky, G.L. Liu, J.L. Kokini. *Lab on a Chip.* 2011, 11, 3419.
- [65] Ç. Mecitoflu, A. Yemenicioflu, A. Arslanoflu, Z.S. Elmac, F. Korel, A.E.Çetin. *Food Research International.*2005, 39,12.
- [66] P.B. O'Donnell, C. Wu, J. Wang, L. Wang, B. Oshlack, B. M. Chain, R. Bodmeier, J. McGinitu. *European Journal of Pharmaceutic and Biopharmaceutics,* 1997, 43, 83.
- [67] F. Wu, J. Wei, C. Liu, B. O'Neill, Y. Ngothai. *Composites Part B: Engineering.* 2012, 43, 2192.
- [68] V. Cabra, R. Arreguin, A. Galvez, M. Quirasco, R. Vazquez-Duhalt, A. Farres. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2005, 53, 725.
- [69] Luo, Y.; Wang: *Journal of Applied Polymer Science.* 2014, 131. DOI:10.1002/APP.40696.
- [70] Wang, Q.; Xian, W.; Li, S.; Liu, C.; Padua, G.W. *Acta Biomaterialia.* 2008, 4, 844.
- [71] F.F. Sousa, A. Luzardo-Alvarez, J. Blanco-Mendez, F.J. Otero-Espinar, M. Martin-Pastor, I. Sandez- Macho. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 2013, 85, 790.
- [72] R. G. Aswathy, B. Sivakumar, D. Brahatheeswaran, T. Fukuda, Y. Yoshida, T. Maekawa and D. S. Kumar. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience Nanotechnology.* 2012, 3, 025006.
- [73] S.H. Imam, S.H.Gordon. *Journal of Polymers and the Environment.* 2002, 10, 147.

- [74] S. Douglas, S. Davis, L. Illum. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1986, 3, 233.
- [75] T. Yih, M. Al-Fandi. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2006, 97, 1184.
- [76] R. Paliwal, S. Palakurthi. *Journal of Controlled Release*. 2014, 189, 108.
- [77] S. Subramanian, S. Sampath. *Biomacromolecules*. 2007, 8, 2120.
- [78] Y. Wang, G.W. Padua. *Langmuir* 2012, 28, 2429.
- [79] Y. Chen, R. Ye, J. Liu. *Industrial Crops and Products*. 2014, 53, 140.
- [80] E. Corradini, P.S. Curti, A.B. Meniqueti, A.F. Martins, A.F. Rubira, E. C. Muniz. *International Journal Molecular Science*. 2014, 15, 22438.
- [81] A. Arora, G.W. Padua. 2010. *Journal of Food Science*. 75, R43.
- [82] J. Liang, Q. Xia, S. Wang, J. Li, Q. Huang, R.D. Ludescher. *Food Hydrocolloids* 2015, 44, 94.
- [83] Zein Product Information (Sigma Aldrich).
- [84] S. Iijima. *Nature*. 1991, 354, 56.
- [85] W. Yang, K.R. Ratinac, S.P. Ringer, P. Thordarson, J.J Gooding, F. Braet F. *Angewandte Chemie International Edition*. 2010, 49, 2114.
- [86] B. Pérez-López, A. Merkoçi, *Microchimica Acta*. 2012, 176, 317.
- [87] C. Biswas, Y.H. Lee. *Advanced Functional Materials*. 2012, 21, 3806.
- [88] M.S. Artiles, C.S. Rout, T.S. Fisher TS. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2011. 63, 1352.
- [89]. Y. Chen, H. Vedala, G.P. Kotchey, A. Audfray, S. Cecioni, A Imberty, V. Sébastien, A. Star. *ACS Nano*. 2012, 6, 760.
- [90] M. Guix M, B. Pérez-López, M. Sahin, M. Roldán, A. Ambrosi, A. Merkoçi. *Analyst*. 2010 135, 1918.
- [91]. B. Pérez-López, A, Merkoçi A. *Advanced Functional Materials*. 2011, 21, 255.
- [92] S.K. Vashist, D. Zheng, K. Al-Rubeaan, JHT Luong, F.-S. Sheu. *Biotechnology Advances*. 2011, 29, 169.
- [93] C.B. Jacobs, M.J. Peairs, B.J. Venton BJ. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 662, 105.
- [94] A. Sarafraz- Yazdi, F. Ghaemi, A. Amiri, *Microchimica Acta*. 2012, 176, 317.

Bibliografía

- [95] E. Turiel, A. Martín-Esteban. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 668, 87.
- [96] S. Maghsoudi, E. Noroazian. *Chromatographya* 2012, 75, 93.
- [97] R. Ahmadkhaniha, N. Samadi, M. Salimi, P. Sarkhail, and N. Rastkari. *The scientific world* 2012, Article ID 627607.
- [98] H. Bagheri, Z. Ayazi, H. Sistani. *Microchimica Acta*. 2012, 174, 295.
- [99] L. Chen, W. Chen, C Ma, D. Du, X. Chen. *Talanta*. 2011, 84, 104.
- [100] X. Wang, X. Li, Z. Li, Y. Zhang, Y. Bai, H. Liu. *Analytical Chemistry*. 2014, 84, 4739.
- [101] J. M. Jiménez-Soto, S. Cárdenas, M. Valcárcel. *Journal of Chromatography A*. 2012, 1245, 17.
- [102] J. Weuve, R. Hauser, A.M. Calafat, S.A. Missmer, L.A. Wise. *Environmental Health Perspectives*. 2010, 118, 825.
- [103] M.S. Wolff, S.L. Teitelbaum, S.M. Pinney, G. Windham, L. Liao, F. Biro. . *Environmental Health Perspectives*. 2010, 118, 1039.
- [104] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16. December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy.
- [105] N. Jornet-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó. *Journal Chromatography A*. 2014, 1347, 157.
- [106] N. Jornet-Martínez, C. Antón-Soriano, P. Campíns-Falcó. *Acceptado en Science of Total Environment* 28/05/2012.
- [107].G. Saravanabhavan, M. Guayb, E. Langlois, S. Giroux, J. Murray, D. Haines. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2013, 216, 652.
- [108] G. Tranfo, B. Papaleo, L. Caporossi, S. Capanna, M. De Rosa, D. Pignini, F. Corsetti, E. Paci. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2013, 216, 481.
- [109] H. Frederiksen, N. Jørgensen, A.-M. Andersson. *Journal of Analytical Toxicology*, 2010, 34,.
- [110] C.-F. Wu, B.-H. Chen, J. Shiea, E.K. Chen, C.-K. Liu, M.-C. Chao, C.-K. Ho, J.-R. Wu, M.-T. Wu. *Environmental Science of Technology*. 2013, 47, 13754.
- [111] S.J. Genuis, S. Beesoon, R. A. Lobo, D. Birkholz. *The Scientific World Journal* 2012 doi:10.1100/2012/615068.

- [112] J. Högberg, A. Hanberg, M. Berglund, S. Skerfving, M. Remberger, A.M. Calafat, A.F. Filipsson, B.Jansson, N. Johansson, M. Appelgren, H. Håkansson. *Environmental Health Perspectives*, 2008, 116, 334.
- [113] H.T. Wan, P.Y. Leung, Y.G. Zhao, X. Wei, M.H. Wong*, Chris K.C. Wong. *Journal of Hazardous Materials*. 2013, 261, 763.
- [114] Y. Moliner-Martínez, A. Ribera, E. Coronado, P. Campíns-Falcó. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218, 2276.
- [115] P. Campíns-Falcó, E. Coronado, Y. Moliner-Martínez, A. Ribera, H. Prima-García, H. Patent application P201100823, Spain, 2011. International Patent in Progress.
- [116] Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, A. Ribera, E. Coronado, P. Campíns-Falcó, *Analytical Chemistry*. 2012, 84, 7233.
- [117] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández. *Journal Chromatography A* 2008, 1211,13.
- [118] Y. Moliner-Martínez, R.A. González-Fuenzalida, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés. *Journal Chromatography A*. 2012, 1263, 43.
- [119] C. Fernández-Ramos, D. Šatínský n, P. Solich. *Talanta*. 2014, 129, 579.
- [120] H. Cramer. Derivatization and separation aliphatic amine. *AnalytiX*, vol 2, 2011.
- [121] A Fekete, A.K. Malik, A. Kumar, P. Schmitt-Kopplin. *Analytical Chemistry*. 2010, 40, 102.
- [122] A. A. Elbashir, A.A. Ahmed, S. A. A. Ahmed, S.M.A. Ahmed, H.Y. Aboul-Enein. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2012, 47, 219.
- [123] P. Campíns-Falcó, C.Molina-Legua, A. Sevillano-Cabeza, R.Porrás-Serrano, *Analyst*. 1007, 122, 673.
- [124] RAE Systems, Gas Detection Tube Data Sheet. Amines. No 10-132-10 (<http://www.raesystems.com/products/colorimetric-gas-detection-tubes>)
- [125] Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1059, 17.
- [126] L. Sutarlie, K.-L. Yang. *Sensors and Actuators B*. 2008, 134, 1000.
- [127] X. Ding, K.-L. Yang. *Sensors and Actuators B*. 2012, 173, 607.
- [128] N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés and P. Campíns-Falcó. Artículo enviado la revista *Sensors and Actuators B*.

Bibliografía

- [129] L. Feng, C.J. Musto, J. W. Kemling, S.H. Lim, W. Zhong, K. S. Suslick. *Analytical Chemistry*. 2010, 82, 9433.
- [130] T. Soga, Y. Jimbo, K. Suzuki, D. Citterio. *Analytical Chemistry* 2013, 85, 8973.
- [131] N.D.Boscher, T.Bohn, P. Heiera,F. Moisy, B. Untereiner, K. Heinzec, P. Choquet. *Sensors and Actuator B*. 2015, 191, 553.
- [132] J. E. Stumpel , C. Wouters , N. Herzer , J. Ziegler , D.J. Broer , C.W. M. Bastiaansen , A. P. H. J. Schenning. *Advanced Optical Materials*. 2014, 2, 459.
- [133] J. Rosales, J. M. Pedrosa, M. G. Guilléna, T. Lopes-Costa, S.M.A. Pinto, M. J.F. Calvete, M. M. Pereira. *Sensors and Actuators B*. 2015, 210, 28.
- [134] V. H. Banimuslem, A. Hassana, T. Basova, A. A. Esenpınar, S. Tuncel, M. Durmus,A. G. Gürekl, V, *Sensors and Actuators B*. 2015, 207, 234.
- [135] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, *Perspectives on drug, Synthetic drug production in Europe*.
- [136] V. Piette, F. Parmentier, *Journal of Chromatography A*. 2002, 979, 345.
- [137] N. Soderman, K.-A. Kovar, *Forensic Science International*, 1999, 106, 147.
- [138] R.C. Schneider, K.-A Kovar, *Forensic Science International*, 2003, 134,187.
- [139] B.M. El-Haja, A.M. Al-Amria, M.H. Hassana, H.S. Alib, R.X. B. Khadema, *Forensic Science International*. 2003, 135, 16.
- [140] K.E. Kongshaug, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, M.Krogh. *Chromatographia*. 1999, 50, 247.
- [141] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés. *Analyst*. 2001,126, 581.
- [142] C. Cháfer-Pericás, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Analytical Biochemistry*. 2004, 333, 328.
- [143] J.R. Verkouteren, J.L. Staymates. *Forensic Science International* (2010).
- [144] G.A. Eiceman, Z. Karpas, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [145] A. Hacker, S. Beer, G. Müller, T. Fischer, S. Mathur. *Sensors and Actuators B: Chemical* 2012, 162, 209.
- [146] K. Tsujikawa, K. Kuwayama, H.Miyaguchi, T. Kanamori, Y. T. Iwata, T. Yoshida, H. Inoue. *Analytica Chimica Acta*. 2008, 608, 95.

- [147] C. Weyerman, Y. Mimoune, F. Anglada, G. Massonet, P. Esseiva, P. Buzzini. *Forensic Science International*. 2011, 209, 21.
- [148] B.A. Eckenrode, E.G. Bartick, S.D. Harvey, M.E. Vucelick, B.W. Wright, R.A. Huff, *Forensic Science Communications*. 2001, 4, 3.
- [149] M.D. Hargreaves, K. Page, T. Munsch, R. Tomsett, G. Lynch, H.G.M. Edwards, *Journal of Raman Spectroscopy*. 2008, 39, 873
- [150] C. Andreou, R.M. Hoonejani, M.R. Barmi, M. Moskovits, C. D. Meinhart. *ACS Nano*. 2013, 7, 7157.
- [151] I. Vikholm-Lundin, S. Auer, A.-C. Hellgren. *Sensors and Actuators*. 2011, 156, 28.
- [152] A. Choodum, P. Kanatharana, W. Wongniramaikul, N. NicDaeid. *Sensors and Actuators*. 2014, 215, 553.
- [153] A. Argente-García, N. Jornet-Martínez, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez, and P. Campíns-Falcó. Artículo enviado. Artículo Enviado a la revista Talanta.
- [154] Q. Shi, Y. Shi, Y. Pan, Z. Yue, H. Zhang, C. Yi. *Microchimica Acta*. 2015. 182, 505.
- [155] Directive 1991/127/CE. Available http://europa.eu/geninfo/atoz/en/index_1_en.htm.
- [156] Directive 1998/83/CE. Available. http://europa.eu/geninfo/atoz/en/index_1_en.htm.
- [157] J.B. Zimmerman, J.R. Mihelcic, J. Smith. *Environmental Science & Technology* 2008,15, 4247.
- [158] E.S.A. Badr, E.P. Achterberg, A.L. Tappin, S.J. Hill, Braungardt. *Trends in Analytical Chemistry* 2003, 22, 819.
- [159] J. Barrancos, S. Briz, D. Nolasco, G. Melián, G. Padilla, E. Padrón, I. Fernández, N. Pérez, P.A. Hernández. *Atmospheric Environment* 2013, 74, 10.
- [160] D. Li, C.J. Watson, M. J. Yan, S. Lalor, R. Rafique, B. Hyde, G. Lanigan, K.G Richards, N.M. Holden, J.A. Humphreys. *Journal of Environmental Management*. 2013, 128, 893.
- [161] S. Saggarr, J. Singh, D.L. Giltrap, M. Zaman, J. Luo, M. Rollo, D.G. Kim, G. Rys, T.J. Van der Weerden. *Science of the Total Environment* 2013,465, 136.
- [162] A. Alestuey A, X. Querol, S. Rodríguez, F. Plana, A. Lopez-Soler, C. Ruiz , E. Mantilla E. *Atmospheric Environment*. 2004, 38, 4979.
- [163] J.I. Piñeiro Di Blasi, J. Martínez Torres, P.J. Garcia Nieto, J.R. Alonso Fernández, C. Díaz Muñoz C.,J. Taboada. *Ecological Engineering*. 2013, 60, 60.

Bibliografía

- [164] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó P. *Analytical Chimica Acta* 2005, 532, 327.
- [165] J. Kim, S.-H. Lim, Y. Yoon, T. D. Thangadurai, S. Yoon. *Tetrahedron Letters*. 2011, 52, 2645.
- [166] M.C. Prieto-Blanco, N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, J. Verdú Andrés, P. Campins-Falcó. *Science of Total Environment*. 2015, 503, 105
- [167] H. Liu, J. Mack, Q. Guo, H. Lu, N. Kobayashi, Z. Shen. *Chemical Communications*. 2012, 47,12092.
- [168] H. S. Mader, O. S. Wolfbeis. *Analytical Chemistry*. 2010, 82, 5002.
- [169] S. Pandey, G. K. Goswami, K. K. Nanda. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012, 51, 583.
- [170] S. Pandey, G. K. Goswami, K. K. Nanda. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 94, 229.
- [171] T. Thomas, T.J. Thomas *Cellular and Molecular Life Sciences*.2001, 58, 244.
- [172] N.Seiler, J.G. Delcros, J. P.Moulinoux. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 1996, 28, 843.
- [173] C.Stefanelli, F. Bonavita, I. Stanic, M. Mignami, A. Facchinin, C. Pignatti, F. Flamigni, C. Calderera, *FEBS Letters*. 1988, 437, 233.
- [174] K. Igarashi, K. Kashiwagi. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2010, 1, 39.
- [175] E.W. Gerner, F.L. Meyskens. *Nature Reviews Cancer* . 2004, 10, 78.
- [176] N.S. Rial, F. L. Meyskens, E.W. Gerner. *Essays in Biochemistry*. 2009, 46, 111.
- [177] J.P. Moulinoux, V. Quemener, N.A. Khan, J.G Delcros, R. Havouis. *Anticancer Research*. 1989, 9, 1057.
- [178] S. Kubota, M. Okada, M. Yoshimoto, N. Murata, Z. Yamasaki, T. Wada, K. Imahori, N. Ohsawa, F. Takaku. *Cancer Detection and Prevention*. **1985**, 8, 189.
- [179] N. Uehara S. Shirakawa, H. Uchino, Y. Saeki. *Cancer* 1980, 45,108.
- [180] C. Loser, U.R. Folsch, C. Paprotny, W. Creutzfeldt, *Cancer*. 1990, 65, 958.
- [181] M. Chatel, F. Darcel, V. Quemener, H. Hercouet, J.P. Moulinoux *Anticancer Research*. 1987, 7, 33.
- [182] L. J. Marton, D. H. Russell, C. C. Levy. *Clinical Chemistry*. 1973, 19, 923.

- [183] R. Carachi, J. G. Beeley *Journal of Clinical Pathology*. 1983,36, 508.
- [184] T. Kim, J. Park, Y. Kim, *Chemistry-A European Journal*. 2011, 17, 11978.
- [185] M.N Nakamura, T.Sanji, M. Tanaka, *Chemistry-A European Journal*. 2011, 17, 5344.
- [186] Özdestan, A. Üren, *Talanta*. 2009, 78, 1321.
- [187] M-S. Steiner, R. J. Meier, C. Spangler, A. Duerkop, O. S. Wolfbeis, *Microchemical Acta*, 2009, 167, 259.
- [188] M. Ikeda, T. Yoshii, T. Matsui, T. Tanida, H. Komatsu, I. Hamachi, *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133, 1670.
- [189] B. Lee, R. Scopelliti and K. Severin, *Chemical Communications*. 2011, 47, 9639.
- [190] T. I. Kim, J. Park and Y. Kim, *Chemistry-A European Journal*. 2011, 17, 11978.
- [191] EU Directive 2000/60/EC
- [192] L. Gilbert, A.T.A. Jenkins, S. Browning, J.P. Hart. *Sensors and Actuators B*. 2011, 160, 1322.
- [193] G. Zhanga, L. Baoyang, W. Yangping, L. L. Lub, J. Xua. *Sensors and Actuators*, 2012, 172, 786.
- [194] M. R. Ganjali, M. Hosseini, Z. Memari, F. Faridbod, P. Norouzi, H. Goldooz, A. Badii. *Analytica Chimica Acta*. 2011, 708, 107.
- [195] S. Yang, G. Feng, N.H. Williams. *Organica and Biomolecular Chemistry*. 2012, 10, 5606.
- [196] J. Hatai, S. Pal, S. Bandyopadhyay. *Tetrahedron Letters*. 2012, 53, 4357.
- [197] N. Jornet-Martínez, P. Campíns-Falcó, E. A. Hall. Artículo enviado a la revista *Biosensor and Bioelectronics*.
- [198] D. Werner, S. Hashimoto, T. Uwada. *Lagmuir* 2010, 12, 9956.
- [199] A. Pyatenko, M. Yamaguchi, M. Suzuki. *Journal of Physical Chemistry C*. 2009, 113, 9078.
- [200] A. Takami, H. Kurita, S. Koda. *Journal of Physical Chemistry C*. 1999, 103, 1226.
- [201] S. Navalón, M. Miguel, R. Martin, M. Alvaro, H. Garcia. *Journal of American Chemical Society*. 2011, 133, 2218.
- [202] S. Navalón, M. Miguel, R. Martin, M. Alvaro, H. Garcia. *Chemistry & Sustainability Energy & Materials*. 2011, 5, 650.

Bibliografía

- [203] A.M Amorim da Costa, M.P.M. Marques, L.A.E.J. Batista de Carvalho, L. A. E.J. Raman Spectroscopy. 2003, 34, 357.
- [204] J. Ruiz-Chica, M.A. Medina, F. Sánchez-Jiménez, F.J. Ramírez. Biochemical and Biophysical Research Communications .2001, 285, 437.
- [205] C. Molins- Legua, P. Campins-Falcó. Analytica Chimica Acta. 2005, 546, 206.
- [206] B. Law, M.D. Malone, R.A. Biddlecombe in *Immunoassay. A practical Guide*. B. Law), Taylor & Francis, London, UK, 1996, pp. 127.
- [207] M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, S. Cogollos-Costa, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, Journal of Chromatography A. 2012, 12mj60, 169.
- [208] S. Jonsson, J. Ejlertsson, A. Ledin, I. Mersiwsky, B.H. Svensson. Water Research. 2003, 37, 609.
- [209] M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam. Analytica Chimica Acta. 2012, 728, 31.
- [210] R. Céspedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 385, 992.
- [211] A.D. LaFleur, K.A. Schug. Analytica Chimica Acta, 211, 696, 6.
- [212] Y.-B. Luo, Q.-W. Yu, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Talanta. 2012, 90, 123.
- [213] J.D. Blair, M.G. Ikonou, B.C. Kelly, B. Surridge, F.A.P.C. Gobas, Environmental Science & Technology. 2009, 43, 6262.
- [214] H. Farahani, M.R. Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, Talanta. 2008, 76, 718.
- [215] L. Guo, H.K. Lee. Journal of Chromatography A. 2013, 1300, 24.
- [216] X. Li, M. Zhong, S. Xu, C. Sun. Journal of Chromatography A. 2006, 1135, 101.
- [217] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, M.C. Prieto-Blanco. Analytica Chimica Acta. 2008, 610, 268.
- [218] M.H. Banitaba, S.S.H. Davarani, A. Pourahadi. Journal of Chromatography A. 2013, 1283, 1.
- [219] R. Preuss, H. M. Koch, J. Angerer. Journal of Chromatography B. 2005, 816, 269.
- [220] K. Kato, M. J. Silva, J.A. Reidy, D. Hurtz, N.A. Malek, L.L. Needham, H. Nakazawa, D.B. Barr, A.M. Calafat. Environmental Health Perspectives. 2004, 112, 327.
- [221] B. Suarez, Y. Moliner-Martínez, S. Cardenas, B.M Simonet, M. Valcárcel. Environmental Science of Technology. 2008, 48, 6100-6104.

- [222] L. Sombra, Y. Moliner-Martínez, S. Cardenas, M. Valcárcel. *Electrophoresis*. 2008, 29, 3850.
- [223] X. Wang, X. Li, Z. Li, Y. Zhang, Y. Bai, H. Liu. *Analytical Chemistry*. 2014, 86, 4739.
- [224] X. Wang, Y. Liu, S. Tao. *Carbon*. 2010, 48, 3721-3728.
- [225] M.A. Gonzalez-Curbelo, M. Asensio-Ramos, A.V. Herrera-Herrera, J. Hernandez-Borges J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, 404, 183.
- [226] M.R. Hadjmohammadi, M. Peyrovi, P. Biparva *Journal of Separation Science*. 2010, 33, 1044.
- [227] P. Campíns-Falco, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217, 2695.
- [228] M. Kragulj, J. Tričković, B. Dalmacija, A. Kukovec, Z. Kóya, J. Molnar, S. Rončević. *Chemical Engineering Journal*. 2013, 225, 144.
- [229] P. Campins-Falcó, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, N. Jornet-Martínez. **2013**, Patent P201300436.
- [230] J. Stein, L.N. Lewis, Y. Gao, R.A. Scott. *Journal of the American Chemistry Society*. 1999, 121, 3693.
- [231] J.-S. Kim, S.C. Yang, S.Y. Kwak, Y. Choi, K.-V. Paik, B.S. Bae. *Journal of Materials Chemistry*. 2012, 22, 7954.
- [232] J.-S. Kim, S.C. Yang, B.-S.Bae. *Journal of Materials Chemistry*. 2012, 22, 3549.
- [233] K.A. Heyries, C.A. Marquette, L.J. Blum. *Langmuir*. 2007, 23, 4523.
- [234] C. Cha, E. Antoniadou, M. Lee, J. H. Jeong, W. W. Ahmed, T. A. Saif, S. A. Boppart, H. Kon. *Angewandte Chemie International Edition*. 2013, 52, 6949.
- [235] W. Mussard, N. Kebir, I. Kriegel, M. Estève, V. Semetey. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, 50, 10871 .
- [236] J. Zhang, Y. Chen, M. A. Brook . *Facile Functionalization of PDMS Elastomer Surfaces Using Thiol– Ene Click Chemistry*. *Langmuir*. 2013, 29, 12432.
- [237] C. Potrich, V.Vaghi, L. Lunelli, L. Pasquardini, G.C. Santini, C. Ottone, M. Quaglio, et al. *OncomiR detection in circulating body fluids: a PDMS microdevice perspective*. *Lab-on-Chip*. 2014. DOI: 10.1039/c4lc00630e.
- [238] European Directive 2000/39/CE, Brussels, 6/8/2000.

Bibliografía

- [239] Y. Moliner-Martinez, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández. *Journal of Chromatography A*. 2004, 1059, 17.
- [240] D. Li, F. Xu, Z. Liu, J. Zhu, Q. Zhang, L. Shao. *Applied Surface Science*. 2013, 266, 368.
- [241] F. Xu, D. Li, H. Zhang, J. Xu. *Progress in Organic Coatings*. 2012, 75, 429.
- [242] A. Abdalla, Elbashir, H.E.A. Elwagee. *Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences*. 2012, 11, 32.
- [243] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés. *Analyst*. 2001, 126, 581.
- [244] U. Kunz, H. Schönfeld, A. Kirschning, W. Solodenko. *Journal of Chromatography A*. 2003, 1006, 241.
- [245] A. Aminot, D.S. Kirkwood, R. Kerouel. *Marine Chemistry*. 1997, 56, 59.
- [246] K.T. Lau, S. Edwards, Diamond D. *Sensors Actuators B Chemical*. 2004, 98, 12.
- [247] C. Molins-Legua S. Meseguer-Lloret Y. Moliner-Martinez Y, P. Campíns-Falcó *Trends in Analytical Chemistry*. 2006, 25, 282.
- [248] J. Antunes Galvao, A. Matthiensen, M. Oetterer, Y. Moliner-Martinez, R.A. Gonzalez-Fuenzalida, M. Muñoz-Ortuño, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó. *Determination of ammonia in water samples*. USA: CRC Press; 2014. p. 249–81
- [249] C. Molins-Legua, S. Meseguer-Lloret, Y Moliner-Martinez, P Campíns-Falcó. *Trends in Analytical Chemistry*. 2006, 25, 282.
- [249] T. Yoshino, S. Isobe, T. Maekawa. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2002, 79, 345.
- [250] H. Xu, Y. Chai, G. Zhang. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60, 10075.
- [251] M.N. Emmambux, M. Stading. *Food Hydrocolloids*. 2007, 21, 1245.
- [252] Y. Chen, R. Ye, J. Liu, J. *Industrial Crop Production*. 2014, 53, 140-147.
- [253] P, Argos, K. Pedersen, M.D. Marks, B.A.J Larkins. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257, 9984.
- [254] N.H. Rhys, L. Dougan. *Soft Matter*. 2013, 9, 2359.

Bibliografía

- [255] S. Wongsasulak, P. Tongsin, N. Intasanta, T. Yoovidhya. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, 118, 910.
- [256] G.F. Sánchez, A. Navas Díaz, M. R. Peinado, C. Belledone, *Analytica Chimica Acta*. 2003, 484, 45.
- [257] M.B. Tierno, P.A. Johnston, C. Foster, J.J. Skoko, S.N. Shinde, T.Y. Shun, J.S. Lazo, *Nature Protocols*. 2007, 2, 1134.
- [258] D.C. Harris. *Análisis Químico Cuantitativo*. 2001. Reverté, Barcelona, Spain.
- [259] J. Leucha, A. Hsio, S. Brodsky, G.L. Liu, J.L. Kokini. *Lab-on-a-Chip*. 2011, 11, 3419.

ANEXOS

A1. Listado de Figuras

Figura 1. Ilustración esquemática de la superficie plasmónica localizada a partir de una esfera metálica mostrando el desplazamiento de la nube de carga electrónica respecto al núcleo. El diámetro de la esfera es d y la longitud de onda de la luz es λ	27
Figura 2. Banda de superficie plasmónica para AuNPs esféricas de entre 15-20 nm y fotografía del color de las AuNPs	27
Figura 3. Evolución en el número de citaciones sobre AuNPs des del año 2000. Fuente Web of Science (Mayo 2015).	28
Figura 4. Proceso de formación de nanopartículas por etapas: nucleación, crecimiento y coagulación	29
Figura 5. Cambio de color de las AuNPs consecuencia de una agregación progresiva (del rosa al azul) según la cantidad de analito añadido.	30
Figura 6. Evolución en el número de citaciones sobre PDMS des del año 2000. Fuente Web of Science (Mayo 2015).	37
Figura 7. Esquema representativo del sistema IT-SPME.	40
Figura 8. Esquema del sistema IT-SPME-LC para A) carga/expulsión y B) en válvula.....	41
Figura 9. Fotografía de la zeína en polvo	46
Figura 10. Número de citaciones sobre CNTs des del año 2000. Fuente Web of Science (Mayo 2015)	51
Figura 11. Estructura química de los ftalatos analizados	54
Figura 12. Estructura química de los contaminantes analizados en aguas.....	57
Figura 13. Estructura química de las aminas volátiles analizadas.....	59
Figura 14. Estructura química de las anfetaminas analizadas.....	63
Figura 15. Estructura química de las poliaminas	69

Anexos

Figura 16. A) Láser Nd/YAG y B) Fotoreactor a LZC-L4V.....	80
Figura 17. Espectrofotómetro de fibra óptica.....	81
Figura 18. Espectrofotómetro UV-Vis HP-8453.....	81
Figura 19. Espectrofotómetro UV-Vis Labsphere RSA-HP-8453.....	82
Figura 20. Espectrofluorímetro Jasco FP-750.....	82
Figura 21. FTIR-ATR (Cary 630 FTIR).....	83
Figura 22. Equipo de CapLC Jasco, PU-2089 Plus.....	83
Figura 23. Equipo de CapLC Agilent Serie 100.....	84
Figura 24. Esquema del sistema IT-SPME-Cap-LC-DAD utilizado.....	84
Figura 25. Microscopio óptico Nikon ECLIPSE E200LED MV.....	85
Figura 26. Botella de dilución estática (2 L) empleada para la generación de patrones gaseosos.....	86
Figura 27. Esquema del montaje utilizado para la irradiación con Láser de la solución de AuNPs.....	87
Figura 28. Fotografía de los colores indicativos de las concentraciones de H ₂ O ₂ presentes en el medio y de una tira reactiva para una disolución de AuNPs en la que no queda H ₂ O ₂ en cantidad suficiente para ser detectada en este ensayo.....	88
Figura 29. A) Fotografía de la disolución de AuNPs en oscuridad. B) Espectro absorbancia AuNPs. C) Imagen TEM de la síntesis en ausencia de luz y D) Histograma de distribución de tamaños de AuNPs.....	101
Figura 30. A) Espectro UV-Vis registrado para la síntesis de AuNPs, B) Fotografía de la disolución de AuNPs obtenidas.....	102
Figura 31. Espectros de absorción para A) AuNP1 B) AuNP2, C) AuNP3 y D) AuNP4. Gráfico obtenido durante la síntesis de AuNPs (izquierda) y después del tratamiento posterior a la síntesis (derecha).....	104
Figura 32. Imágenes de TEM y histograma donde se muestra la distribución de tamaños A) AuNP1, B) AuNP2, C) AuNP4.....	105

- Figura 33.** Espectros de absorbancia de las AuNPs registrados a los 20 segundos después de la adición de: A) putrescina (3-5 μM), B) cadaverina (2-5 μM), C) espermidina (0.1-1.5 μM) y D) espermina (70-750 nM). En **rosa** aparece el espectro para las AuNPs mientras que en **negro** aparece el espectro observado para la adición de poliamina sobre las AuNPs.107
- Figura 34.** Esquema de la agregación de las AuNPs inducida por la SPN.....108
- Figura 35.** Absorbancia a 610 nm 20 segundos después de cada adición de espermina (70-750 nM). Insertado aparece la recta: A_{610}/A_{520} vs log [SPN] (nM).109
- Figura 36.** Espectro de absorción de AuNPs (1mL) tras la adición de: A) orina no tratada (10-100 μL), B) orina fortificada con espermina no tratada (142, 281, 418, 552, 625, 750 nM), C) orina tratada por SPE (5, 10, 15, 20, 30, 40 μL) y D) orina fortificada con espermina tratada por SPE (350 nM). En **rosa** espectro de AuNPs, en **negro** orina adicionada a AuNPs y en **azul** orina fortificada adicionada a AuNPs. (*) Orina tratada por extracción en fase solida (SPE).111
- Figura 37.** Espectro de absorción de las AuNPs (1mL) para la adición (5-40 μL) de: orina tratada por SPE de cinco voluntarios sanos (A-E) y F), G), H), orina de cuatro voluntarios enfermos de cancer, tratada por SPE en las mismas condiciones, (J) orina de un voluntario enfermo de cancer diluida a la mitad y tratada por SPE. Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.112
- Figura 38.** Espectro de absorción de las AuNPs después de la adición de: A) 5 μL , B) 10 μL , C) 15 μL de orina y orina patológica tratada mediante SPE. Para todos los gráficos; en rosa AuNPs, en negro AuNPs con orina tratada por SPE y en verde AuNPs con orina patológica tratada por SPE. Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.113
- Figura 39.** Absorbancia frente a la concentración de SPN añadida para la adición de patrones preparados en agua (en verde: c, d, e), patrones preparados en orina tratada por SPE (en naranja: a, b, c) y patrones preparados en orina patológica diluida a la mitad y tratada por SPE (en negro:g) sobre una disolución de AuNPs. Patrones en orina: a) 0.1, 1.4, 2.8, 4, 5.6, 8 nM, b) 0.1, 1.4, 2.1, 4.23, 8 nM, c) 0.1, 0.71, 1.43, 2.12, 3.46 nM. Patrones en agua: d) 0.1, 14, 28, 42, 56, 70 nM, e) 0.1, 35, 71, 100 nM, f) 0.1, 36, 71, 106, 150 nM. Patrones en orina patológica: g) 0.1, 0.57, 0.94, 2.11, 10 nM.114
- Figura 40.** Espectro de absorción de las AuNPs (1mL) para la adición entre 10-100 μL de: A) Los componentes mayoritarios de la orina; urea (14 mM), ácido úrico (2.4 mM), creatinina (7.1 mM), B) aminas alifáticas (metilamina, dimetilamina, etilamina o dietilamina), C) AcOH al 5%, D) albumina (4.4 mM) y E) Ca_2CO_3 (3.5 mM).115

Anexos

- Figura 41.** Espectro de absorción de las AuNPs después de la adición de A) 5 μ L, B) 10 μ L, C) 15 μ L de orina y orina fortificada (72 nM y 143 nM) tratada mediante SPE. Para todos los gráficos; en rosa AuNPs, en negro AuNPs con orina tratada por SPE y en azul AuNPs con orina fortificada con SPN a dos concentraciones (72 nM y 143 nM) y tratada por SPE. Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.117
- Figura 42.** Espectro de absorción de las AuNPs después de la adición de A) 10 μ L, B) 15 μ L, de orina patológica y orina patológica fortificada (36 nM y 72 nM) diluida a la mitad con agua y tratada mediante SPE. Para todos los gráficos; en rosa AuNPs, en negro AuNPs con orina patológica, en azul AuNPs con orina patológica fortificada con SPN a dos concentraciones (36 nM y 72 nM). Todos los espectros fueron medidos a los 20 segundos de la adición.118
- Figura 43.** Imágenes obtenidas por TEM de A) las AuNPs y B) las AuNPs después de la adición de espermina (280 nM). La barra de escala: 200 nm.118
- Figura 44.** Esquema de la respuesta de cuatro síntesis diferentes de AuNPs a la concentración tanto de SPN como de AuNPs en orinas de voluntarios sanos. (Los resultados obtenidos en el caso de orinas patológicas han sido excluidos para mayor comprensión del esquema.)122
- Figura 45.** Posible esquema representativo de la degradación de DEHP en MEHP, DEP y DBP.....128
- Figura 46.** Cromatogramas obtenidos bajo condiciones óptimas: A) blanco (agua nanopure acidificada pH 3.0), B) Disolución patrón de DBP (10 μ g/L) y C) Disolución patrón de DEP, MEHP y DEHP (1 μ g/L por cada uno). Se ha insertad el pico cromatográfico obtenido cuando el MEHP está agua y en agua acidificada pH 3.0.129
- Figura 47.** Cromatograma obtenido bajo condiciones óptimas para alguna de las muestras analizadas. Para más detalles consultar el texto.131
- Figura 48.** Cromatograma obtenido bajo condiones optimas para muestras de lavado. El agua fue recirculada en un sistema de tuberías de plástico de dimensiones lasrgas y cortas. Agua circulando en las tuberies cortas (en verde) y en las largas (en rojo) y agua reciculada durante 1 h en las tuberías cortas (en negro) y en las largas (en azul).132
- Figura 49.** Cromatogramas obtenidos a 230 nm bajo las condiciones óptimas ensayadas para 4 muestras de orina.137
- Figura 50.** Perfil de los ftalatos encontrados en cada una de las muestras de orina analizada; nd significa no detectado, i.e concentraciones por debajo de los LODs.....138

- Figura 51** Cromatogramas obtenidos a 230 nm bajo las condiciones óptimas ensayadas para orina en negro, orina fortificada (20 $\mu\text{g/L}$) en azul y orina fortificada hidrolizada a 37°C durante 2 horas en rosa.....139
- La Figura 52.** Espectro de IR para **a)** c-SWNTs, **(b)** c-MWNTs y imagenes de SEM para **c)** SWNTs-PDMS_{TRB-5}, **(d)** c-MWNTs-PDMS_{TRB-5}.141
- Figura 53.** La respuesta analítica de triazinas con las columnas calipares PDMS y c-CNT-PDMS utilizadas en el sistema IT-SPME.142
- Figura 54.** La respuesta analítica de los PAHs con las columnas calipares PDMS y c-CNT-PDMS utilizadas en el sistema IT-SPME.....144
- Figura 55.** A) Síntesis de los sensores mediante la inmovilización del reactivo, primero se disuelve el TEOS, se añade el elastómero base de PDMS y finalmente, se añade el agente de curado. B) Representación esquemática de la respuesta de los sensores a aminas volátiles.152
- Figura 56.** Síntesis del PDMS utilizando el kit PDMS Sylgard 186.153
- Figure 57.** A) Espectra de FT-IR de los films de PDMS y PDMS/TEOS. ____ F1, ---- F2, ___ F3, ____ F4, F11 and _____ F5. Se añadió también el espectro del TEOS ----.156
- Figura 58.** Estructura idealizada del híbrido TEOS_PDMS y sus posibles reacciones de formación.157
- Figura 59.** Espectro de ^{29}Si RMN-MAS para los films de PDMS_TEOS: ____ F1 _____ F2 _____ F3 _____ F4.158
- Figura 60.** Imágenes de SEM para una cantidad creciente de TEOS en los films F1, F2 y F4.159
- Figura 61.** Ángulo de contacto en a) film de PDMS (F1) y b) film híbrido PDMS_TEOS (F4).159
- Figura 62.** A) Respuesta del 1, 2-naftoquinona-4-sufonato (NQS) en presencia de a) dimetilamina, b) dietilamina, c) metilamina and d) etilamina en agua y en aire con el sensor F1b. Respuesta del N,N-dioctilamino)-4' trifluoroacetilazobenzeno (ETH^T 4001) en presencia de trimetilamina en agua y en aire con el sensor F8a.162
- Figura 63.** Representación de la absorbancia a 525 nm por el sensor F4 para A) metilamina, B) dimetilamine 5 $\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ durante a) 1, b) 2, c) 3, d) 4 hours. Representación de la absorbancia a 525 nm por el sensor F1b para A) metilamina, B) dimetilamine en

Anexos

concentraciones a) 0, b) 10, c) 20, d) 50 mg·m⁻³ durante 8h. Las mediciones se llevaron a cabo por reflectancia difusa.164

Figura 64. Imagen de una bolsa hermética con pescado y un sensor F4 fuera de la bolsa (1) y dentro de la bolsa (2) después de 5 días a temperatura ambiente. Si el sensor se deja 6 días la respuesta es mayor y el sensor tiene un color gris oscuro (3).165

Figura 65. Optimización del sensor A) Efecto de diferentes relaciones en peso PDMS / TEOS sobre la respuesta analítica. Condiciones: 0,01 g ml⁻¹ de AMP y MAMP, 5 minutos de exposición, sensores con 0.1% NQS y 0.1% SiO₂ NPs. B) Las imágenes fotográficas de sensores que contienen 50/50 (izquierda) y 60/40 (derecha) de PDMS / TEOS (/w) expuestos a 0.01 g ml⁻¹ de AMP (a, b) y MAMP (c, d) durante 8 min y piezas en bruto (e, f), C) fotografías con microscopio óptico de los sensores con diferentes relaciones en peso de PDMS / TEOS después del contacto con 0.01 g ml⁻¹ de AMP durante 8 min a) 100/0, b) 5/50, c) 40/60 PDMS / TEOS (w/w), en un aumento de 10x.168

Figura 66. Espectros de absorbancia para evaluar la estabilidad del NQS en disolución acuosa (1: disolución acabada de preparar) en oscuridad (**líneas azules** 2: 5 min, 3: 4 días, 4: 9 días) y a luz solar (**líneas rojas** 5: 5 min, 6: 15 min, 9: 9días) con el tiempo. Las respuestas se cuantificaron a partir de la absorbancia a 380 nm con 2,4 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ NQS de concentración. Recuadro: Fotografía de respuestas colorimétricos de la disolución de NQS a la luz solar en a) 5 min, b) 7 días, c) 0 min, d) 30 días.169

Figura 67. La absorbancia a 525 para aminas primarias y 600 nm para aminas secundarias correspondiente de los productos de reacción en el sensor, MAMP y MDMA NQS o AMP y MDA-NQS, registrado contra un blanco de reactivo a diferentes tiempos de reacción. Condiciones: Composición del sensor: 0.1% NQS, 0.1% NP, 50:50 PDMS:TEOS; concentración de analito: AMP y MAMP 0.02 g/mL, MDMA y MDA 0.01 g/mL.170

Figura 68. Fotografía del análisis de droga en polvo utilizando el kit colorimétrico (tampón básico y sensor) para la AMP (arriba) y MAMP (abajo) en 0,02 g ml⁻¹, junto con los espectros de absorción a diferentes concentraciones a) 0 b) 0.005, c) 0.01, d) y e) 0.03 f) 0.05 g/mL de A) AMP y B) MAMP.171

Figura 69. A) Los cromatogramas obtenidos para un blanco (agua), 16,5 mg / ml de MDMA y la muestra éxtasis, obtenida por derivación FMOC con detección FL. B) los espectros de FTIR-ATR de MDMA en polvo como referencia y la muestra éxtasis en polvo.175

Figura 70. Reacción de Berthelot.178

- Figura 71.** Fotografías de los sensores de PDMS.178
- Figura 72.** Cinética de Berthelot para el NH_4^+ (1mg L^{-1}) con a) PDMS-timol/NaOH (en verde) y b) PDMS/timol/nitroprusiato (en amarillo).% R=porcentaje de respuesta analítica respecto a la respuesta máxima.180
- Figura 73.** Espectro de UV-vis obtenido para A) un blanco, 1 y 4 mg L^{-1} de NH_4^+ utilizando el sensor timol/NaOH. B) un blanco, 1 y 5 mg L^{-1} de NH_4^+ utilizando el sensor PDMS/timol/nitroprusiato mediante un procedimiento siminal en ambos casos.....181
- Figura 74.** Grafico sobre la probabilidad de detección según la concentración de amonio en muestras reales.....182
- Figura 75.** Estudio comparativo de las propiedades analíticas y otras propiedades complementarias entre el kit PDMS- NH_4^+ propuesto con diversos métodos de determinación de NH_4^+ . Se ha utilizado una escala del 1 al 5, siendo el 5 la mejor puntuación.185
- Figure 76.** The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the initial rate for free ALP at concentrations from 2.5 to 500 units/mg. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM, pH=9.0) with $2.4\mu\text{M}$ of OMFP the fluorescence was observed every 30s for 5 min.193
- Figure 77.** The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the initial rate for sensor of immobilized ALP at concentrations from 2.5 to 500 units/mg. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM, pH=9.0) with $2.4\mu\text{M}$ of OMFP the fluorescence was observed every 30s for 5 min.194
- Figure 78.** The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the initial rate of immobilized ALP (S1; 500 ALP units/mg) in a zein film prepared with different amounts of glycerol. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM, pH=9.0) with $2.4\mu\text{M}$ of OMFP the fluorescence was observed every 30s for 5 min195
- Figure 79.** SEM images of zein device with ALP immobilized using A) 0% of glycerol (Scale bare $30\ \mu\text{m}$) and B) 70% of glycerol (Scale bare $8\mu\text{m}$) The porosity is higher in presence of glycerol.196
- Figure 80.** Picture of biodevice and schematic representation of alkaline phosphatase based fluorescent biodevice assay where the alkaline phosphatase (ALP) that hydrolyzed unfluorescent OMFP to fluorescent OMF is inhibited by inorganic phosphate in buffer solution at pH=9.198

Anexos

Figure 81. Effect of varying the OMFP concentration response in absence (navy blue) and presence of inhibitor (sky-blue) in free ALP in solution (up) and using the sensor S1 (down). Both experiments, the biodevice was measured in Tris HCl buffer (100 mM) and (b) at concentration 2.4 μ M OMFP. The concentration of phosphate was 1 mg/L.199

Figure 82. Effect of varying pH in solution (up) and on the biodevice response (down) in absence (navy blue) and presence of inhibitor (sky-blue). Both experiments, the biodevice was measured in Tris HCl buffer (100 mM) and (b) at concentration 2.4 μ M OMFP. The concentration of phosphate was 1 mg/L.200

Figure 83. Inhibition efficiency curves for the free and immobilization ALP in the presence of P. The biodevice and free ALP (100 units/mg) was measured in Tris HCl buffer (100 mM, pH= 9.0).201

Figure 84. Lineweaver-Burk plot for immobilized ALP in the presence of P at 1 mg/L. All measurements were carried out in Tris HCl buffer (100 mM, pH=9.0) and at concentration 2.4 μ M OMFP.202

A2. Listado de Tablas

Tabla 1. Síntesis de AuNPs esféricas	32
Tabla 2. Sensores plasmónicos colorimétricos con AuNPs.....	34
Tabla 3. PDMS.....	43
Tabla 4. IT-SPME acoplado a LC.	44
Tabla 5. Zeína	49
Tabla 6. CNTs en SPME	53
Tabla 7. Metodologías analíticas para la estimación de los ftalatos en muestras biológicas.....	56
Tabla 8 Estimación de triazinas, organofosforados, PAHs y piretroides por LC.....	58
Tabla 9 Sensores colorimétricos para la detección de aminas en aire.	61
Tabla 10. Métodos analíticos detección de compuestos anfetamínicos.	65
Tabla 11. Sensores para la detección de amonio.	67
Tabla 12. Sensores para la detección de poliaminas.	71
Tabla 13. Sensores para la detección de fosfato inorgánico en aguas	73
Tabla 14. Listados de reactivos utilizados en esta Tesis.	77
Tabla 15. Composición de los sensores PDMS/(TEOS)-NQS y PDMS/(TEOS)- ETH ^T 4001	88
Tabla 16. Composición de los sensores de PDMS/TEOS-NQS dopados con NPs.....	90
Tabla 17 Columnas y condiciones cromatográficas	92
Tabla 18 Condiciones experimentales empleadas para la obtención de la respuesta de los sensores poliméricos.	94
Tabla 19. Condiciones de síntesis para las AuNPs utilizadas en los ensayos.	103
Tabla 20. Control por UV del H ₂ O ₂ en la síntesis de AuNPs.	105
Tabla 21. Recta de calibrado obtenida para la adición de patrones acuosos de SPN con cuatro síntesis independientes de AuNPs.	119

Anexos

Tabla 22. Pendientes obtenidas para estándar de SPN en orina utilizando diferentes condiciones de análisis.	120
Tabla 23 Parámetros analíticos para la determinación de DEHP y sus productos de degradación en aguas ftalatos en aguas	130
Tabla 24. Parámetros analíticos para la determinación de ftalatos en orina.	136
Tabla 25 . Niveles de DEP, MEHP, DBP y DEHP en orina de 18 voluntarios	138
Tabla 26. LODs ($\mu\text{g/L}$) y RSD (%) obtenido para cada analitos según la columna capilar utilizada.....	145
Tabla 27. Factor de preconcentración (PR) y Log K_{ow} de los compuestos analizados ...	146
Tabla 28 Características químico-físicas de los disolventes evaluados	154
Tabla 29. Procesos químicos para impartir hidrofiliidad al PDMS Sylgard 184	160
Tabla 30. Respuesta de los sensores para patrones gaseosos de aminos.	163
Tabla 31. Parámetros analíticos para la determinación de AMP, MAMP MDA y MDMA utilizando dos procedimientos distintos.	173
Tabla 32a. Comparación de las rectas de calibrado obtenidas para los dispositivos de PDMS-timol y la disolución de derivatización. Tabla 32b Comparación estadística de las pendientes de los dispositivos y de la disolución de derivatización	179
Tabla 33. Concentración de amonio en muestras de agua y extractos acuoso de PM_{10} con el dispositivo kit PDMS- NH_4^+ y la disolución convencional de derivatización.	183
Tabla 34. Valor promemedio de las recuperaciones obtenidas para el análisis de muestras de agua y extractos acuoso de PM_{10} con el dispositivo kit PDMS- NH_4^+ y la disolución convencional de derivatización.	183
Tabla 35. Phosphate recovery from water samples by fluorescence inhibition of free ALP and ALP immobilized biodevice	203
Table 36. Stability of devices after 20 days in different conditions of storage..	203
Tabla 37. Green analytical aspects of proposed analyticals methods in this Thesis.....	211
Tabla 38. Summary of materials and analytical methods proposed in this Thesis	212

A3. Lista de Abreviaciones

AMP	Anfetamina
ALP	Alcalina fosfatasa
AgNPs	Nanoparticulas de Plata
ATR	Reflectancia total atenuada
AuNPs	Nanopartículas de Oro
CapLC	Cromatografía líquida capilar
CD	Cadaverina
CV	Coefficiente de variación
CNTs	Nanotubos de carbono
DAD	Detector de fila de diodos
DBP	Dibutil ftalato
DEP	Dietil ftalato
DEHP	2-dietilhexil ftalato
DES-TBA	Desetil terbutilazina
ETH ^T 4001	N,N-dioctilamino)-4'trifluoroacetilazobenceno
FMOc	Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo
FTIR	Espectroscopía de infrarojo de Transformada de Fourier
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IT-SPME	Microextracción en fase sólida en tubo
LC	Cromatografía líquida
LG	Cromatografía de gases
LODs	Limites de detección
LOQs	Limites de cuantificación
MAMP	Metamfetamina
MDA	3,4-metilendioxi-anfetamina

Anexos

MDMA	3,4-metilendioxi metanfetamina
MEHP	Mono-etilhexil ftalato
NPs	Nanopartículas
NQS	1,2-naftoquinona-4-sulfonato
OMFP	3-O-metilfluorescein fosfato
OH-TBA	2-hidroxi-terbutilazina
OPA/NAC	o-ftaldialdeido acetil-L-cisteina
PAHs	Hidrocarburo aromático policíclicos
PBS	Banda de superficie Plasmónica
PDMS	Polidimetilsiloxano
P _i	Fosfato inorgánico
PT	Putrescina
Ref	Referencia
RSD	Desviación estandar relativa
RMN-MAS	Resonancia magnética nuclear en estado solido para ²⁹ Si
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SPD	Espermidina
SPE	Extracción en fase sólida
SPN	Espermina
SPME	Microextracción en fase sólida
s-SWNTs	Nanotubos de carbono monocapa
s-MWNTs	Nanotubos de carbono multinocapa
T°	Temperatura
TBA	Terbutilazina
TEM	Microscopía electrónica de transición
TEOS	Tetraetilortosilicato

ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA TESIS DOCTORAL

Sensitive and Selective Plasmonic Assay for Spermine as Biomarker in Human Urine

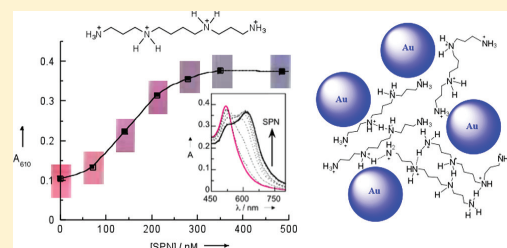
Anal. Chem. 2014, 86, 1347–1351

Sensitive and Selective Plasmonic Assay for Spermine as Biomarker in Human Urine

N. Jornet-Martínez,[†] María González-Béjar,[‡] Y. Moliner-Martínez,[†] P. Campíns-Falcó,^{*,†} and Julia Pérez-Prieto^{*,‡}[†]Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain[‡]Instituto de Ciencia Molecular/Departamento de Química Orgánica, Universidad de Valencia, C/Catedrático José Beltrán 2, 46980, Paterna, Valencia, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: A simple, fast, and highly selective and sensitive colorimetric assay to detect nanomolar levels of spermine in human urine (healthy donors, cancer patients) is reported. This assay is based on the absence of a competitive organic capping on the gold nanoparticles together with the high affinity of the amine groups of the analyte for the nanoparticle surface.



Biogenic polyamines (PAs), i.e. putrescine, PT, cadaverine, CD, spermidine, SPD, and spermine, SPN, (Figure 1A), are essential regulators of many cellular processes, such as cell growth and proliferation.¹ PA levels are regulated by multiple pathways,² and when they change, it may be indicative of abnormal biological processes associated with cancer.^{1,3–5} Therefore, urinary PA levels can be used as biomarkers for monitoring growing tumors in many types of cancer and for following cancer treatment in patients.^{4,6} Nowadays, the methods to assay PAs in urine involve laborious sample pretreatment and/or the use of complex technical equipment (fluorescence, chromatography, immunoassays, and capillary electrophoresis).⁷ Detection of SPN and SPD in water and artificial urine has been reported by using the recovery of the fluorescence of BODIPY dyes attached to gold nanoparticles (AuNPs) once the dye has been replaced by the PA. The detection limit of SPN and SPD was 10^{-7} M.^{7a} Though the fluorimetric methods are usually more sensitive than the colorimetric methods, the latter is easier to perform and requires simple equipment.

Colloidal AuNPs have been applied as colorimetric sensors of different analytes based on their surface plasmon band (SPB) dependence on their size and shape, as well as on their interparticle distance.^{8–17} Different colors are observed according to their dispersion/aggregation state. The sensitivity of AuNPs as sensors can strongly depend on the accessibility of the analyte to their surface; the more naked they are, the more sensitive they will be. Therefore, we presumed that “naked-AuNPs” could be highly sensitive sensors of PAs using the friendly colorimetric strategy. Scaiano et al. have recently

reported the preparation and characterization of “pseudo-naked” AuNPs.¹⁸ Basically, a two-pot process, consisting first in the photoreduction of the Au salt by H_2O_2 which produced polymorphic and polydispersed AuNPs,¹⁹ was followed by laser ablation giving rise to small spherical AuNPs with narrow size distribution. The only byproducts of the AuNP preparation are O_2 , H_2O , and HCl. We have recently prepared the AuNPs by a one-pot process,²⁰ which makes use of the capacity of H_2O_2 as the reducing agent of $HAuCl_4$ to provide polydispersed AuNPs via a thermal process while a 532 nm laser ablates them to provide narrow-sized AuNPs which are highly stable (for more than six months).

Here, we have studied the behavior of “pseudo-naked” AuNPs in the presence of PAs present in urine: PT, CD, SPD, and SPN (Figure 1A). Our data confirm that these AuNPs can be used as selective and sensitive sensors of SPN vs the other PAs and also that other urine components do not induce AuNP aggregation. Remarkably, the estimated detection limit of SPN in the urine samples with our colorimetric sensor was 10 ppb, which is noticeably more sensitive than previously reported fluorimetric sensors.

EXPERIMENTAL SECTION

Polyamine Solutions. Polyamine standards were prepared by dissolving the amine hydrochloride in water ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Working amine solutions, spermidine, spermine, cadaverine,

Received: November 2, 2013

Accepted: January 15, 2014

Published: January 15, 2014

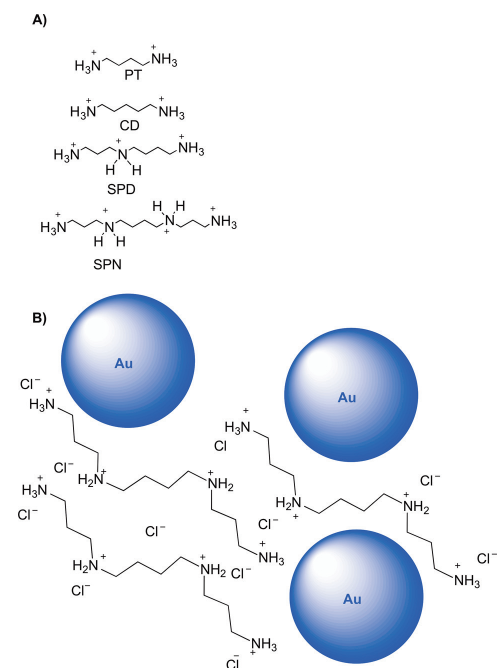


Figure 1. (A) Chemical structure of the polyamines used in this report. (B) Schematic drawing of the AuNP aggregation induced by SPN.

and putrescine ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), were prepared by diluting the standard solution in water. All polyamine standards were prepared using Milli-Q water (treated overnight with Chelex 100), and they were stored in the dark at 4°C .

Solid Phase Extraction of Polyamines from Human Urine Samples. First, C_{18} silica cartridges (100 mg) were conditioned with methanol (1 mL) and hydrogen carbonate solution (1 mL, 0.5 M) at pH 12. Then, 1 mL of urine or of urine spiked with SPN ($2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$) was passed through the cartridge. Then, hydrogen carbonate solution (2 mL), acetonitrile (1 mL), and nanopure water (2 mL) were used to wash the sample. Finally, polyamines were eluted with AcOH 5% in two fractions of 0.25 mL each. The efficiency of the extraction of the polyamines was evaluated by their derivatization with *o*-phthalaldehyde-*N*-acetylcysteine.²¹

Quantitative Detection of Spermine in Normal Urine Using AuNPs. A standard addition method was used for SPN quantification.²² First, between 5 and 100 μL of solid phase extraction (SPE)-treated urine was added to 1 mL of the AuNP, and the spectra were registered 20 s after each addition. Then, we selected 5, 10, and 15 μL as the optimal working urine volumes to be added to AuNPs for quantification. These volumes guaranteed both suitable responses for estimating SPN in urine and linear concentration ranges considering spiked urine samples. Three independent experiments were carried out for 5, 10, and 15 μL of urine and spiked urine (14.92 and 29.05 ppb), using 1 mL of AuNP2.

Quantitative Detection of Spermine in Abnormal Urine Using AuNPs. Increasing volumes (between 5 and 40 μL) of pathological urine pretreated by SPE were added to

AuNP4 (1 mL) solutions. The performance pattern of normal and pathological urines was different for all the assayed samples; the AuNP aggregation was more effective for the pathological urines (compare panels A–E with F–I of Figure S7, Supporting Information).

Figure S7I, Supporting Information, shows the aggregation for a pathological urine, and Figure S7J, Supporting Information, shows that for the pathological urine diluted by half. After dilution, the aggregation behavior for the pathological urine was similar to that of normal urine. Therefore, the experimental process and the SPN estimation can be carried out in the same manner in both cases.

RESULTS AND DISCUSSION

We synthesized four different batches of AuNPs (AuNP1, AuNP2, AuNP3, and AuNP4), whose preparation differed in (i) the $[\text{H}_2\text{O}_2]$, (ii) laser ablation time, and (iii) the procedure used to remove H_2O_2 (see experimental details, Table S1, and Figures S1 and S2 in the Supporting Information). The pH of the colloidal samples was ca. 3.3. Figure 2 shows the

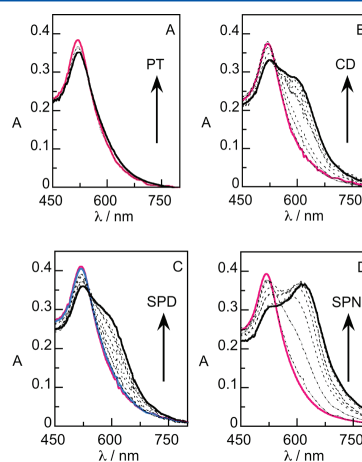


Figure 2. Absorption spectra of AuNP1 registered 20 s after addition of: (A) putrescine ($3\text{--}5 \mu\text{M}$); (B) cadaverine ($2\text{--}5 \mu\text{M}$); (C) spermidine ($0.1\text{--}1.5 \mu\text{M}$, 750 nM in blue); and (D) spermine (70–750 nM). AuNP1 in pink; the highest concentration of the PA tested in black.

characteristic SPB of AuNP1 centered at 520 nm and how it changes selectively depending on the nature and concentration of the PA. At the μM level, all the PAs, except PT (the shorter diamine assayed, Figure 1), caused a red-shift in the SPB accompanied by a considerable broadening. Interestingly, only SPN, which has the longest C-chain and the highest number of amine groups of all the PAs tested (see Figure 1), induced drastic plasmon changes at a nM level (Figure 2D).

All the PAs are protonated in the AuNP colloidal solution due to the presence of HCl. Raman studies on putrescine, spermidine, and spermine polyamines have evidenced considerable differences in the interchain $\text{N}^+\text{--H}\cdots\text{Cl}^-$ interactions from putrescine dihydrochloride to spermine tetrahydrochloride. These differences reflect the effect of both the polyamine chain length and the number of amine/imine groups on the conformational behavior of the polyamines.²³ In addition,

Raman studies on the interaction of these polyamines and a guanine-cytosine oligonucleotide have demonstrated the significantly higher capacity of spermine to induce aggregation; thus, spermine aggregated the oligonucleotide in a similar fashion at a concentration three times lower than spermidine.²⁴

The selectivity in the recognition of SPN by the AuNPs could be explained by the higher binding affinity of the AuNPs to this PA, which has the highest capacity for establishing multivalent interactions, as well as by intermolecular interactions (H-bonding, van-der-Waals interactions) between the PA hydrochlorides; thus, both types of interactions cooperate in stabilizing the aggregate (Figure 1B; TEM images of AuNP1 before and after addition of SPN in Figure S3, Supporting Information). However, as mentioned above, the extraordinary selectivity for SPN sensing cannot be successfully explained by the electrostatic attractions alone, but structural specificities also have to be taken into account.

Moreover, small variations in the AuNP preparation do not affect this aggregation (section 5, Figure S4, Supporting Information) and small aliphatic monoamines do not induce any changes at similar or higher concentrations (Figure S5, Supporting Information). The facts mentioned above suggested that these AuNPs could act as selective sensors of SPN in urine, taking into account the PAs content in urine;^{21,25,26} i.e., putrescine, cadaverine, and spermidine do not give responses at their concentration in urine. Figure 3 illustrates the dependence

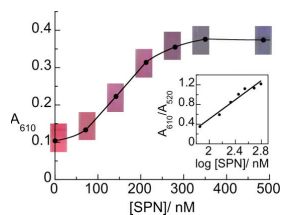


Figure 3. Absorbance of AuNP1 monitored at 610 nm 20 s after addition of SPN (72–485 nM) together with their colorimetric visualization. Inset: plot of A_{610}/A_{520} vs $\log[\text{SPN}]$.

of the absorbance at 610 nm (A_{610}) on the $[\text{SPN}]$ in the range from 72 to 485 nM. The A_{610}/A_{520} ratio was also plotted vs $\log[\text{SPN}]$ (Figure 3, inset). The color of the solution gradually changed from pink to deep pink, to violet, and finally, to violet-blue when increasing $[\text{SPN}]$. A similar response has been previously reported in ELISA immunoassays.²²

Urine addition (between 10 and 100 μL) to 1 mL of AuNP1 solution caused negligible aggregation of AuNP1 (neither any visual color change nor a remarkable spectrum modification; Figure S6, Supporting Information). However, addition of urine spiked with SPN to the AuNP1 solution induced a change from pink to blue and a SPB shift (Figure 4A), and the AuNPs eventually precipitated after 6 h. Remarkably, a simple solid phase extraction (SPE, see Experimental Section and Supporting Information for more details) was enough for the optimal pretreatment of the urine samples. Thus, addition of increasing volumes (between 5 and 40 μL) of pretreated urine spiked with SPN to the AuNP1 solution brought about a similar behavior to that of aqueous solutions of SPN (compare Figures 2D and 4B). This showed that AuNP1 was highly sensitive to SPN, which in normal urine is present at ppb (nM) concentrations.^{21,25,26}

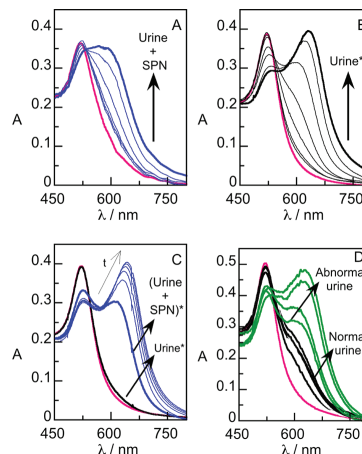


Figure 4. Absorption spectra of AuNP1 20 s after addition of (A) spiked urine (142, 281, 418, 552, 625, 750 nM) of measured SPN (added volumes 10–100 μL); (B) SPE-treated urine (5, 10, 15, 20, 25, 30, and 40 μL); and (C) urine spiked with SPN (70.8 ppb (350 nM), volume of 5 μL), treated by SPE, and measured over time (20, 60, 120, 180, and 240 s). (D) Absorption spectra of AuNP4 before and after addition of 10 μL of urine (four cancer patients and five healthy volunteers). For all graphs, pink: AuNPs; black: AuNP1/urine; blue: AuNP1/urine spiked with SPN; green: pathological urine. (*, urine treated by SPE).

Control experiments confirmed that SPN was the main species responsible for AuNP aggregation. Thus, urine was spiked with SPN and then treated by SPE (Figure 4C). Note that the maximum at 610 nm shifted to 640 nm over time (20–300 s, light blue lines, Figure 4C) as observed with the untreated spiked urine, although this required higher $[\text{SPN}]$.

Then, the plasmonic SPN sensor was successfully evaluated in urine samples from both healthy donors (five samples) and cancer patients (four samples). Increasing volumes (between 5 and 40 μL) of normal or abnormal urine, pretreated by SPE, were added to AuNP4 (1 mL); Figure S7A–E,H–I in the Supporting Information. The performance pattern of the pathological urine samples was different from that of the normal urine samples. Thus, the pathological samples proved to be considerably more efficient for the aggregation (compare Figure 4D with Figure S7H–I in the Supporting Information for AuNP4).

The response of these AuNPs to the presence of other urine components, such as urea, uric acid, creatinine, human serum albumin (HSA), glutathione (GSH), and calcium ion, was also analyzed. They, either individually or as a mixture, did not induce the aggregation even at considerably high concentrations (mM; Figure S5, Supporting Information); neither did GSH, at concentrations of up to 10 μM . We also studied if the acidic conditions used to extract SPN from the C18 phase could play a role in the aggregation. However, no changes in the AuNP SPB were detected to those acidic values (Figure S5, Supporting Information).

Undoubtedly, PT, CD, and SPD can be discarded as the species responsible for the absorption changes. Although they could be eluted together with SPN, their contribution to the absorbance changes would be minimal, taking into account the

low response of the AuNP absorption to these PAs (see Figure 2) together with their expected small concentration in urine samples (see Table S4, Supporting Information).^{21,25,26} Finally, as the matrix components may alter the assay sensitivity and dynamic range of SPN, their effect was also studied by comparing SPN standards prepared in water with those prepared in urine (Figure 5).

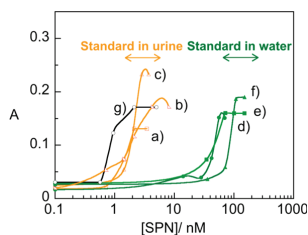


Figure 5. Absorbance of AuNP2 monitored at 610 nm 20 s after addition of SPN standard in urine (orange): (a) 0.1, 0.7, 1.4, 2.1, and 3.5 nM; (b) 0.1, 0.7, 1.4, 2.1, 4.2, and 10 nM; (c) 0.1, 1.4, 2.8, and 5.7 nM; the standard in aqueous solution (green) (d) 0.1, 14, 28, 42, 56, and 70 nM; (e) 0.1, 34.6, 71.4, and 100 nM; (f) 0.1, 35.7, 71.1, 106, and 150 nM; (g) standard in pathological urine: 0.1, 0.6, 0.9, 2.1, and 10 nM (black).

We found that the SPN standard in water induced aggregation of the AuNPs in a different dynamic range than that in human urine, as reported for ELISA assays.²² Since the matrix effect was present, the standard addition method was used for the quantification. First, we determined the working urine volume to add to the AuNP2 solution (section 9, Supporting Information). Then, the absorbance changes of a colloidal solution of AuNP2 (1 mL) after adding different volumes (5, 10, and 15 μ L) of urine and urine spiked with SPN (14.5 and 29.05 ppb (72 and 143 nM)) were monitored; see Figure 6 for three independent experiments. Both spikes (14.5

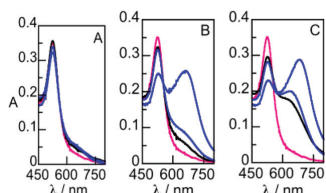


Figure 6. Absorption spectra of AuNP2 20 s after addition of 5 μ L (A), 10 μ L (B), and 15 μ L (C) of urine and urine spiked with SPN (72 nM and 143 nM). For all graphs, pink: AuNP2; black: AuNP2/human urine; blue: AuNP2/human urine spiked with SPN (72 and 143 nM).

and 29.05 ppb) were used for estimation of the [SPN] when using a 5 μ L urine volume, while only the 14.5 ppb spike was considered in the larger urine volume, bearing in mind the linear interval achieved.

The estimated [SPN] in urine was 35 ± 15 ppb; this value was in accordance with literature values.^{21,25,26} Another normal urine was quantified using AuNP4, and the SPN concentration was 27 ± 6 ppb. To quantify the amount of SPN present in the pathological urines, the corresponding sample was treated by SPE and diluted (0.5:1.0); see the Supporting Information. The

SPN linear range of concentrations was similar to that used for normal urine samples (Figure 7). Volumes of 5, 10, and 15 μ L

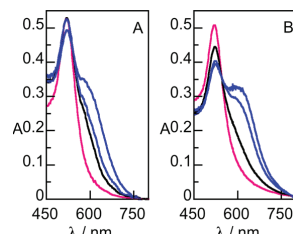


Figure 7. Absorption spectra of AuNP4 20 s after the addition of 10 and 15 μ L of diluted pathological urine spiked with SPN (36 and 72 nM). For all graphs, pink: AuNP2; black: AuNP2/human urine; blue: AuNP4/human urine spiked with SPN.

of the spiked pathological urine (5.8 and 14.5 ppb) were added to AuNP4 (1 mL). Both spikes were used for the estimation of the [SPN] when using 10 and 15 μ L (Figure 6, bottom). The estimated [SPN] was 50 ± 15 ppb (225 ± 50 nM). Finally, the estimated detection limit of SPN in the urine samples analyzed in this work was 10 ppb.

CONCLUSIONS

In summary, naked AuNPs are selectively aggregated by SPN as compared with other PAs not only in water but also, most importantly, in SPE-treated urine samples. It is worth noting that, even though we intentionally made small variations in the synthesis and in the workup of the AuNPs, their responses were practically identical. There is a need for complementary or alternative approaches that are reliable for cancer diagnosis as well as for monitoring effectiveness of therapy. In this respect, our method proved to be useful for the sensitive and selective determination of the SPN levels in urine in an easy way. Future work will be aimed at applying our methodology to clinical studies.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Synthesis and characterization of AuNPs; additional selectivity tests and spectra of the response of the AuNPs to human urine samples; solid phase extraction method. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: pilar.campins@uv.es. Fax: +34-963543447 Tel: +34-963543002.

*E-mail: julia.perez@uv.es. Fax: +34-963543576; Tel: +34-963543050.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank GV (PROMETEO 2012/045, NJ grant, ACOMP/2013/008), MINECO (CTQ2011-27758; CTQ2011-26760; M.G.B. JdC contract), the European Community (FP7-PEOPLE ref PCIG09-GA-2011-294263 to M.G.B.), and UV (UV-INV-PRECOMP12-80490) for financial support.

REFERENCES

- (1) Seiler, N.; Delcros, J. G.; Moulinoux, J. P. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28*, 843.
- (2) Thomas, T.; Thomas, T. J. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 244.
- (3) Fujita, K.; Nagatsu, T.; Maruta, K.; Ito, M.; Senba, H.; Miki, K. *Cancer Res.* **1976**, *36*, 1320.
- (4) Clarke, R. A.; Schirra, H. J.; Catto, J. W.; Lavin, M. F.; Gardiner, R. A. *Cancers* **2010**, *2*, 1125.
- (5) van der Graaf, M.; Schipper, R. G.; Oosterhof, G. O. N.; Schalken, J. A.; Verhofstad, A. A.; Heerschap, A. *Magn. Reson. Mater. Phys., Biol. Med.* **2009**, *10*, 153.
- (6) Uehara, N.; Shirakawa, S.; Uchino, H.; Saeki, Y. *Cancer* **1980**, *45*, 108.
- (7) (a) Kim, T.; Park, T. V.; Kim, Y. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 11978. (b) Nakamura, M. N.; Sanji, T.; Tanaka, M. *Chem.—Eur. J.* **2011**, *17*, 5344. (c) Özdeştan, Ö.; Üren, A. *Talanta* **2009**, *78*, 1321. (d) Steiner, M.-S.; Meier, R. J.; Spangler, C.; Duerkop, A.; Wolfbeis, O. S. *Microchim. Acta* **2009**, *167*, 259.
- (8) Stewart, M. E.; Anderton, C. R.; Thompson, L. B.; Maria, J.; Gray, S.; Rogers, J. A.; Nuzzo, R. G. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 494.
- (9) Eustis, S.; El-Sayed, M. A. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 209.
- (10) Wang, Z.; Lévy, R.; Fernig, R. D. G.; Brust, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2214.
- (11) Choi, Y.; Ho, N. H.; Tung, C. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 707.
- (12) Liu, R.; Liew, R.; Zhou, J.; Xing, B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 8799.
- (13) Zagorovsky, K.; Chan, W. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2013**, *52*, 3168.
- (14) Lee, J. S.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *119*, 4171.
- (15) Gu, J. A.; Chia, Y. M.; Lin, H. Y. *Microchim. Acta* **2013**, *180*, 801.
- (16) Jiang, Y.; Zhao, H.; Zhu, N.; Lin, Y.; Mao, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 8601.
- (17) Vanegas, J. P.; Peisino, L. E.; Poció-Martínez, S.; Zaragoza, R. J.; Zaballos-García, E.; Pérez-Prieto, J. *Chem.—Eur. J.* **2013**, *19*, 16248.
- (18) Bueno-Alejo, C.; D'Alfonso, J. C.; Pacioni, N. L.; González-Béjar, M.; Grenier, M.; Lanzalunga, O.; Alarcon, E. I.; Scaiano, J. C. *Langmuir* **2012**, *28*, 8183.
- (19) McGilvray, K. L.; Granger, J.; Correia, M.; Banks, J. T.; Scaiano, J. C. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 11914.
- (20) Lanterna, A.; Pino, E.; Domenech-Carbó, A.; González-Béjar, M.; Pérez-Prieto, J. 2013, unpublished results.
- (21) Molins-Legua, C.; Campíns-Falcó, P. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *546*, 206.
- (22) Law, B.; Malone, M. D.; Biddlecombe, R. A. In *Immunoassay. A practical Guide*; Law, B., Ed.; Taylor & Francis, London, 1996; pp 127.
- (23) Amorim da Costa, A. M.; Marques, M. P. M.; Batista de Carvalho, L. A. E. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, *34*, 357.
- (24) Ruiz-Chica, J.; Medina, M. A.; Sánchez-Jiménez, F.; Ramírez, F. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 437.
- (25) Molins-Legua, C.; Campíns-Falcó, P.; Sevillano-Cabeza, A.; Pedrón-Pons, M. *Analyst* **1999**, *124*, 477.
- (26) Liua, R.; Jia, Y.; Chenga, W.; Linga, J.; Liua, L.; Bia, K.; Li, Q. *Talanta* **2011**, *83*, 751.

Sensitive and selective plasmonic assay for spermine as biomarker in human urine

*Neus Jornet-Martínez,^a María González-Béjar,^b Yolanda Moliner-Martínez,^a Pilar Campíns-Falcó^{*a} and Julia Pérez-Prieto^{*b}*

Index

1. Materials.....	S2
2. Instrumentation.....	S2
3. Synthesis and characterization of gold nanoparticles.....	S2
4. Batch to batch reproducibility.....	S5
5. The selectivity test of AuNPs for spermine in urine.....	S7
6. Response of AuNPs to the addition of SPE-treated urine of volunteers.....	S8
7. Response of the different AuNPs to SPN standards in normal urine.....	S9
8. References.....	S9

Experimental details

1. Materials

Gold (III) tetrachloroauric acid trihydrate 99.99% ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), 50% H_2O_2 , manganese dioxide (MnO_2), chelex 100, putrescine dihydrochloride >98%, cadaverine dihydrochloride 98%, spermidine trihydrochloride >98% and spermine tetrahydrochloride >99%, uric acid, sodium salt, creatinine >98%, sodium hydrogen carbonate, aliphatic amines (methylamine dihydrochloride, ethylamine (70 wt%), dimethylamine (40wt%) and diethylamine (1wt%)), methanol and acetonitrile were purchased from Sigma-Aldrich. Urea AnalAR NORMAPUR was provided from BHD Probalo, and Bond Elut C18 100 mg cartridges were obtained from Varian.

2. Instrumentation

UV-visible spectra were registered with a Varian Cary 60 Fiber Optic UV-vis spectrophotometer. The analytical signal was recorded between 200 and 1000 nm. Laser ablation was performed using a Nd/YAG laser at 532 nm. AuNP irradiation was carried out with a LZC-L4V photoreactor from Luzchem Research, Inc. Nanoparticle sizes were determined using a transmission electronic microscope (TEM) with a JEM-1010 from Jeol Ltd operated at 100 kV. TEM samples were prepared by delivering 10 μL of the AuNPs suspension onto a carbon-coated copper grid (300 mesh), which was subsequently dried overnight at room temperature. Nanoparticle sizes were calculated by using ImageJ software.^[1]

3. Synthesis and characterization of gold nanoparticles

An aqueous solution of 0.5-1.1 mM H_2O_2 and 0.5 mM HAuCl_4 in Millipore water (treated overnight with Chelex to eliminate metal traces in water) was irradiated with a 532 nm laser (10 Hz, 16-19 mJ) until the Au^{3+} band (ca. 300 nm) disappeared and that of H_2O_2 (240 nm) decreased to approach the absorbance of the plasmon band at 520-525 nm (**Figure S1**).^[2] After dilution of the mixture with water (2:1 H_2O :AuNP solution), the excess of H_2O_2 was removed by using two different methods. Method 1: UVA-lamp irradiation of AuNP1 solution during 20 minutes. Method 2: AuNP2 solution was treated with MnO_2 (25 mg) followed by decantation.^[3] In the case of AuNP3, the dilution in water was enough to eliminate the excess of H_2O_2 in mg/L. Dip sticks demonstrated that H_2O_2 concentration was below 0.5 mg/L. UV-visible spectrum of the AuNPs revealed a plasmon band centered at 520 nm. **Table S1** summarizes the conditions used to synthesize each batch of AuNPs used in this work.

Table S1: Synthesis conditions of gold nanoparticles

AuNP	H_2O_2 (mM)	Laser Ablation Frequency, Energy, Time	Work-up
AuNP1	0.77	10 Hz, 16-19 mJ, 270 min.	Dilution ^[a] and photoreactor ^[b] (20 min).
AuNP2	0.92	10 Hz, 16-19 mJ, 90 min.	Dilution ^[a] , MnO_2 (25 mg) and decanted
AuNP3	0.63	10 Hz, 16-19 mJ, 250 min.	Dilution ^[a]
AuNP4	1.10	10 Hz, 16-19 mJ, 210 min	Dilution ^[a] and photoreactor ^[b] (60 min)

[a] The AuNP solution was diluted with water (2:1 H_2O :AuNP solution), [b] 14 UVA-lamps in an LZC-L4 V photoreactor.

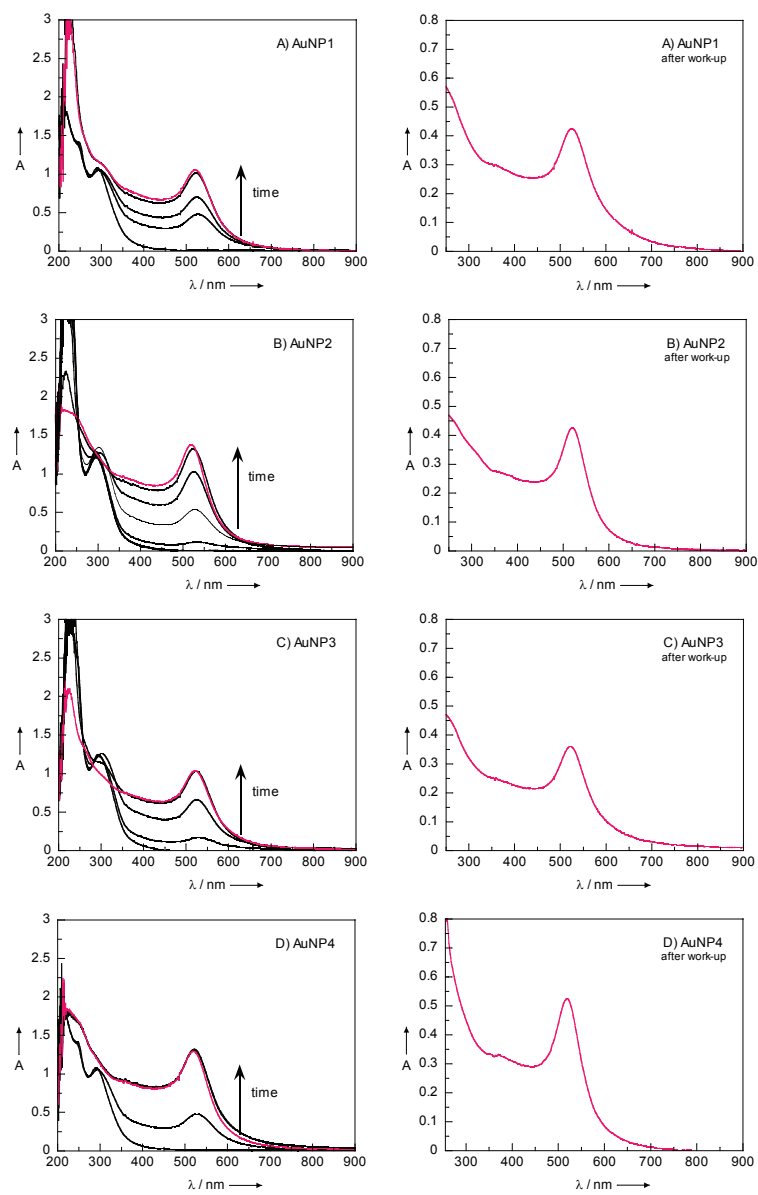


Figure S1. Absorption spectra registered during the synthesis of four different gold nanoparticles: A) AuNP1, B) AuNP2, C) AuNP3, D) AuNP4. Plots overtime (left) and after the work-up (right).

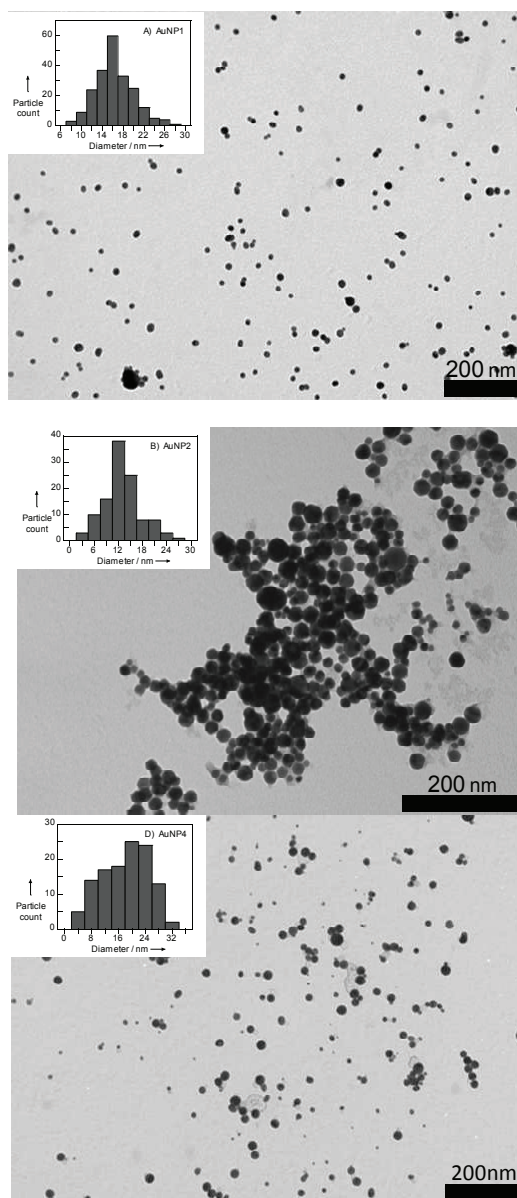


Figure S2. Representative TEM micrographs of the AuNPs (from top to the bottom: AuNP1, AuNP2, AuNP4) and the histogram with the size distribution.

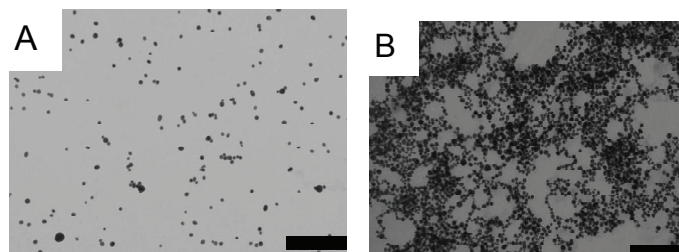


Figure S3. TEM images of AuNP1 before (A) and after (B) addition of SPN (280 nM). Scale bar: 200 nm.

4. Batch-to-batch reproducibility of the assay

AuNP1, AuNP2, AuNP3 and AuNP4 were compared to test if small variations in their synthesis and work-up are critical for the SPN quantification. In addition, the influence of other parameters, such as the AuNP concentration, was also analyzed. Table S2 shows that the slopes of the A_{610}/A_{520} vs $\log[\text{SPN}]$ plots for the three AuNPs are comparable for SPN aqueous standards.

In addition, Table S3 gives the response of A_{610} of the four different AuNPs to SPN standards in a normal urine, using different conditions i) colloidal volumes (250 and 1000 μL), ii) volumes of SPN-spiked human urine (5 μL , 10 μL , and 15 μL), iii) AuNP concentration (A_{520} values of 0.18 and 0.36), and iv) SPN concentration (72 nM and 143 nM added to the human urine samples). Interestingly, the response to the different AuNPs matched the concentration of both components (SPN and AuNP) perfectly, Fig. S4. The AuNP aggregation is enhanced when the concentration of one of the components is decreased compared to that of the other. It is worth noting that even though there were small variations in the synthesis and in the work-up of the AuNPs, the above results indicate that their response for a sample under the same conditions will be practically identical.

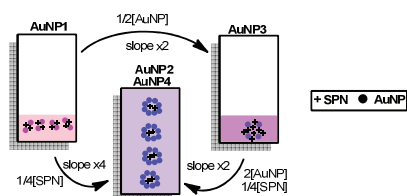


Figure S4. Response of the four different AuNPs to the concentration of both components SPN and AuNP (5 μL SPN-spiked urine from healthy donors shown in Table S2)

Table S2. Calibration equations obtained for SPN aqueous standards for four independent syntheses of AuNPs.

AuNP	A_{520} ^a	AuNP (μL)	A_{610}/A_{520} vs $\log[\text{SPN}]$
AuNP1	0.36	1000	$y = 0.97x - 1.45$
AuNP2	0.36	1000	$y = 0.99x - 1.25$
AuNP3	0.18	1000	$y = 0.51x - 0.23$ ^b
AuNP4	0.36	1000	$y = 0.95x - 1.91$

^aInitial absorbance of the AuNP at 520 nm. ^b[AuNP] was halved.

Table S3. Slopes obtained for SPN standards in urine using different conditions of analysis.

AuNP	A_{520} ^a	AuNP (μL)	Spiked urine (μL)	Slope ^b
AuNP1	0.36	250	5	0.015
AuNP2	0.36	1000	5	0.06
AuNP2	0.36	1000	10	0.06
AuNP2	0.36	1000	15	0.06
AuNP3	0.18	250	5	0.03
AuNP4	0.36	1000	5	0.06
AuNP4	0.36	1000	15	0.06

^aInitial absorbance of the AuNP at 520 nm.

^b ΔA_{610} vs [SPN] (nM); Human urine spiked with 72 and 143 nM of SPN.

5. The selectivity test of AuNPs for spermine in human urine

Figures S5A, S5B, S5D and S5E demonstrate the insignificant response of the AuNPs to major urine compounds, while Figure S5C shows the small response of the AuNPs to the acidic conditions used to extract SPN from the C18 phase. Changes in the AuNP plasmon band were negligible.

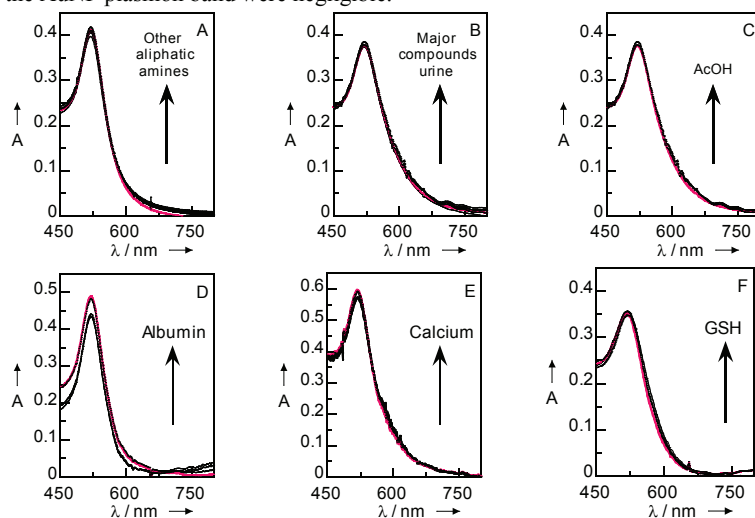


Figure S5. Absorbance spectra of AuNP (1 mL) after addition of volumes from 10 to 100 μ L of A) aliphatic: methylamine, ethylamine, dimethylamine, and diethylamine (mM); B) urea (14 mM), uric acid (2.4 mM), creatinine (7.1 mM), and a mixture of them; C) AcOH (0.2-2 M); D) human serum albumin (4.4 mM), E) Ca_2CO_3 (3.5 mM), and F) Glutathione (GSH) (10 μ M). AuNP in pink; the highest concentration of the analyte tested in black. All samples were treated by SPE.

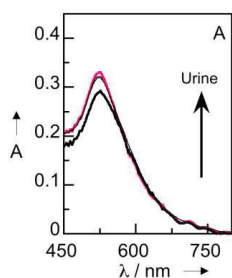


Figure S6. Absorption spectra of AuNP1 (1 mL) 20 seconds after addition of normal urine (between 10 and 100 μ L). AuNP in pink; the highest concentration of urine in black.

6. Response of AuNPs to the addition of SPE-treated urine of volunteers.

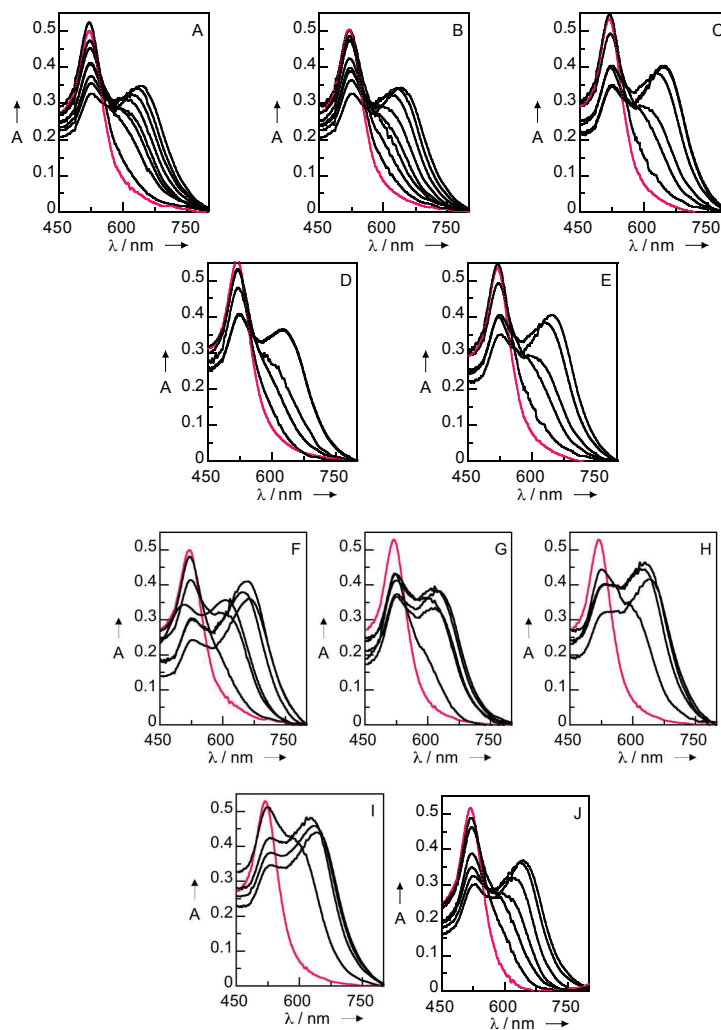


Figure S7. Absorption spectra of AuNP4 (1mL) registered 20 seconds after the addition of volumes between 5-40 μ L of A-E) SPE-treated urine of five healthy volunteers, F-I) SPE-treated urine of four cancer patients, J) SPE-urine of a cancer patient diluted by half. For all graphs **pink**: AuNP4, **black**: AuNP4/human normal urine or pathological urine.

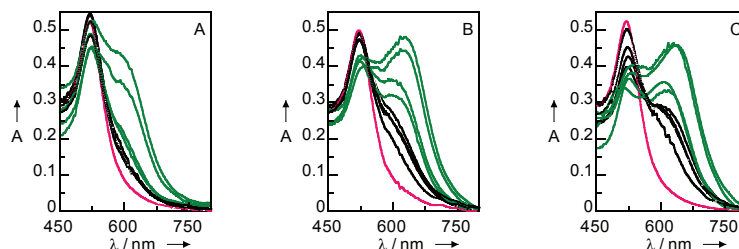


Figure S8. Absorption spectra of AuNP4 registered 20 seconds after the addition of 5 μL (A), 10 μL (B), and 15 μL (C) of SPE-treated urine of four cancer patients and of five healthy volunteers. For all graphs **pink**: AuNP4, **black**: AuNP4/normal urine, **green**: AuNP4/pathological urine.

7. Response of the different AuNPs to SPN standards in normal urine.

The response of A_{610} of the four different AuNPs to SPN standards in a normal urine was measured using different conditions i) colloidal volumes (250 and 1000 μL), ii) volumes of SPN-spiked human urine (5 μL , 10 μL , and 15 μL), iii) AuNP concentrations (A_{520} values of 0.18 and 0.36), and iv) SPN concentrations (72 nM and 143 nM added to the human urine samples).

Interestingly, the response to the different AuNPs matched the concentration of both components (SPN and AuNP) perfectly, see Table 2. Thus, for the 5 μL SPN-spiked urine (see also Figure 9) the slope was i) two-fold higher when the AuNP concentration was halved (compare the result of AuNP3 with that of AuNP1), ii) four-fold higher when the SPN concentration was quartered (compare the result of AuNP2 and AuNP4 with that of AuNP1), and iii) two-fold higher when the AuNP concentration was doubled and the SPN concentration was quartered (compare the result of AuNP2 and AuNP4 with that of AuNP3).

8. References

- [1] Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671.
- [2] Anabel Lanterna, Eduardo Pino, María González-Béjar, Julia Pérez-Prieto. **2013**. *Unpublished results*.
- [3] G. L. Hallett-Tapley, C. D'Alfonso, N. L. Pacioni, C. D. McTiernan, M. González-Béjar, O. Lanzalunga, E. I. Alarcon, Juan C. Scaiano. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 10073.

On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di(2ethylhexyl) phthalate in waters

J. Chromatogr. A 2014, 1347, 157–160



Short communication

On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters



N. Jornet-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez,
R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 March 2014

Received in revised form 19 April 2014

Accepted 22 April 2014

Available online 2 May 2014

Keywords:

Phthalates degradation

Capillary chromatography

In-tube solid-phase microextraction

(IT-SPME)

Water analysis

ABSTRACT

The main di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) degradation products, (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), diethyl phthalate (DEP) and dibutyl phthalate (DBP), have been tested. The proposed cost-effective method combines on-line, in-tube solid-phase micro extraction (IT-SPME) in in-valve configuration and capillary liquid chromatography with UV diode array detection (Cap-LC-DAD). Acidification of the samples at pH 3 improved markedly the estimation of MEHP. Aliquots of 4 mL of acidified water samples were directly processed. After sample loading, the analytes were desorbed with the mobile-phase and transferred to the monolithic capillary column. Satisfactory linearity and precision, absence of matrix effect and suitable limits of detection (LODs): 0.005, 0.1, 0.1 and 1.5 µg/L for MEHP, DEP, DEHP and DBP, respectively have been achieved. The main advantages are speed and the reduction of background signal by minimizing sample preparation. Real water samples have been analyzed.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phthalate esters are widely used as plasticizers in the manufacture of plastics. Due to their extensive use and possible migration, phthalates are nowadays considered as ubiquitous environmental pollutants. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is the most widespread phthalate produced and used. The maximum annual average concentration established for DEHP by Directive 2008/105/CE in surface waters is 1.3 µg/L [1], whereas the US Environmental Protection Agency has set the maximum concentration level for this compound in water systems at 6 µg/L [2].

Numerous studies indicated that DEHP can be degraded in phthalates as (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), diethyl phthalate (DEP) and dibutyl phthalate (DBP) by bacteria and fungi under various environmental conditions [3] as Fig. 1 shows. Recent studies reported that MEHP may be more toxic than DEHP [4–8], nevertheless a vast majority of the proposed methods for phthalates in waters are limited to dialkyl esters [9].

Gas chromatography (GC) coupled to flame ionization detection [4,5,10,11] or mass-spectrometry (MS) [12–16] has been

extensively used for phthalates in different matrices. Several LC methods with diode array (DAD) [17,18] or MS detection have been reported [6,19]. The reliability of in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) coupled to capillary liquid chromatography (CapLC) approach has been demonstrated for a variety of organic pollutants by processing on-line between 1 and 4 mL of the samples [20,21]. IT-SPME is a form of SPME, which typically uses a GC capillary column with a proper coating to extract the analytes. In addition, reliability for the determination of DEHP in water samples has been outlined in a recent paper [18]. Contamination during the analysis is a problem commonly encountered in the determination of phthalates at trace levels, resulting in false positive or overestimated results, especially in GC based methods [22,23]. Sample preparation should be as simple as possible to minimize the risk of contamination. Ideally, the employment of extraction solvents, plastics and glassware should be avoided. Liquid chromatographic methods could reduce contamination problems integrating on-line sample processing. With respect to this logic, in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) may be advantageous because sample manipulation can be reduced to a minimum. The employment of the extractive column as the loop of an injection valve (in-valve IT-SPME) can be very useful for the enrichment of organic pollutants. This is due to the fact that when a large volume of sample is passed through the extractive capillary, the analyte is concentrated into the coating.

* Corresponding author. Tel.: +34 963543002; fax: +34 963544436.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

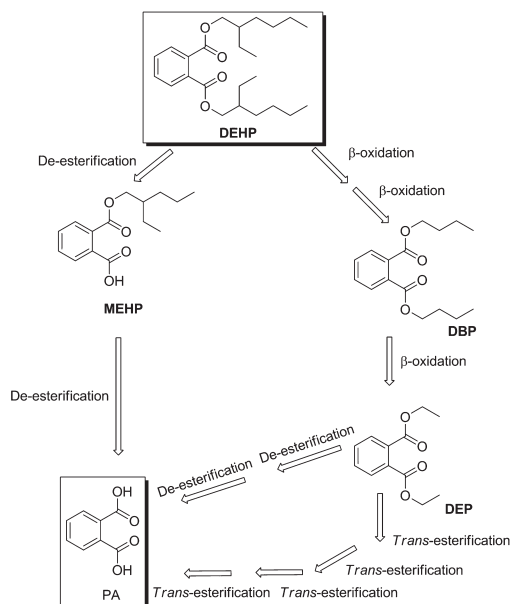


Fig. 1. DEHP biodegradation pathways to obtain phthalates as MEHP, DBP and DEP.

In the present study we have evaluated the possibility of extending the IT-SPME-Cap LC approach to other dialkyl phthalate esters: DEP and DBP, which often are found in waters as degradation product of DEHP and also including the monoalkyl phthalate MEHP. It is proved that acidification of the whole samples was necessary for achieving satisfactory detection limit for MEHP. The main advantages are speed and the reduction of background signal by minimizing sample preparation

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All reagents were of analytical grade. DEHP (99%), DEP (99%) and DBP (99.5%) were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany); MEHP (91%) was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Germany). Acetonitrile HPLC grade was purchased from Romil (Cambridge, UK). Hydrochloric acid (37%) was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain).

Stock standard solutions of the analytes (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were prepared in acetonitrile. Working solutions were prepared by dilution of the stock solutions with water. All solutions were stored in the dark at 4 °C.

2.2. Apparatus and chromatographic conditions

The capillary chromatographic system used consisted of a binary LC capillary pump (Agilent 100 Series, Waldbronn, Germany) and a UV-vis diode array detector (Agilent 1200 series,) equipped with a 80 nL flow cell. The analytical signal was recorded from 190 to 400 nm, and the chromatograms were monitored at 230 nm. The detector was linked to a data system (Agilent, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation.

For the chromatographic separation, an Onyx Monolithic C_{18} column (150 mm \times 0.2 mm i.d.) from Phenomenex (Torrance, CA,

USA) was used. The mobile-phase was a mixture of acetonitrile/water. In the optimized procedure the initial composition of the mobile phase was acetonitrile-water 30:70 (v/v). The acetonitrile content was linearly increased to reach 100% at min 15. Then, the mobile-phase composition was changed to acetonitrile-water 70:30 (v/v) from 25 min until the end of the run. The mobile phase flow rate was 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

All solvents were filtered through 0.45 mm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) before use.

2.3. In-tube SPME procedure

For the in-tube SPME procedure, the stainless steel injection loop of a conventional injection valve was replaced by a GC TRB-5 capillary column (Teknokroma) of 40 cm length and 0.32 mm i.d., coated with 5% diphenyl-95% polydimethylsiloxane (3 μm coating thickness). Capillary connections to the valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing and 1/16 in PEEK nuts and ferrules (Teknokroma).

Aliquots of 4 mL of acidified samples at pH = 3 with hydrochloric acid (1 mM), were manually loaded in the extractive column of the IT-SPME device by means of a 1-mL precision syringe (Hamilton, Bonaduz, Switzerland). After sample loading, 50 μL of 1 mM HCl (unless otherwise stated) were flushed through the capillary in order to remove the solution remaining in it (the inner volume of the capillary column was c.a. 32 μL). Finally, the injection valve was manually rotated, so the analytes were desorbed in dynamic mode from the coating of the extractive capillary with the mobile-phase, and sent to the analytical capillary column for separation and detection.

All the experiments were carried out in duplicate and at room temperature.

2.4. Analysis of real water samples

Water samples used in the present study were collected along the coast of the Comunidad Valenciana region (Spain). Washing samples used were obtained by circulating nanopure water through plastic tubings. The samples were stored in dark in brown glass flasks at 4 °C until analysis. Aliquots of 4 mL of the acidified samples were loaded in the IT-SPME and processed as described above. All samples were analyzed in duplicate and at room temperature.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation

According to previous studies, the volume of standard solutions processed into the IT-SPME device was 4.0 mL [18]. Different gradient elution programs of acetonitrile/water (see Section 2 for optimum), changes in the pH of the samples and several cleaning solvents before the transfer step to the analytical column, were assayed. Satisfactory results were obtained by acidifying the samples at pH 3 for MEHP ($\text{pK}_a = 3.08$) as the inset of Fig. 2 shows. 50 μL of acidified nanopure water was employed as cleaning solvent chromatograms obtained for a blank (4 mL of nanopure water acidified to pH 3.0) and for standard solutions of the analytes are given in Fig. 2. Under the proposed conditions DBP eluted close to some unknown compounds present in water samples (around 16.7 min), although DBP can be identified through its UV spectra as can be seen in Fig. 2.

3.2. Analytical performance

Table 1 shows relevant analytical parameters of the proposed method. The following criteria for linearity range were applied:

Table 1
Analytical data for the determination of phthalates in water.

Analyte	Linear range ($\mu\text{g/L}$)	Linearity, $y = a + bx$ ($n = 5$)			Reproducibility ($n = 3$) ^a		LOD ($\mu\text{g/L}$)	Recovery ^b (%) ($n = 3$)
		$a \pm S_a$	$b \pm S_b$	R^2	Intraday CV (%)	Interday CV (%)		
MEHP	0.015–50.0	3 ± 1	63 ± 5	0.990	9	12	0.005	95 ± 4
DEP	0.3–25.0	-2 ± 4	11.4 ± 1.0	0.98	6	12	0.1	100 ± 5
DBP	4.5–50.0	130 ± 230	286 ± 10	0.997	4	2	1.5	103 ± 7
DEHP	0.3–50.0	1 ± 1	21 ± 1	0.990	4	20	0.1	96 ± 9

^a Calculated at a concentration 1.0 $\mu\text{g/L}$, except to DBP 10 $\mu\text{g/L}$.

^b Calculated from real samples spiked with the analytes at a concentration 1.0 $\mu\text{g/L}$, except to DBP 10 $\mu\text{g/L}$.

linear regression through zero with a correlation coefficient better than 0.99 and bias from the calibration line less than 15% for all individual calibration points. Satisfactory linearity within the tested concentration intervals was achieved. The precision was also suitable, with intra- and inter-day relative standard deviations <9% and <20%, respectively ($n = 3$).

The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) were calculated experimentally from solutions containing concentrations providing signal/noise ratios of 3 and 10, respectively, except for DEHP. The LOD and LOQ for DEHP were established as the concentrations that provided a peak height of three times and ten times, respectively the mean peak height of DEHP in blanks due to its ubiquitous condition. The values obtained are listed in Table 1 (LOQs are the lower values of the linear interval). As observed in this table, the LOD found for DBP was significantly higher than those found for the other analytes, which can be explained by the presence of background peaks close to the peak of this compound. Satisfactory LODs and LOQs were obtained [8,11,19,25].

3.3. Application to real samples

The analysis of sea and transition waters, collected at different points along the coast of the Comunidad Valencia area (Spain), showed that DEHP was the compound most commonly found. DEP was also found in some of the samples analyzed. As an example, the chromatograms corresponding to some of the samples analyzed are shown in Fig. 3; the spectra for identifying analytes were included too. The presence of the analytes in those samples was confirmed by matching the spectra of the peak corresponding to

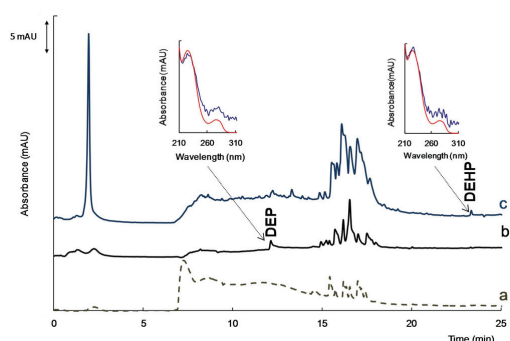


Fig. 3. Chromatograms obtained under optimized conditions for some of the real samples analyzed. For other details, see the text.

the suspected analytes and those obtained from standard solutions of DEP and DEHP in the library. The concentrations of the analytes in such samples were 1.8 and 0.4 $\mu\text{g/L}$ for DEP and DEHP, respectively.

Washing waters were processed in a flow injection manifold using conventional plastic tubings and a peristaltic pump. In all samples obtained after a unique water circulation, DEP and MEHP were detected (Fig. 4). In samples obtained after re-circulated water by closing the circuit, also DEHP was found. The DEHP migration depended mainly on the number of times that washing water passed through the tubing. Therefore, water recirculated in shorter tubings during the same time than that used in longer tubings produced more DEHP migration, and also MEHP and DEP (see Fig. 4).

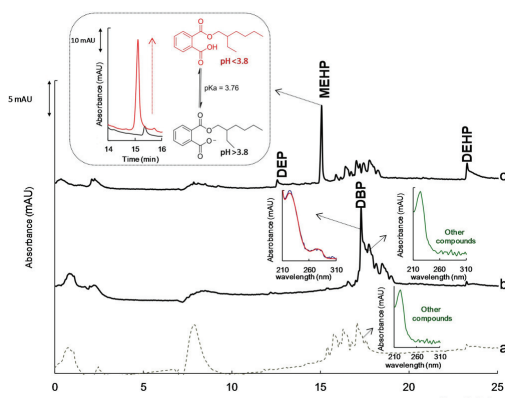


Fig. 2. Chromatograms obtained under optimized conditions for: (a) a blank (nanopure water acidified to pH 3.0), (b) a standard solution containing 10.0 $\mu\text{g/L}$ of DBP, and (c) a standard solution containing DEP, MEHP and DEHP (1.0 $\mu\text{g/L}$ each); the inset shows the chromatographic peak obtained for MEHP in water and in acidified water at pH = 3. For other details, see the text.

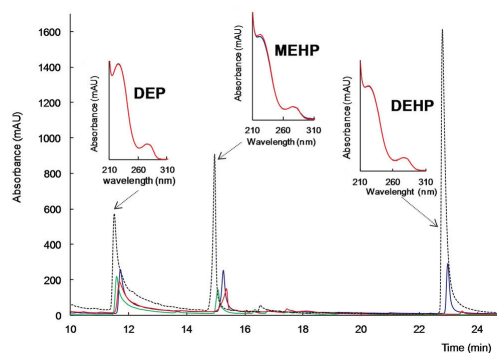


Fig. 4. Chromatograms obtained under optimized conditions for washing water and washing water recirculated in a system with short and long plastic tubing. Water circulated in short tubing (in green) in long tubing (in red) and water recirculated during 1 h in short tubing (in blue) and in long tubings (in black). For other details, see the text. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

Recovery studies were carried out by spiking some of the tested samples, in which the concentration of DEHP was below its LOD, with known amounts of the analytes. In all instances, recovery values of about 100% (Table 1) were obtained, thus indicating the absence of matrix effect. On the other hand, the LODs found for real samples were the same than those achieved for standard solutions.

4. Conclusions

This study has shown that the on-line IT-SPME-Cap LC-DAD methodology can be applied to the determination of dialkyl and monoalkyl phthalates, in spite of the wide range of their polarity (the log K_{ow} of the compounds tested varied from 2.5 to 7.5). This paper also demonstrated the possibility of extending the IT-SPME-Cap LC to DEHP degradation products such as DBP, DEP and MEHP, which is of special interest to establish the mechanisms of degradation, and bioaccumulation in the aquatic environment (3). The sensitivity of proposed methodology is comparable to that reported by other methods which involve microextraction [16,24,26–30]. The LODs are also comparable to those achieved by methods using LLE or SPE followed by solvent evaporation [8,11,19,25]. These literature procedures include more steps or/and they are more time-consuming than that proposed in this paper.

The main advantages of the proposed procedure are simplicity and rapidity (30 min), because sample treatment is reduced to a minimum (pH adjustment). Acidified samples are directly introduced in the IT-SPME capillary LC (not even filtration). This avoids the contact of the sample with glassware and plastic materials (for example extraction cartridges used in SPE methods). The method also avoids the employment of organic solvents and evaporation steps. No solvents other than those required for the capillary chromatographic step are necessary. Therefore, the proposed method is cost effective and environmental friendly, and the risk of contamination during sample treatment is reduced to a minimum. No matrix effect was found in contrast with in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry [31].

In the present study more than one hundred real samples were processed without observing deterioration in the stability of the extractive device. Therefore, the proposed method can be considered a reliable alternative for monitoring analysis of DEHP and their main degradation products in environmental waters.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (project CTQ2011-26760) and to The Government

of the Generalitat Valenciana (ACOMP/2013/155) for the financial support received.

References

- [1] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy.
- [2] EPA US, National Primary Drinking Water Regulations: Federal Register, Part 12, 40 CFR Part 141, US Environmental Protection Agency, 1991.
- [3] D.-W. Liang, T. Zhang, H.H.P. Fang, J. He, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (2008) 183.
- [4] O. Horn, S. Nalli, D. Cooper, J. Nicell, *Water Res.* 38 (2004) 3693.
- [5] S. Barnabé, I. Beauchesne, D.G. Cooper, J.A. Nicell, *Water Res.* 42 (2008) 153.
- [6] Y. Guo, H. Alomirah, H.-S. Cho, T.B. Minh, M.A. Mohd, H. Nakata, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 3138.
- [7] K. Inoue, M. Kawaguchi, F. Okada, Y. Yoshimura, H. Nakazawa, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 527.
- [8] S. Jonsson, J. Ejlertsson, A. Ledin, I. Mersiwsky, B.H. Svensson, *Water Res.* 37 (2003) 609.
- [9] S. Keresztosa, E. Tatára, Z. Czégényb, G. Záraya, V.G. Mihucz, *Sci. Tot. Environ.* 468–470 (2013) 451.
- [10] P. Roslev, K. Vorkamp, J. Aarup, K. Frederikse, P.H. Nielsen, *Water Res.* 41 (2007) 969.
- [11] M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, *Anal. Chim. Acta* 728 (2012) 31.
- [12] K. Luks-Betlej, P. Popp, B. Janoszka, H. Paschke, *J. Chromatogr. A* 978 (2001) 93.
- [13] P. Seródio, J.M.F. Nogueira, *Water Res.* 40 (2006) 2572.
- [14] P.-C. Huang, C.-J. Tien, Y.-M. Sun, C.-Y. Hsieh, C.-C. Lee, *Chemosphere* 73 (2008) 539.
- [15] H. Farahani, P. Norouzi, R. Dinarvand, M.R. Ganjali, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 105.
- [16] Y.-B. Luo, Q.-W. Yu, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, *Talanta* 90 (2012) 123.
- [17] J. Yao, H. Xu, L. Lu, D. Song, Y. Cui, T. Zhang, Y.-Q. Feng, *Anal. Chim. Acta* 616 (2008) 42.
- [18] M. Muñoz-Ortuño, Y. Moliner-Martínez, S. Cogollos-Costa, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1260 (2012) 169.
- [19] R. Céspedes, S. Lacorte, A. Ginebreda, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 992.
- [20] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2695.
- [21] Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6556.
- [22] A. Frankhauser-Noti, K. Grob, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 353.
- [23] M. Marega, K. Grob, S. Moret, L. Conte, *J. Chromatogr. A* 1273 (2013) 105.
- [24] J.D. Blair, M.G. Ikonoum, B.C. Kelly, B. Surridge, F.A.P.C. Gobas, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6262.
- [25] A.D. LaFleur, K.A. Schug, *Anal. Chim. Acta* 696 (2011) 6.
- [26] H. Farahani, M.R. Ganjali, R. Dinarvand, P. Norouzi, *Talanta* 76 (2008) 718.
- [27] L. Guo, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 24.
- [28] X. Li, M. Zhong, S. Xu, C. Sun, *J. Chromatogr. A* 1135 (2006) 101.
- [29] C. Cháfer-Pericás, P. Campíns-Falcó, M.C. Prieto-Blanco, *Anal. Chim. Acta* 610 (2008) 268.
- [30] M.H. Banitaba, S.S.H. Davarani, A. Pourahadi, *J. Chromatogr. A* 1283 (2013) 1.
- [31] A. Masiá, Y. Moliner-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Pico, P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* 1306 (2013) 1.

Development of a polydimethylsiloxane–thymol/nitroprusside composite based sensor involving thymol derivatization for ammonium monitoring in water samples

Science of the Total Environment 2015, 503–504, 105–112



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Development of a polydimethylsiloxane–thymol/nitroprusside composite based sensor involving thymol derivatization for ammonium monitoring in water samples



M.C. Prieto-Blanco^a, N. Jornet-Martínez^b, Y. Moliner-Martínez^b, C. Molins-Lagua^b, R. Herráez-Hernández^b, J. Verdú Andrés^b, P. Campins-Falcó^{b,*}

^a Grupo QANAP, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña, Campus de A Coruña, 15071 A Coruña, Spain

^b Departamento de Química Analítica Grupo MINTOTA, Facultad de Química, Universidad de Valencia, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

HIGHLIGHTS

- PDMS-thymol/nitroprusside composite is a new delivery composite for NH_4^+ estimation
- PDMS-thymol/nitroprusside composite is based on thymol derivatization reaction
- PDMS- NH_4^+ sensor allows NH_4^+ qualitative and quantitative monitoring in waters
- PDMS- NH_4^+ sensor simplifies the measurements and avoids hazardous reagent preparation
- Comparison of the PDMS- NH_4^+ sensor with well-established NH_4^+ determination methods

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 April 2014

Received in revised form 20 June 2014

Accepted 20 July 2014

Available online 10 August 2014

Keyword:

Ammonium sensor
Thymol derivatization
Delivery PDMS composite
Water samples

ABSTRACT

This report describes a polydimethylsiloxane (PDMS)-thymol/nitroprusside delivery composite sensor for direct monitoring of ammonium in environmental water samples. The sensor is based on a PDMS support that contains the Berthelot's reaction reagents. To prepare the PDMS-thymol/nitroprusside composite discs, thymol and nitroprusside have been encapsulated in the PDMS matrix, forming a reagent release support which significantly simplifies the analytical measurements, since it avoids the need to prepare derivatizing reagents and sample handling is reduced to the sampling step. When, the PDMS-thymol/nitroprusside composite was introduced in water samples spontaneous release of the chromophore and catalyst was produced, and the derivatization reaction took place to form the indothymol blue. Thus, qualitative analysis of NH_4^+ could be carried out by visual inspection, but also, it can be quantified by measuring the absorbance at 690 nm. These portable devices provided good sensitivity ($\text{LOD} < 0.4 \text{ mg L}^{-1}$) and reproducibility ($\text{RSD} < 10\%$) for the rapid detection of ammonium. The PDMS- NH_4^+ sensor has been successfully applied to determine ammonium in water samples and in the aqueous extracts of particulate matter PM_{10} samples. Moreover, the reliability of the method for qualitative analysis has been demonstrated. Finally, the advantages of the PDMS- NH_4^+ sensor have been examined by comparing some analytical and complementary characteristics with the properties of well-established ammonium determination methods.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Deterioration of water quality in the last century has been shown in the increase of nitrogen loading into water bodies, one major stressor on water quality (Zimmerman et al., 2008). Amongst the N inputs into water, ammonium plays a very important role and is a good indicator of the status of water quality (European Directive, 1998, 1991), since high concentration of ammonium can be linked to external discharges into aquatic system, mainly from agriculture, industrial effluents and

urban sewages (Badr et al., 2003). NH_4^+ as well as NH_3 can be found in environmental waters, and the existence of either specie depends on parameters such as pH, salinity and temperature. The eutrophying power of NH_4^+ and NH_3 is well-known, but also they can be considered precursors of greenhouse gases (GHG), since nitrification and denitrification lead to the formation of N_2O (Barrancos et al., 2013; Li et al., 2013; Saggar et al., 2013). Therefore, monitoring data of NH_4^+ and NH_3 are important not only for the assessment of water quality but also to global warming and climate change.

Ammonium is also present as ammonium nitrate and ammonium sulphate in the atmospheric particulate matter (PM). Its determination is used to assess the secondary inorganic aerosol (SIA), one of the major

* Corresponding author. Tel.: +34 96 354 3002; fax: +34 96 354 3447.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campins-Falcó).

components of PM and mainly originated from the anthropogenic sources (traffic, energy production and agricultural emissions). Aspects of PM widely studied as the impact on the climate, building materials, visibility reduction and adverse health effects have been directly related with its composition (Alestuey et al., 2004).

Measurement of ammonium level in water samples is an important parameter in environmental monitoring (Piñeiro Di Blasi et al., 2013). Therefore, there is a growing demand to develop monitoring systems for ammonium determination. One of the most usual analytical methods is based on the derivatization reaction with thymol to form indophenol/indothymol blue and the subsequent colorimetric measurements (Moliner-Martinez et al., 2005). Although, this methodology provides good results in terms of sensitivity and selectivity, the derivatizing reagents (phenol or thymol and nitroprusside) are highly toxic. On the other hand, Berthelot's derivatization reaction for determining ammonium is a complex reaction and involves two steps. Fig. 1 shows the reaction scheme. In a first step samples are treated with thymol and an oxidizing agent, normally a hypochlorite, with a suitable catalyst (acetone, manganese sulphate or sodium nitroprusside). Ammonium ion reacts with hypochlorite to form monochloramines. In a second step, the generated imine reacts with thymol to form indothymol blue, which absorbance maximum can be found in the range of 630–720 nm (Aminot et al., 1997; Lau et al., 2004). Therefore, the on-site implementation of this methodology cannot be easily carried out, property especially interesting in ammonium monitoring campaigns.

In response to the abovementioned challenges, a potential alternative can be polymer-attached reagents (Campins-Falcó et al., 2013). These polymers can be considered delivery systems for analyte derivatization and subsequent determination. In this methodology, the derivatizing reagents are immobilized on the polymeric matrix, in contact with the samples, the reagents are released and the formation of the derivatives in solution is promoted (Kunz et al., 2003), leading to a single-step analysis, since no reagents are needed and sample handling is completely reduced. Additionally, other approaches have been reported with the aim to solve abovementioned drawbacks (Henríquez et al., 2014; Dubas and Pimpan, 2008; Duong and Rhee, 2014; Nuñez et al., 2013), in accordance with the need to develop analytical methodologies with environmental friendly processes, such as minimization of solvent consumption and use of toxic reagents.

Herein, the present work reports a polydimethylsiloxane (PDMS)-thymol/nitroprusside delivery composite to its application for ammonium monitoring in water samples and aqueous extracts of PM₁₀. The aim of this work was to improve the toxicity, portability and rapidness of the typically used indothymol based derivatization method. For this aim, we have used PDMS owing to its advantageous properties as polymeric matrix such as optically clear, hydrophobic, non-toxic and chemically inert; thus, it can be used to encapsulate several compounds

(Campins-Falcó et al., 2013; Jo and Guldiken, 2014). Moreover, PDMS as sensing phase for sensors based on spectroscopic techniques have been previously reported (Seethapathy and Gorecki, 2012; Albuquerque et al., 2005). In this case thymol and nitroprusside have been successfully entrapped inside the PDMS matrix. Ammonium monitoring with the proposed device can be carried out by measuring the absorbance of the derivative at 690 nm or simply by naked eye. This new PDMS-thymol/nitroprusside delivery composite can be a promising tool to develop on site ammonium sensor for monitoring programmes in water and air.

2. Materials and methods

2.1. Instruments

For UV–vis measurements a HP-8453 UV–vis spectrophotometer from Hewlett Packard (USA) furnished with 1-cm path length quartz microcell was employed. Absorption spectra were registered from 190 to 900 nm.

2.2. Reagents and solutions

Thymol was purchased from Riedel-de Haen (Germany). Sodium hypochlorite, nitroprusside and sodium hydrogen carbonate were obtained from Probus (Spain). Sylgard 184 silicon elastomer and Sylgard 184 silicon elastomer curing agent were purchased from Dow Corning (USA).

Thymol solution was prepared by dissolving the adequate amount of the solid reagent in acetone.

2.3. Preparation of the PDMS–thymol composites

PDMS composites with different compositions were tested (Campins-Falcó et al., 2013). PDMS–thymol composites were synthesized by mixing 3 g of silicon elastomer, 400 µL of thymol in acetone and 0.3 g of curing agent. PDMS–thymol/NaOH composites were prepared by mixing 3 g of silicon elastomer, 400 µL of thymol in acetone, and 80 and 250 µL NaOH 1 M and 0.3 g of curing agent. PDMS–thymol/nitroprusside composites were formed by mixing 3 g of silicon elastomer, with 400 µL of thymol in acetone, 26 mg of pulverized nitroprusside and 0.3 g of curing agent.

In all cases, the mixtures were vigorously stirred during 40 min. The individual PDMS composites were formed weighting 0.2 g of the mixture in a well polystyrene plate (d = 1 cm). Finally, they were cured at room temperature during 2 days.

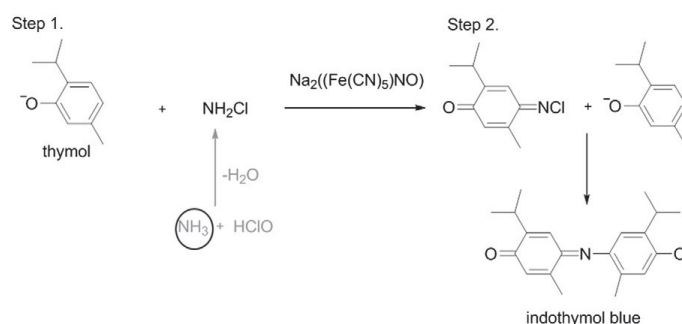


Fig. 1. Schematic diagram of Berthelot's reaction.

2.4. Ammonium derivatization and measurement procedures

2.4.1. Solution derivatization

500 μL of ammonium working standard solutions at concentrations ranging from 0.25 to 10 mg L^{-1} was mixed with 40 μL of carbonate buffer 0.05 M, 5 μL of sodium hypochlorite 1.25% and 20 μL of sodium nitroprusside 0.1 M. The mixture was stirred during 1 min and then, 100 μL of thymol (0.8 M) in NaOH (2 M) was added. After 5 min (reaction time), the absorbance spectra were registered.

2.4.2. PDMS–thymol composites

500 μL of ammonium working standard solutions or samples was mixed with 40 μL of carbonate buffer, 5 μL of sodium hypochlorite (1.25%) and 20 μL of sodium nitroprusside. The mixture was stirred for 1 min to form the chloramine. Then, half a disc of PDMS–thymol composite (9.7 μmol), cut in six pieces (approximated area 6.5 mm^2) to facilitate the diffusion of the embedded reagent from the PDMS matrix to the solution, was immersed into the standard/sample solution. Finally, 20 μL of NaOH (2 M) was added. The absorbance of the derivatized standard or sample solutions was measured after 5 min.

2.4.3. PDMS–thymol/NaOH composites

Chloramine formation was carried out following the procedure described in Section 2.4.2. In a second step, half a disc of PDMS–thymol (9.7 μmol)/NaOH (7.6 μmol) was used as sensing phase following the procedure described in Section 2.4.2. In this case, the reaction time was 20 min.

2.4.4. PDMS–thymol/nitroprusside composites

500 μL of ammonium working standard solutions or sample was mixed with 40 μL of carbonate buffer and 5 μL of sodium hypochlorite (1.25%). The mixture was stirred during 1 min. Then, half a disc of PDMS–thymol (9.7 μmol)–nitroprusside (2.6 μmol) composite (cut in six pieces, see Section 2.4.2) was placed into the standard/sample solution and 20 μL of NaOH (2 M) was added. The absorbance of the solution was also registered after 5 min.

A simplified procedure was finally proposed, where 500 μL of ammonium working standard solution or sample and 20 μL of solution containing sodium hypochlorite (1.25%) and NaOH (1 M) were mixed and stirred during 1 min. Then, the PDMS–thymol (9.7 μmol)/nitroprusside (2.6 μmol) was placed into the standard/sample solution following the same procedure than that described in Section 2.4.2. The reaction time was also 5 min.

2.5. Determination of false positives and false negatives

The study of the binary YES/NO response of the proposed sensor for qualitative analysis was carried out using a drinking water in order to assure a low concentration level of ammonium. The relative proportion of false positives and false negatives was determined analysing 10 spiked water samples at concentration in the range of 0.1–1.5 mg L^{-1} (Simonet et al., 2004). The binary responses YES/NO were obtained by visual inspection of the vials (yellow solution: negative response and green solution: positive response) and confirmed by measuring the absorbance. Absorbances lower than the value obtained for the LOD were assigned to negative and absorbance values higher than the value obtained for the LOD were assigned to positive response.

2.6. Analysis of environmental samples

Ammonium was monitored in several water samples (Region of Valencia) following the above-mentioned procedure. Samples were collected in dark glass containers and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ until analysis. If necessary, adequate dilution of samples was carried out.

The PM_{10} sample was collected over a 24 h period in one site of industrial typology in A Coruña-Galicia (North-western Spain) by an EN-12341

reference high volume sampler on quartz fibre filters of 420 cm^2 . A portion of filter (24 cm^2) was twice ultrasonically extracted with 10 mL nano-pure water for 15 min. The two extracted portions were diluted to 50 mL. The proposed procedure using PDMS composites was applied to determine the ammonium concentration in the aqueous extract of PM_{10} .

3. Results and discussion

3.1. Study of solution derivatization using low sample volumes

Firstly, the solution derivatization procedure was examined in order to optimize sample volume, and then to compare the results with those obtained using PDMS composites. The use of low sample volumes is more favourable for the diffusion of the reagents from PDMS to the solution. Moreover, minimization of reagent consumption can be achieved. Preliminary assays were performed according to Moliner-Martinez et al. (2005). The response of ammonium at concentrations up to 10 mg L^{-1} was tested in the solution reducing four times the initial sample volume (from 2 mL to 0.5 mL). Reduction of the hypochlorite concentration from 5% to 1.25% was needed in order to achieve a better defined band around 690 nm. Table 1a presents some analytical parameters calculated for both procedures. The statistical comparison of the slopes for these lines is given in Table 1b (significance level, 95%) (Massart et al., 1997; Andrade and Estévez-Pérez, 2014). The results indicated that the calibration curves for the two sample volumes tested were statistically comparable at 95%. Therefore, sample volumes can be reduced without loss in sensitivity.

3.2. Study of PDMS composites for ammonium monitoring purposes

PDMS is a hydrophobic polymer, where organic reagents, such as thymol, can be attached. At the same time, this reagent can be delivered to a solution under the adequate conditions to provide the analytical response in the presence of the target analyte, NH_4^+ . In this case the blue colour owing to the formation of indothymol blue. Thus, in a first study we investigated the possibility to attach the Berthelot's reactions reagents into a PDMS matrix. For this aim, several PDMS disc compositions were studied (see Section 2.4). In all cases, gelation of the PDMS composite was achieved. Fig. 2 shows the photographs of the PDMS composites after trapping the derivatizing reagents. We also evaluated the possibility to entrap thymol, nitroprusside and NaOH and thymol, nitroprusside and hypochlorite in the same composite; however, in both cases an adequate densification of the gel was not reached.

In the first experiment, thymol was embedded into the PDMS disc (see Material and methods section). PDMS composites were prepared containing 19.4 μmol thymol/disc. Acetone was selected to dissolve thymol with a dual objective, on one hand an adequate gelation of the PDMS and on the other hand as a catalyst of the Berthelot's reaction. Following the procedure described in Section 2.4.2, the derivatization reaction took place and the indothymol blue derivate was observed after adding NaOH (20 μL , 2 M), owing to the dissociate form of the indothymol compound (Searle, 1984). These results indicated that 9.7 μmol thymol/disc was sufficient to observe the development of the indothymol blue derivate in 5 min with similar sensitivity than that obtained with the conventional solution derivatization method (see Tables 1a and 1b). Therefore, we concluded that thymol could be successfully embedded into the PDMS matrix, and in contact with monochloramine gave rise to the indothymol reaction, with similar response to that obtained by using a thymol solution. This means that successful diffusion of thymol from the PDMS support was achieved. However, further improvement on this device was still needed.

In a second study, the introduction of NaOH (1 M) prepared in ethanol/water into PDMS was tested. PDMS composites containing thymol (9.7 μmol /dosage) and different concentrations of NaOH (2.4 and 7.6 μmol /dosage) were prepared without gelation

Table 1a
Comparison of the figures of merit obtained with the PDMS–thymol composites and solution derivatization.

		n	$b_0 \pm s_{b_0}$	$b_1 \pm s_{b_1} \text{ (mg}^{-1} \text{ L)}$	s_{yx}	R
Sample volume (mL)	Solution derivatization					
	2	5	0.044 ± 0.008	0.206 ± 0.007	0.011	0.99804
	0.5	6	0.03 ± 0.02	0.181 ± 0.005	0.04	0.99861
	PDMS composites					
	Thymol	7	0.05 ± 0.03	0.187 ± 0.007	0.06	0.99638
	Thymol + NaOH	5	0.054 ± 0.012	0.1253 ± 0.0018	0.019	0.99967
	Thymol + nitroprusside	4	0.04 ± 0.02	0.180 ± 0.004	0.03	0.99940
	PDMS composites with the simplified protocol					
	Thymol + nitroprusside	4	0.04 ± 0.03	0.224 ± 0.012	0.04	0.99719

problems. Monochloramine formation was also performed in the solution (see Section 2.4.2). Indothymol formation using this PDMS composite with thymol (9.7 $\mu\text{mol/dosage}$) and NaOH (2.4 $\mu\text{mol/dosage}$) was only initiated if an additional amount of NaOH was added to the solution, probably because the basicity of the reaction medium was not enough to form the indothymol blue derivate. At higher NaOH concentrations in the PDMS composite (7.6 $\mu\text{mol/dosage}$), the indothymol derivate was spontaneously observed. Fig. 3 shows the variation of the analytical response as function of time when using the PDMS–thymol/NaOH composite. Reaction kinetic was slower than the kinetic of the PDMS–thymol composite and the solution derivatization procedure. Therefore, the sensitivity reached with the PDMS–thymol/NaOH composite at 5 min was also lower (Tables 1a and 1b). As can be seen in Fig. 3, the maximum analytical response was achieved at a higher response time (20 min) compared with the PDMS–thymol composite and with solution derivatization (5 min).

In the aforementioned PDMS discs, addition of nitroprusside to the ammonium solution was necessary, since this compound is an effective catalyst. Therefore, we evaluated PDMS–thymol/nitroprusside composites. Pulverized sodium nitroprusside (2.6 $\mu\text{mol/dosage}$) and thymol (9.7 $\mu\text{mol/dosage}$) were successfully embedded into the PDMS support. The addition of nitroprusside to the PDMS matrix resulted in a homogeneous and slightly coloured composite (see Fig. 2). In this case, the monochloramine formation was performed in solution without the presence of sodium nitroprusside which, together with thymol, was released from the PDMS composite to derivatize ammonium. Finally, NaOH was added to solution to provide the basic medium. The maximum analytical response with this composite was achieved at 5 min (see Fig. 3). Moreover, the sensitivity was statistically comparable to that obtained with the conventional solution derivatization method (see Tables 1a and 1b). Therefore, these results proved that thymol and nitroprusside can be successfully embedded in the PDMS matrix to form the derivatization reagents release support since satisfactory diffusion of both reagents was produced in aqueous medium.

In order to simplify this last procedure, a single solution containing NaOCl (1.25%) and NaOH (1 M) [NaOCl–NaOH] combined with PDMS–thymol/nitroprusside composite was optimized. The formation of chloramines was carried out with the basic medium provided by NaOH. A volume of 20 μL [NaOCl–NaOH] solution provided the maximum sensitivity. Using the PDMS–thymol/nitroprusside composite and this simplified procedure, the reaction kinetic showed that a 90% of the maximum response was achieved at 5 min. Fig. 3 compares the

kinetics of the indothymol reaction when using the PDMS–thymol/NaOH composite and the PDMS–thymol/nitroprusside composite and Fig. 4 compares the spectra at different ammonium concentrations. As can be seen, better performance was achieved with the PDMS–thymol/nitroprusside composite. In addition the PDMS–thymol/nitroprusside composites with simplified protocol provided higher sensitivity than solution derivatization with 0.5 mL or the other PDMS composites (see Tables 1a and 1b). Then, the measurement with the PDMS NH_4^+ sensor comprises a vial with 20 μL of [NaOCl–NaOH] and the PDMS–thymol/nitroprusside composite. Detection is carried out by simply addition of the sample and composite inside the vial. The ammonium level can be followed by UV–vis spectroscopy (typical indothymol blue band at 690 nm) and can be visually detected due to the colour change from yellow (negative response) to green (positive response) (see Fig. 4). Thus, the proposed sensor can be a powerful tool for on site monitoring of ammonium since instrumentation is not needed. In addition, the proposed device reduced the need to manipulate hazardous reagent such as thymol and nitroprusside.

3.3. Analytical parameters

Table 1 shows the calibration equations calculated for each PDMS composite in the working range of 0–10 mg L^{-1} except for the simplified procedure (0–5 mg L^{-1}) and compares the results with the results obtained with the conventional solution procedure. Good linearity was achieved in all cases. The analytical data show that PDMS–thymol/NaOH composite was the methodology with the lower sensitivity (all the comparisons provided not equal slopes with the rest of the methods) and the PDMS–thymol/nitroprusside composite with the simplified procedure provided higher sensitivity than solution derivatization with 0.5 mL or the other PDMS composites (see Tables 1a and 1b).

These results indicated that PDMS–thymol/nitroprusside composite was clearly advantageous as a portable ammonium sensor for monitoring campaigns bearing in mind that thymol and nitroprusside are embedded into the PDMS matrix, the response time and also sensitivity.

Satisfactory detection limit (LOD), calculated as the concentration that provided a signal-to-noise ratio of 3, and quantification limit (LOQ) were also reached with the proposed PDMS– NH_4^+ sensor. The LOD and LOQ values were 0.4 mg L^{-1} and 0.7 mg L^{-1} , respectively. These values were adequate for ammonium monitoring in environmental waters samples and wastewaters samples (Directive 1998/83/CE; Directive 1991/127/CE). Moreover, aqueous extracts of PM_{10} can be also analysed.

Table 1b
Statistical comparison of slopes obtained with the PDMS–thymol composites and solution derivatization (significance level, 95%).

	Solution derivatization, 2 mL	Solution derivatization, 0.5 mL	PDMS composites: thymol	PDMS composites: thymol + NaOH	PDMS composites: thymol + nitroprusside
Solution derivatization, 0.5 mL	Equal slopes ^a	–	–	–	–
PDMS composites: thymol	Equal slopes ^a	Equal slopes	–	–	–
PDMS composites: thymol + NaOH	Not equal slopes	Not equal slopes	Not equal slopes ^a	–	–
PDMS composites: thymol + nitroprusside	Equal slopes ^a	Equal slopes	Equal slopes	Not equal slopes	–
PDMS composites with simplified protocol: thymol + nitroprusside	Equal slopes ^a	Not equal slopes	Equal slopes	Not equal slopes	Not equal slopes

^a Variances not homogeneous for s_{yx} for a significance level of 95%.

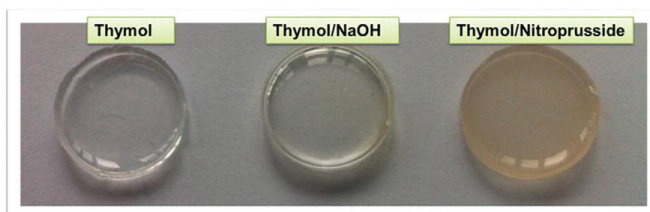


Fig. 2. Photographs of the PDMS composites.

The reproducibility of the sensors was evaluated at two concentration levels (1 and 3 mg L⁻¹). Interday and intraday relative standard deviations (%RSD) were calculated using sensors synthesized in the same batch. The intraday RSD at 1 and 3 mg L⁻¹ were 5.4 and 5.0% ($n = 3$), respectively. The interday RSD values were 7.6 and 6.0% for 1 and 3 mg L⁻¹ ($n = 6$), respectively. These results indicated satisfactory %RSD values independently of the concentration level. In addition, a batch-to batch reproducibility study was performed. For this aim, we compared the response of the sensor obtained with six sensors prepared in six different batches under identical conditions. The batch-to-batch RSD values were 8.7 and 8% for 1 and 3 mg L⁻¹, respectively. The low RSD values bear evidence to the fact that the proposed sensors are reproducible devices for their practical application. On the other hand, the experimental design includes the division of the composites (Material and methods section) in order to facilitate the diffusion of the embedded reagents from the PDMS matrix to the solution. It should be noted that the dimensions of these divisions are not key parameter since batch-to-batch reproducibility is not influenced by these parameter. RSD values obtained for six homogeneous divisions of the composite and for six not homogeneous divisions ($[\text{NH}_4^+] = 1 \text{ mg L}^{-1}$, $n = 3$) were lower than 9%.

In addition, PDMS–thymol/nitroprusside composites were stable during almost 12 months at room temperature since their analytical response, and so their composition did not vary within this period. To evaluate the stability of the analytical response, a solution of NH_4^+ (1 mg L⁻¹) was measured using composites just prepared, and these data were compared with the absorbance values obtained with the same batch of composites after 12 months. The variation of the analytical response %RSD was 7% which agreed with the interday precision.

3.4. Qualitative analysis

The proposed PDMS–thymol/nitroprusside composite can be considered a screening method that provides positive responses (green

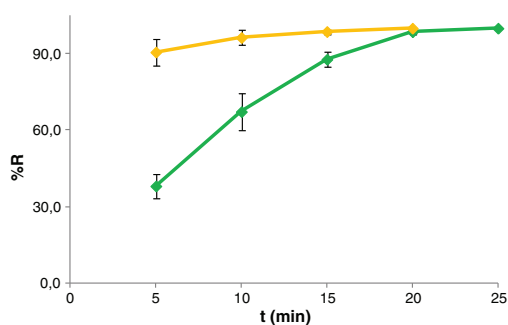


Fig. 3. Kinetics of the Berthelot's reaction for NH_4^+ (1 mg L⁻¹) with a) PDMSthymol/NaOH composite (green line) and b) PDMS-thymol/nitroprusside composite using the simplified procedure (yellow line). %R=percentage of analytical response with respect to maximum response.

colour of the solutions) and negative responses (yellow colour of the solutions); it means binary responses yes/no test. Thus, reliability of the method was evaluated in order to study the relative proportion of false negatives or false positives, and so to characterize the method. Following the procedure described in Section 2.4.5, the probability of having positive response ($P(x)$) as function of the concentration of NH_4^+ in water samples was calculated, using the LOD as cut-off value (Simonet et al., 2004). Fig. 5 shows the variation of $P(x)$ versus the concentration. It should be remarked that the water samples used in this study were a drinking water sample in order to assure a low concentration of ammonium. As can be seen, the unreliability range was between 0.2 and 0.4 ppm (at 95% as probability level). Remarkably, this interval was quite narrow even selecting the cut-off concentration at the detection limit. In addition, the probability of having false negatives in the cut off value (in this case the LOD) was only 10%. Therefore, the reliability of the response was then demonstrated for environmental water samples and wastewater samples where the concentration level of ammonium (higher than 0.5 mg L⁻¹) is outside of the unreliability region, and so false negatives do not take place.

3.5. Monitoring of ammonium in real samples

The applicability of the PDMS–thymol/nitroprusside composite to determine NH_4^+ was evaluated by analysing water samples (river and wastewater samples) and aqueous extracts of PM_{10} . Validation of this methodology was carried out by comparing the results obtained with the results obtained using the modified conventional solution derivatization (Moliner-Martinez et al., 2005). Table 2 shows the found concentration of ammonium. For each sample, the F-test for homogeneous variance (at 95% significance level) was tested, and no significant differences were obtained, so both methods can be considered equally precise. The linear regression of the values obtained by solution derivatization versus values obtained by PDMS– NH_4^+ composite was tested to check if the joint confidence region for slope and intercept included the point (intercept = 0, slope = 1), at the 95% significance level (Massart et al., 1997). Because both methods are equally precise, the assay was repeated twice, in the first case using as x values the values obtained by solution derivatization and in the second case using as x values the values obtained by PDMS– NH_4^+ composite. In both cases, the point (0,1) was included in the joint confidence region, and thus, there were

Table 2

Ammonium concentration in water samples and aqueous extracts of water samples obtained with the proposed PDMS– NH_4^+ sensor and with the conventional solution derivatization.

	Solution derivatization	PDMS– NH_4^+ sensor
$[\text{NH}_4^+]$ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
Water sample-1	13.3 ± 0.7	12 ± 1
Water sample-2	8.1 ± 0.2	7.2 ± 0.7
Water sample-3	14.4 ± 0.6	14.1 ± 0.7
$[\text{NH}_4^+]$ ($\mu\text{g m}^{-3}$)		
PM_{10} aqueous extract	1.69 ± 0.03	1.77 ± 0.15

Table 3

Mean recovery values obtained for the analysed samples with the proposed PDMS–NH₄⁺ sensor and their comparison with the results obtained with the conventional solution derivatization procedure. Spiked samples with 1 mg L⁻¹ NH₄⁺ and n = 3.

Recovery (%)	Solution derivatization	PDMS–NH ₄ ⁺ sensor
Water samples	83 ± 5	86 ± 7
PM ₁₀ aqueous extracts	109 ± 15	108 ± 10

no statistical differences between both values, so it can be concluded that both methodologies provided the same results.

Moreover, aqueous extracts of PM₁₀ were also analysed in order to extend the applicability of the proposed sensor. Satisfactory results were also obtained.

Matrix effects were evaluated by spiking water samples and PM₁₀ samples with ammonium (1 mg L⁻¹). Mean recovery values are shown in Table 3. As can be seen, similar results were obtained in water and PM₁₀ samples. In both cases, the recovery values showed that matrix effect were not present under these experimental conditions. The statistic study of the recovery values also showed that there were no statistical differences between both values at 95% confidence level.

Thus, these results indicated that the developed composite is a good alternative to develop an ammonium colorimetric sensor suitable, reliable and reproducible for monitoring campaigns.

3.6. Comparison of PDMS–thymol/nitroprusside NH₄⁺ sensor with other ammonium determination procedures

In an attempt to demonstrate the quality of the proposed PDMS–NH₄⁺ sensor, we compared some of its analytical and complementary characteristics with several methods typically used to determine ammonium. UV–vis spectrophotometric techniques (Nessler method and indophenol method), diffuse reflectance spectroscopy technique (solid-phase extraction–indothymol method), spectrofluorimetric techniques (modified Roth's method and luminol method) and electroanalytical technique (ion selective electrode (ISE)) were chosen (Molins-Legua et al., 2006; Antunes Galvao et al., 2014). Analytical characteristics such as, limit of detection (LOD) and selectivity/specificity were compared. But also, we evaluated other parameters, which are not directly related to the analytical properties, but can be decisive in the selection procedure for monitoring purposes, such as: used reagents (amount, toxicity, danger and safety), instrumentation (cost), analysis time, portability and sample volume. Fig. 6 compares the analytical and complementary properties reported in previous works (Molins-Legua et al., 2006) for the abovementioned procedures with the features that the proposed composite can provide. The different characteristics have been evaluated in a scale from 1 to 5. The score 5 has been assigned

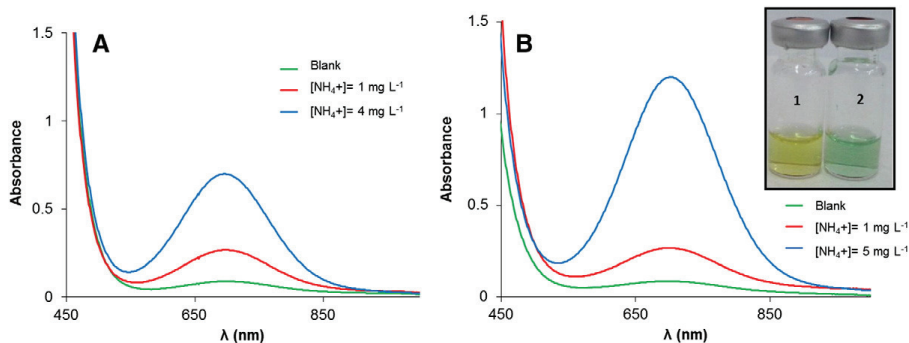


Fig. 4. UV–vis spectra obtained for A) blank, 1 and 4 mg L⁻¹ NH₄⁺ using PDMS–thymol/NaOH composites. B) Blank, 1 and 5 mg L⁻¹ NH₄⁺ using PDMS–thymol/nitroprusside composite with the simplified procedure. Inset: photograph of the derivatized solutions, 1: blank and 2: [NH₄⁺] solution 5 mg L⁻¹.

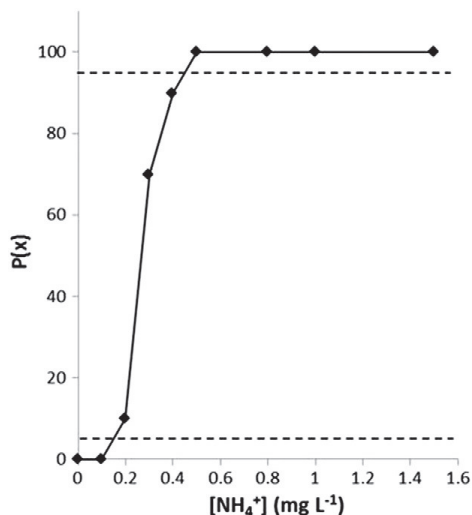


Fig. 5. Probability-concentration graph for the screening of ammonium in real watersample.

to the method that provides the best option in terms of sensitivity, selectivity, analysis time, cost, portability, toxicity and generated wastes. The scores for the other methods and properties have been proportionally assigned (Molins-Legua et al., 2006).

The main requirements of a monitoring test are the portability and the rapidity on the response. Amongst all the compared procedures, the proposed PDMS–NH₄⁺ sensor shows the best results, both rapidity and portability. Cost effectiveness was then evaluated. Cost is similar for the proposed device, SPE/indothymol method, and indophenol method. ISE method is the lowest cost procedure. However, the PDMS–NH₄⁺ sensor, was advantageous since no instrumentation and infrastructure are needed to carry out the semiquantitative determination of ammonium by in situ visual inspection. Environmental friendly procedures are also demanded. In this sense, the most environmentally friendly procedures are ISE method and modified Roth's methods, comparable with the generated wastes and toxicity of the PDMS–NH₄⁺ sensor. It should be remarked that the PDMS–NH₄⁺ sensor has improved the toxicity compared with the SPE–indothymol method because the need to manipulate the derivatization reagent is avoided. However, the proposed kit showed better results in terms of cost, rapidity and portability.

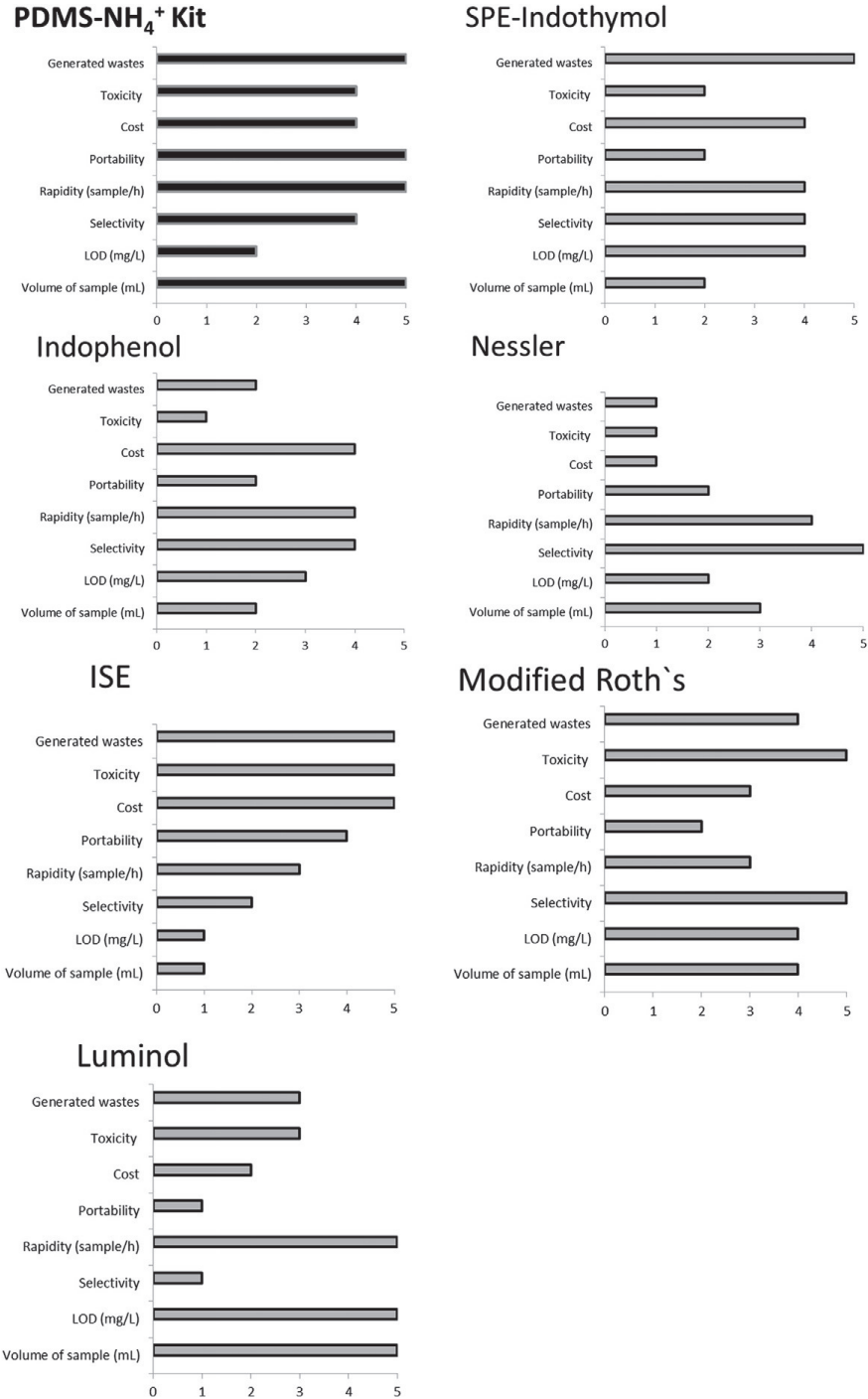


Fig. 6. Comparative study of the analytical and complementary characteristics of the proposed PDMS-NH₄⁺ kit with several NH₄⁺ determination methods. Scale from 1 to 5, 5 the best score.

Note that the main drawbacks of the SPE-indothymol, indophenol, Nessler and luminol are the toxicity of the employed reagents. By way of example, Nessler method could be advantageous in terms of rapidity, but the generated wastes, toxicity and cost make that this procedure is not a good alternative for routine analysis.

The use of miniaturized sample preparation is attractive for a number of reasons: high speed analysis, low cost operation, low solvent consumption and waste generation. Moreover, in many applications the low amount of sample available is the limiting factor of the analysis. In this respect, the proposed PDMS-NH₄⁺ sensor provided similar characteristics than the luminol method that is the procedure that needs low-est samples volumes.

The analytical characteristics, selectivity and sensitivity of the proposed sensor are comparable to that obtained with SPE-indothymol and modified Roth's method, and higher than that obtained with the other procedures. The most sensitive method would be the method based on luminol reaction. This method could be recommended when very low concentrations of ammonium need to be detected, but selectivity could be a limiting factor. It should be noted that analysis procedures must comply with the water regulations. Taking into account the legislated values and LOD achieved with the proposed procedure, we can conclude that the PDMS-NH₄⁺ sensor allows ammonium monitoring with satisfactory sensitivity.

Making a joint evaluation of all the procedures, the method based on OPA-NAC (modified Roth's) is a good alternative for routine analysis of ammonium. The main advantages are the selectivity and low LODs. Moreover, it is a cost-effective method, rapid and environmentally friendly. The proposed PDMS-NH₄⁺ sensor demonstrated similar characteristics, but with the advantages that provides portability and speed in monitoring campaigns for qualitative and quantitative analysis.

4. Conclusions

In the present work, we have described a PDMS-thymol/nitroprusside composite to develop an NH₄⁺ sensor that responds to the needs of the environmental analysis, particularly in monitoring campaigns. The proposed sensor is based on Berthelot's reaction and consists of attaching thymol and nitroprusside into a PDMS matrix. Thus, this PDMS-thymol/nitroprusside composite replaces the derivatization reagents and their preparation. From all composites conducted, PDMS-thymol/sodium nitroprusside was chosen taking into account their operational simplicity and good sensitivity in a short reaction time. Ammonium response is achieved when the PDMS composite, in the presence of 20 μL of NaOCl-NaOH solution, contacts the sample containing ammonium, then thymol and nitroprusside are released to the solution, forming indothymol blue derivative. Satisfactory RSD values and adequate LOD values have been achieved. The reliability of the proposed sensor for qualitative analysis has also been successfully demonstrated. The proposed sensor has been validated by comparing the results obtained from analysing several samples with the results obtained with the conventional solution derivatization indothymol method. In addition, the comparison of the proposed procedure with several ammonium determination methods revealed that the PDMS-NH₄⁺ sensor shows good sensitivity and selectivity, but with an improvement on the portability, since on site detection can be carried out by visual inspection of the solutions. In addition, the proposed sensor minimized the generated wastes and toxicity of the determination procedure. Thus, the PDMS-NH₄⁺ composite can be a useful tool for on-site monitoring of ammonium in the environmental field.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (CTQ-2011-26760), Generalitat Valenciana (PROMETEO

program 2012/045), and the Program of Consolidation and Structuring of Units of Competitive Investigation of the University System of Galicia potentially cofinanced by ERDF in the frame of the operative Program of Galicia 2007–2013 (Xunta de Galicia, reference: GRC2013-047). NJ and MCP express their gratitude to PROMETEO program for a grant and a research stay.

References

- Albuquerque JS, Pimentel MF, Valdinete LS, Raimundo IM, Rohwedder JJR, Pasquini C. Silicone sensing phase for detection of aromatic hydrocarbons in water employing near-infrared spectroscopy. *Anal Chem* 2005;77:72–7.
- Alestuey A, Querol X, Rodríguez S, Plana F, Lopez-Soler A, Ruiz C, Mantilla E. Monitoring of atmospheric particulate matter around sources of secondary inorganic aerosol. *Atmos Environ* 2004;38:4979–92.
- Aminot A, Kirkwood DS, Kerouel R. Determination of ammonia in seawater by the indophenol-blue method: evaluation of the ICES NUTS I/C 5 questionnaire. *Mar Chem* 1997;56:59–75.
- Andrade JM, Estévez-Pérez MG. Statistical comparison of the slopes of two regression lines: a tutorial. *Anal Chim Acta* 2014;838:1–12.
- Antunes Galvao J, Matthiensen A, Oetterer M, Moliner-Martinez Y, Gonzalez-Fuenzalida RA, Muñoz-Ortuño M, Herráez-Hernández R, Verdú-Andrés J, Molins-Legua C, Campins-Falcó P. Handbook of water analysis. In: Noleet Leo ML, De Gelder Leen SP, editors. Determination of ammonia in water samples. USA: CRC Press; 2014. p. 249–81.
- Badr ESA, Achterberg EP, Tappin AL, Hill SJ, Braungardt. Determination of dissolved organic nitrogen in natural waters using high temperature catalytic oxidation. *Trends Anal Chem* 2003;22:819–27.
- Barrancos J, Briz S, Nolasco D, Melián G, Padilla G, Padrón E, Fernández I, Pérez N, Hernández PA. A new method for estimating greenhouse gases and ammonia emissions from livestock buildings. *Atmos Environ* 2013;74:10–7.
- Campins-Falcó P, Moliner-Martinez Y, Herráez-Hernández R, Verdú-Andrés J, Jornet-Martínez N. Passive device for in situ estimation of amines in atmospheres. Patent application 201300436, 2013, Spain.
- Directive 1991/127/CE. Available http://europa.eu/geninfo/atoz/en/index_1_en.htm.
- Directive 1998/83/CE. Available http://europa.eu/geninfo/atoz/en/index_1_en.htm.
- Dubas ST, Pimpan V. Green synthesis of silver nanoparticles for ammonia sensing. *Talanta* 2008;76:29–33.
- Duong HD, Rhee JI. A ratiometric fluorescence sensor for the detection of ammonia in water. *Sensors Actuators B* 2014;190:768–74.
- Herráez C, Horstkotte B, Cerda V. A highly reproducible solenoid micropump for the analysis of total inorganic carbon and ammonium using gas diffusion with conductometric detection. *Talanta* 2014;118:186–94.
- Jo MC, Guldiken R. Effects of polydimethylsiloxane (PDMS) microchannels on surface acoustic wave-based microfluidics devices. *Microelectron Eng* 2014;113:98–104.
- Kunz U, Schönfeld H, Kirschning A, Solodenko W. Polymer/carrier composites as materials and reactors for organic synthesis. *J Chromatogr A* 2003;1006:241–9.
- Lau KT, Edwards S, Diamond D. Solid state ammonia sensor based on Berthelot's reaction. *Sensors Actuators B Chem* 2004;98:12–7.
- Li D, Watson CJ, Yan MJ, Lalor S, Rafique R, Hyde B, Lanigan G, Richards KG, Holden NM, Humphreys J. A review of nitrous oxide mitigation by farm nitrogen management in temperature grassland-based agriculture. *J Environ Manage* 2013;128:893–903.
- Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J. Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A, vol. 20. New York: Elsevier; 1997. [Part A].
- Moliner-Martinez Y, Herráez-Hernández R, Campins-Falcó P. Improved detection limit for ammonium/ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2005;532:327–34.
- Molins-Legua C, Meseguer-Lloret S, Moliner-Martínez Y, Campins-Falcó P. A guide for selecting the most appropriate method for ammonium determination in water samples. *Trends Anal Chem* 2006;25:282–90.
- Núñez L, Cetó X, Pividori MI, Zanoni MVB, del Valle M. Development and application of an electronic tongue for detection and monitoring of nitrate, nitrite and ammonium levels in waters. *Microchem J* 2013;110:273–9.
- Piñero Di Blasi JI, Martínez Torres J, García Nieto PJ, Alonso Fernández JR, Díaz Muñoz C, Taboada J. Analysis and detection of outliers in water quality parameters from different automated monitoring stations in the Miño river basin (NW Spain). *Ecol Eng* 2013;60:60–6.
- Saggar S, Singh J, Giltrap DL, Zaman M, Luo J, Rollo M, Kim DG, Rys G, van der Weerden TJ. Quantification of reductions in ammonia emissions from fertilizer urea and animal urine in grazed pastures with urease inhibitors for agriculture inventory: New Zealand as case of study. *Sci Total Environ* 2013;465:136–46.
- Searle L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. *Analyst* 1984;109:549–68.
- Seethapathy S, Gorecki T. Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: a review. *Anal Chim Acta* 2012;750:48–62.
- Simonet BM, Rios A, Valcárcel M. Unreliability of screening methods. *Anal Chim Acta* 2004; 516:67–74.
- Zimmerman JB, Mihelcic JR, Smith J. Global stressors on water quality and quantity. *Environ Sci Technol* 2008;15:4247–54.

Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method

Science of the Total Environment (en prensa)



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

1 Review

Q13 Q11 Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in
3 untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method

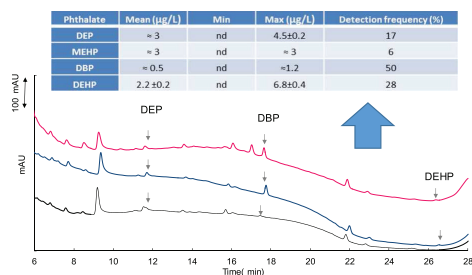
Q12 N. Jornet-Martínez, C. Antón-Soriano, P. Campíns-Falcó *

5 MINTOTA Group, Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, Dr. Moliner 50, Burjassot, 46100 Valencia, Spain

7 GRAPHICAL ABSTRACT

80

91



13

15

17 ARTICLE INFO

16

18 Article history:

19 Received 9 April 2015

20 Received in revised form 27 May 2015

21 Accepted 27 May 2015

22 Available online xxxxx

23

24 Editor: D. Barcelo

25

26 Keywords:

27 Dialkyl phthalates

28 Capillary liquid chromatography

29 In-tube solid-phase microextraction (IT-SPME)

30 Urine analysis

40

42

43

Contents

46	1. Introduction	0
47	2. Experimental	0
48	2.1. Materials	0

* Corresponding author.

E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.124>

0048-9697/© 2015 Published by Elsevier B.V.

Please cite this article as: Jornet-Martínez, N., et al., Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method, *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.124>

ABSTRACT

At present, human exposure to dialkyl phthalates is assessed through urinary measurement of their metabolites due mainly to contamination in their analysis by their ubiquitous presence. An on-line miniaturized method and the processing of the untreated urine samples have been the key factors for minimizing contamination and achieving unbiased results. Di(2-ethylhexyl) (DEHP), diethyl (DEP), dibutyl (DBP) and mono-ethylhexyl (MEHP) phthalates in urine samples have been included in the study; MEHP as metabolite of the main dialkyl phthalate such as DEHP. On-line in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME)-capillary liquid chromatography (CapLC) with diode array detection (DAD) is employed. The detection limits (LODs) achieved in urine were between 0.5 and 1.5 $\mu\text{g/L}$. Eighteen urines were processed. DBP and DEHP were found in nine and five samples, respectively and DEP in three of them. MEHP was only detected in one of the eighteen samples analyzed.

© 2015 Published by Elsevier B.V.

29

49	2.2.	Urine samples	0
50	2.3.	Chromatographic conditions	0
51	2.4.	In-tube SPME procedure	0
52	2.5.	Quality assurance and quality control	0
53	3.	Results and discussion	0
54	3.1.	Chromatographic separation	0
55	3.2.	Analytical performance	0
56	3.3.	Application to real samples	0
57	4.	Conclusions	0
58		Acknowledgments	0
59		References	0

60

61 **1. Introduction**

62 Phthalate esters are widely used as plasticizers in industrial products. One of the most used is di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). DEHP is employed in flooring, wall covering, food content application and medical devices. Also, diethyl phthalate (DEP) and dibutyl phthalate (DBP) are used in personal care products, lacquers, varnished and coatings (Casas et al., 2011). Ingestion, inhalation and dermal contact are considered important routes of exposure to phthalates in the general population (Kamrin, 2009; Swan, 2008).

70 Generally, the metabolites of the dialkyl phthalates as the mono-phthalates, for example MEHP for DEHP, are used as biomarkers of recent human exposure to dialkyl phthalates (Table 1) due between others, to the problem of contamination in their analysis by their ubiquitous presence (Christensen et al., 2014; Meeker et al., 2009).

75 Some phthalates as DEHP and DBP are classified as very dangerous substances in EU regulation on chemicals (REACH Regulation (CE) n. 1907/2006). Several studies in humans have reported significant associations between exposure to some phthalates and adverse reproductive health effects (Bergé et al., 2014; Lomenick et al., 2010; Net et al., 2015). European authorities classified these compounds in Category 1B substances regarded as toxic to reproduction.

82 From the analytical point of view, three important aspects should be considered for estimating dialkyl phthalates in urine samples: low concentration levels in samples need pre-concentration and require

sensitive analytical methodologies; the complexity of matrix usually requires clean-up and/or pre-treatment before chromatography; contamination during the analysis is a common problem. Generally, urine sample preparation requires: 1) extraction into an organic solvent, 2) additional sample cleanup steps to separate fats and other endogenous lipophilic materials, 3) β -glucuronidase hydrolysis (to release the mono-phthalate ester as biomarker) and/or acidic hydrolysis and 4) pre-concentration methods as liquid–liquid extraction (Barnabé et al., 2008) or solid-phase extraction (Lou et al., 2012). These methods are time and solvent consuming and labor intensive. More recently, different miniaturized methods have been proposed, most of them involving some form of liquid–liquid microextraction (Farahani et al., 2007; Guo and Lee, 2013) or solid-phase microextraction (Banitaba et al., 2013; Cháfer-Pericás et al., 2008; Jornet-Martínez et al., 2014; Li et al., 2006; Muñoz-Ortuño et al., 2012), but for other matrices different to urine.

In-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) is a form of SPME, which typically uses a GC capillary column with a proper coating to extract the analytes. The employment of the extractive column as the loop of an injection valve (in-valve IT-SPME) can be very useful for the enrichment of organic pollutants reducing sample manipulation. This is due to the fact that when a large volume of sample is passed through the extractive capillary, the analyte is concentrated into the coating. IT-SPME is a green alternative that makes the method involved greener. Indeed, IT-SPME coupled with HPLC-CapCL-DAD leads the automation

† Q1 **Table 1**
† 1.2 Analytical methodologies for phthalates estimation in biological samples.

† 1.3	Phthalates	Biological sample	Pre-treatment	Extraction and clean-up	Technique	LODs	Reference
† Q2	Monoalkyl	Urine	1. Addition of internal standard 1. Enzymatic deconjugation (37 °C, 90 min) 2. Acidification	1. SPE 2. Evaporation of extracts (N ₂)	UPLC–MS/MS	0.2–5 µg/L	Saravanabhavan et al. (2013)
† Q3	Monoalkyl	Urine	1. Enzymatic deconjugation (37 °C, 2 h) 2. Acidification 3. Addition of internal standard	1. SPE	HPLC–MS/MS	0.15–8 µg/L	Tranfo et al. (2013)
† Q5	Monoalkyl	Urine	1. Enzymatic deconjugation (37 °C, 2 h)	1. SPE	HPLC–MS/MS	0.1–1.4 µg/L	Frederiksen et al. (2010)
† Q4	Oxo-monoalkyl		2. Centrifugation	2. Dry to concentrate the sample			
† Q6	Monoalkyl	Urine	1. Enzymatic deconjugation 2. Acidification 3. Centrifugation	1. SPE	HPLC–MS	0.2 µg/L	Wu et al. (2013)
† 1.9	Oxo-monoalkyl						
† Q7	Dialkyl phthalates	Serum sweet	1. Protein precipitation	1. Liquid–liquid extraction 2. Dilution 1:4 with hexane	GC/MS	0.2 µg/L	Genius et al. (2012)
† Q8	Dialkyl phthalates	Blood serum	1. Acidification 2. Dilution with water	1. Liquid–liquid extraction (hexane: MTBE) (1:1) 2. Clean up with aminopropylene column	GC/MS	0.1–3 µg/L	Högberg et al. (2008)
† Q9	Dialkyl phthalates	Blood	1. Centrifugation of blood to obtain plasma 2. Dilution	1. Liquid–liquid extraction (MTBE:dioctyl phthalate in hexane) (1:1) 2. Mixt hexane and vortex	GC/MS	0.2–0.4 µg/L	Wan et al. (2013)
† 1.13	Dialkyl and monoalkyl phthalate	Urine	1. Dilution with water 2. pH adjustment	On-line IT-SPME	CapLC/DAD	0.5–1.5 µg/L	Our method
† 1.14							

Please cite this article as: Jornet-Martínez, N., et al., Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method, Sci Total Environ (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.124>

of the system. Recent trends in biological samples preparation have focused on both, miniaturization and on-line processing. In this context IT-SPME coupled with HPLC-CapCL-DAD is a suitable methodology.

The presence of the dialkyl phthalates as DEHP, DBP and DEP in human urine has been tested, without previous clean-up or complex pre-treatment of urine in this paper. Only dilution of the urine to half and acidification to pH 3 (for improving MEHP estimation) are necessary. Through an on-line methodology based on in-tube solid-phase microextraction (IT-SPME) coupled to capillary liquid chromatography and UV diode array detection (CapLC-DAD), samples were processed directly reducing manipulation and time analysis and avoiding contamination by dialkyl phthalates during analysis. For the first time, dialkyl phthalates have been reported in urine. Current methods used to analyze dialkyl phthalates in biological samples different to urine are based on gas chromatography/mass-spectroscopy (GC/MS) as can be seen in Table 1. On the other hand, liquid chromatography/mass-spectroscopy (LC/MS) was proposed for monoalkyl phthalate detection (Table 1). Overestimated results, especially in GC based methods have been reported (Marega et al., 2013). Our methodology could serve to understand better dialkyl phthalate metabolism in human in order to control their toxicological effects by measuring the starting compounds. In addition, the method could be applied to establish the contamination, due to dialkyl phthalates, of the population.

2. Experimental

2.1. Materials

All reagents were of analytical grade. Standards of 2-diethylhexyl phthalate (DEHP) (99%), diethyl phthalate (DEP) (99%) and dibutyl phthalate DBP (99.5%) were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany); mono-ethylhexyl phthalate (MEHP) (91%) was obtained

from Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Germany). Acetonitrile HPLC grade was purchased from Romil (Cambridge, UK) and hydrochloric acid (37%) from Scharlau (Barcelona, Spain). Stock standard solutions of the analytes (1 µg/mL) were prepared in acetonitrile and working solutions by dilution of the stock solutions with water. All solutions were stored in the dark at 4 °C.

2.2. Urine samples

Eighteen samples were collected: 12 and 6 samples from woman or man volunteers, respectively. The ages of the volunteers range between 22 and 85 years. All the urine samples (50–250 mL) were stored in brown glass flasks at 4 °C until analysis.

The analysis of samples was done before 48 h of urine collection. Then, the samples were diluted with water Milli-Q (1:1). Hydrochloric acid (1 M) was added to adjust the pH of the samples to 3.0 before the analysis. Aliquots of 4 mL of the acidified samples were loaded in the IT-SPME and processed as described below. All samples were analyzed in duplicate and at room temperature. To 2 mL of three urine samples at pH 6–6.5, 700 µL of 1 M of ammonium acetate (pH = 7) and 50 µL of *b*-glucuronidase were added and were stored at 37 °C for 2 h. Scheme 1 shows the protocol used to process samples.

2.3. Chromatographic conditions

The capillary chromatographic system used consisted of a binary LC capillary pump (Agilent 100 Series, Waldbronn, Germany) and a UV–vis diode array detector (Agilent 1200 series) equipped with a 80 nL flow cell. The spectra were recorded from 190 to 400 nm, and the chromatograms were monitored at 230 nm. The detector was linked to a data system (Agilent, HPLC ChemStation) for data acquisition and storage. A Zorbax SB C₁₈ column (150 mm × 0.5 mm i. d., 3.5 µm) purchased

PROTOCOL

1. Collect human urine samples. **Timing ~ 5 min**
 3. Transfer 2 mL of urine to vial and add 2 mL of water nanopure. **Timing ~ 1 min**
 4. Acidify the sample with HCl 1 mM. **Timing ~ 5 min**
 5. Prepare the standards or spiked urine. **Timing ~ 5 min**
- Δ CRITICAL STEP.** Each stock phthalate solution should be stored in acetonitrile at 4°C and diluted in nanopure water before analysis.
6. Process 4 mL of prepared sample or standard or spiked urine in IT-SPME-CapLC-DAD. **Timing ~ 1 min**
 7. Acquire the analytical signal by IT-SPME-CapLC-DAD. **Timing ~ 30 min**
- ◇ IMPORTANT:** Avoid the use of plastic materials during all the steps. Carefully washed glassware must be used. Minimize sample-preparation time. Check contamination levels of phthalates in blanks.

Scheme 1. Protocol to process samples by the proposed method.

Please cite this article as: Jornet-Martínez, N., et al., Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method, *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.124>

from Agilent was used as capillary analytical column. The mobile-phase was a mixture of acetonitrile/water. In the optimized procedure the initial composition was acetonitrile–water 50:50 (v/v). The acetonitrile content was linearly increased to reach 100% at min 15. Then, the acetonitrile in mobile-phase composition was decreased to 95:5 (v/v) until 22 min, 70:30 (v/v) until 25 min and 50:50 (v/v) until the end of the run. The mobile phase flow rate was 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. All solvents were filtered through 0.45 mm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) before use.

2.4. In-tube SPME procedure

For the in-tube SPME procedure, the stainless steel injection loop of a conventional injection valve was replaced by a GC TRB-5 capillary column (Teknokroma) of 30 cm length and 0.32 mm i.d., coated with 5% diphenyl-95% polydimethylsiloxane (3 μm coating thickness). Capillary connections to the valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeves of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing and 1/16 in PEEK nuts and ferrules (Teknokroma). Standards or samples (4.0 mL) were passed through the IT-SPME capillary by means of a 1.0 mL precision Hamilton syringe (Bonaduz, Switzerland). After sample loading 50 μL of acid nanopure water (unless otherwise stated) was flushed through the capillary in order to remove the solution remaining in it (the inner volume of the capillary column was c.a. 32 μL). Finally, the injection valve was manually rotated, so the analytes were desorbed from the coating of the extractive capillary with the mobile-phase, and sent to the analytical capillary column for separation and detection. All the experiments were carried out in duplicate except those specified elsewhere and at room temperature.

2.5. Quality assurance and quality control

Because phthalates are present in the analytical laboratory, special care was taken to avoid the contact of reagents and solutions with plastic materials. Scrupulous cleaning and design of quality control procedures ensure analytical results free of systematic errors and false positives. The glassware used for the analysis was washed with detergent, rinsed with tap water, ultrapure water (Millipore, Milford, MA, USA), and dried in an oven at 150 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h.

Phthalates were identified by both, retention time and UV spectrum. Procedural blanks were prepared at an interval of every five standards or samples to check any potential contamination which occurred during analysis. Solvent blanks were prepared to run after every five samples. Duplicate matrix spikes were prepared for the urine samples.

The limits of detection (LODs) were determined from standards on the basis of a signal-to-noise ratio of 3 ($S/N = 3$), while the LOQ (limit of quantification) was defined as the lowest point of the calibration curve calculated to be 30% of this actual value. The six-point standard calibration was conducted before and after each analysis.

As no certified reference materials were available for the analytes and matrices of interest, the recovery from fortified urines was measured as an alternative to trueness. Briefly, ten samples were

independently spiked and analyzed. Precision was evaluated ($n = 5$) and expressed as intraday and interday relative standard deviations (RSDs).

Linearity range was defined by plotting the peak area versus concentration. The following criteria for linearity range were applied: linear regression with a correlation coefficient better than 0.99, bias from the calibration line less than 15% for all individual calibration points. The calibration curve was not forced.

The quantified concentrations are given as mean \pm expanded uncertainty with $K = 2$ according to the National Institute of Standards and Technology (NIST).

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation

Different gradient elution programs of acetonitrile/water, analytical columns, changes in the pH of the samples and several cleaning solvents before the transfer step to the analytical column were assayed bearing in mind Jornet-Martínez et al., 2014. Satisfactory results were obtained by acidifying the samples at pH 3 for MEHP ($\text{pK}_a = 3.08$). 50 μL of acidified nanopure water was employed as cleaning solvent and a C18 particulate column was selected. A high elutrophic strength needed to desorb DEHP from the analytical column (Jornet-Martínez et al., 2014), causes rapid desorption of polar compounds (in 5–6 min) that are present in high levels in urine matrix. This fact avoids clean-up treatments. Besides, a dilution factor of two for the urine is sufficient to minimize matrix effect. Urine was acidified at pH 3 in order to improve the sensitivity of the procedure for MEHP. Volumes of 6 mL, 4 mL and 1 mL of diluted urine samples were processed by IT-SPME. The selected volume was 4 mL and it was according to our studies previously realized using IT-SPME device for pollutant determinations in other matrices (Muñoz-Ortuño et al., 2012).

3.2. Analytical performance

Table 2 shows relevant analytical parameters of the proposed method. Satisfactory linearity within the tested concentration intervals was achieved. The precision was also suitable considering the level of concentrations assayed, with intra- and inter-day relative standard deviations <9% and <20%, respectively ($n = 5$). The limits of detection (LODs) and quantitation (LOQs) were calculated experimentally from solutions containing concentrations providing signal/noise ratios of 3 and 10, respectively. Those LODs were verified in urine samples and the same values were obtained. Similar LODs to those reported in Table 1 were obtained. LODs could be improved if necessary, using the same IT-SPME-CapLC-DAD manifold by increasing the length of the IT-SPME capillary used to increase the amount of the analytes adsorbed onto the capillary. In such conditions, the analysis time will be longer than that shown in this paper. Increasing the volume of sample until 6 mL, tested in this work, the sensitivity increased in a percentage of 15%.

Table 2
Analytical data for the determination of phthalates in urine.

Analyte	Working range ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Linearity, $y = a + bx$ ($n = 6$)			Precision ($n = 5$)		LOD ($\mu\text{g}/\text{L}$)	Recovery ^a (%) $n = 10$
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	R^2	Intraday ^b rsd (%)	Interday ^b rsd (%)		
DEP	4.5–50.0	3 ± 1	2.9 ± 0.1	0.993	5	9	1.5	90 ± 9
MEHP	4.5–50.0	-7 ± 2	6.0 ± 0.1	0.997	9	20	1.5	50 ± 10
DBP	1.5–50.0	41 ± 23	22 ± 1	0.99	2	7	0.5	90 ± 2
DEHP	2–50.0	1 ± 1	8.2 ± 0.5	0.98	9	18	0.75	80 ± 8

^a Estimated from urines spiked between 5 and 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ level.

^b Estimated from urines spiked at 10 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Please cite this article as: Jornet-Martínez, N., et al., Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method, *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.124>

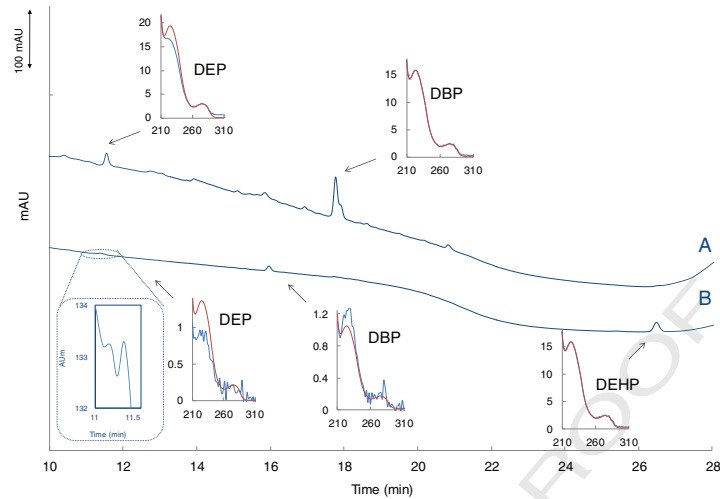


Fig. 1. Chromatograms at 230 nm obtained under optimized conditions for two urine samples. The inserts correspond to the matching of the spectra of phthalates found in reference to the library of the standards. The boxed insert in the second chromatogram corresponds to the spectrum of the baseline, which is given because DEP was detected at LOD level, in order to assure its identification.

Table 3

The urinary levels ($\mu\text{g/L}$) of DEP, MEHP, DBP and DEHP in a group of 18 volunteers. Mean \pm expanded uncertainty with $K = 2$ in used for quantified measurements according NIST.

Phthalate	Mean	Min	Max	Detection frequency (%)
DEP	≈ 3	nd	4.5 ± 0.2	17
MEHP	≈ 3	nd	≈ 3	6
DBP	≈ 0.5	nd	≈ 1.2	50
DEHP	2.2 ± 0.2	nd	6.8 ± 0.4	28

Ten urine samples were spiked between 5 and 20 $\mu\text{g/L}$ levels of DEP, DEHP, DBP and MEHP. The recoveries achieved are given in Table 2. For the dialkyl phthalates matrix effect was not found, while MEHP estimation was affected by this kind of error. In this sense, for MEHP quantitative estimation standard addition method, i.e. spiked urine, is mandatory.

3.3. Application to real samples

Eighteen samples from volunteers were processed by the method (in Fig. 1 examples of chromatograms are given). DBP was found in nine samples (50% of all samples analyzed), DEHP in five samples (28%), DEP in three of them (17%) and MEHP in only one of eighteen samples analyzed (6%). Spiked urines were used for estimating MEHP. Table 3 summarizes the results obtained.

Fig. 2 shows the profile of phthalates for the samples assayed, as it can be seen only seven samples contained all tested phthalates below their respective LODs. Four, one and one samples contained only DBP, DEHP and MEHP, respectively; the others contained two phthalates at least. The samples were analyzed without identification of volunteers.

Three urinary samples containing the tested phthalates below LODs and spiked at 20 $\mu\text{g/L}$ were hydrolyzed with β -glucuronidase enzyme at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 2 h. Identically chromatographic profiles than non-hydrolyzed

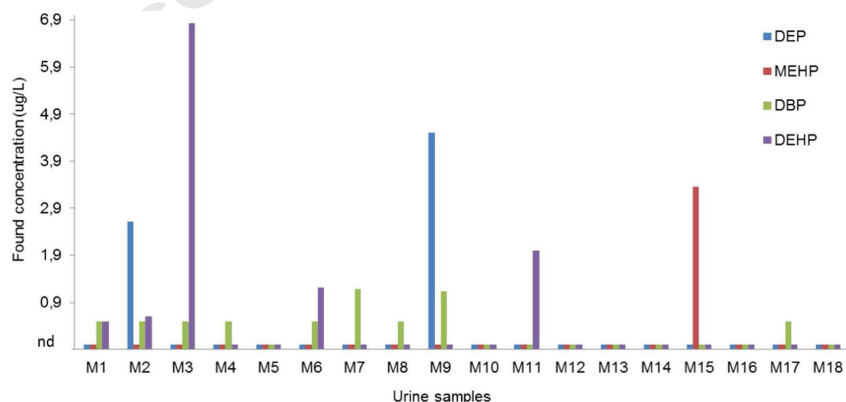


Fig. 2. Profile of phthalates in the samples analyzed; nd means not detected, i.e. concentration found below LODs.

Please cite this article as: Jornet-Martínez, N., et al., Estimation of the presence of unmetabolized dialkyl phthalates in untreated human urine by an on-line miniaturized reliable method, *Sci Total Environ* (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.124>

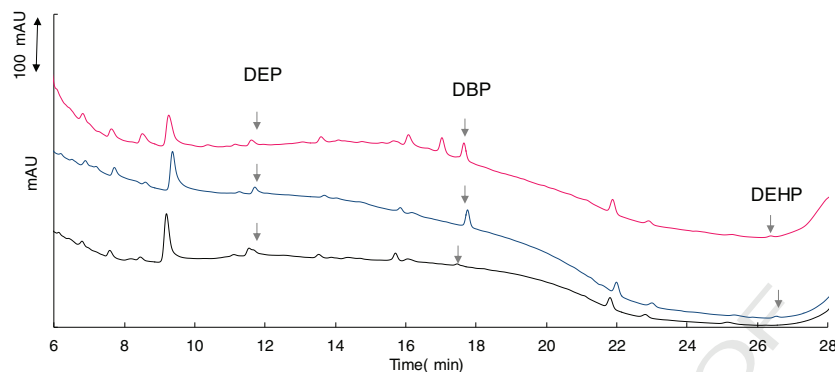


Fig. 3. Chromatograms at 230 nm obtained under optimized conditions for an urine which contains DEP, DBP and DEHP below LODs (in black), spiked urine at 20 µg/L in blue and hydrolyzed spiked urine at 37 °C for two hours in pink.

spiked urinary samples were found. (See Fig. 3 as an example). The content of free dialkyl phthalates is not modified when enzymatic treatment of urine is carried out.

In the literature, all studies of phthalates in urine are focused only to analyze mono-alkyl phthalates as can be seen in Table 1. The LODs achieved are similar to those provided by the proposed method and the reported concentrations correspond to the low µg/L level. Similar LODs have been also reported for methods developed for estimating dialkyl phthalates in other biological matrices as can be seen in Table 1. The accuracy of the described in-tube SPME procedure was guaranteed through a recovery study to assess the presence of proportional systematic error attributable to parameters of measure system, procedure or the method.

4. Conclusions

In the present work sample treatment is reduced to a minimum: dilution to a half in order to minimize matrix effect and pH adjustment for improving MEHP detection. Acidified samples were directly processed in the miniaturized ITSPME-CapLC-DAD device, which avoids the contact of the sample with plastic materials (for example extraction cartridges used in SPE methods). The method also eliminates the employment of evaporation steps and no solvents other than those required for the capillary chromatographic step are necessary. This is a green alternative compared with other LC methods that need pretreatment, extraction and clean up of the samples. The risk of contamination during sample treatment has been reduced to a minimum. The characteristics of the proposed method are essential for studying better the metabolism of the dialkyl phthalates from the analysis not only of their metabolites until now, but also including the starting compounds and then, to control their toxicology. For the first time, dialkyl phthalates have been reported in urine. In addition, the method can be applied to establish the contamination, due to dialkyl phthalates, of the population.

Acknowledgments

The authors are grateful to MINECO (CTQ2011-26760, CTQ2014-53916-P) and to Generalitat Valenciana (PROMETEO program 2012/045). NJ expresses her gratitude to PROMETEO program for her predoctoral grant.

References

Banitaba, M.H., Davarani, S.S.H., Pourahadi, A., 2013. Solid-phase microextraction of phthalate esters from aqueous media by electrophoretically deposited TiO₂ nanoparticles on a stainless steel fiber. *J. Chromatogr. A* 1283, 1–8.

- Barnabé, S., Beauchesne, I., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2008. Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. *Water Res.* 41, 153–162.
- Bergé, A., Gasperi, J., Rocher, V., Gras, L., Coursimault, A., Moilleron, R., 2014. Phthalates and alkylphenols in industrial and domestic effluents: case of Paris conurbation (France). *Sci. Total Environ.* 26–35, 488–489.
- Casas, L., Fernández, M.F., Llop, S., Guxens, M., Ballester, F., Olea, N., Irurzun, M.B., Rodríguez, L.S.M., Rialto, I., Tardón, A., Vrijheid, M., Calafat, A.M., Sunyer, J., 2011. Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish pregnant women and children. *Environ. Int.* 37, 858–866.
- Cháfer-Pericás, C., Campins-Falcó, P., Prieto-Blanco, M.C., 2008. Automatic in-tube SPME and fast liquid chromatography: a cost-effective method for the estimation of dibutyl and di-2-ethylhexyl phthalates in environmental water samples. *Anal. Chim. Acta* 610, 268–273.
- Christensen, K.L.Y., Makris, S.L., Lorber, M., 2014. Generation of hazard indices for cumulative exposure to phthalates for use in cumulative risk assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 69, 380–389.
- Farahani, H., Norouzi, P., Dinarvand, R., Ganjali, M.R., 2007. Development of dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography–mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *J. Chromatogr. A* 1172, 105–112.
- Guo, L., Lee, H.K., 2013. Vortex-assisted micro-solid-phase extraction followed by low-density solvent based dispersive liquid–liquid microextraction for the fast and efficient determination of phthalate esters in river water samples. *J. Chromatogr. A* 1300, 24–30.
- Jornet-Martínez, N., Muñoz-Ortuño, M., Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P., 2014. On-line in-tube solid phase microextraction-capillary liquid chromatography method for monitoring degradation products of di-(2-ethylhexyl) phthalate in waters. *J. Chromatogr. A* 1347, 157–160.
- Kamrin, M.A., 2009. Phthalate risks, phthalate regulation, and public health: a review. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 12, 157–174.
- Li, X., Zhong, M., Xu, S., Sun, C., 2006. Determination of phthalates in water samples using poly(aniline)-based solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1135, 101–108.
- Lomenick, J.P., Calafat, A.M., Melguizo Castro, M.S., Mier, R., Stenger, P., Foster, M.B., Wintergerst, K.A., 2010. Phthalate exposure and precocious puberty in females. *J. Pediatr.* 156, 221–225.
- Lou, Y.-B., Yu, Q.-W., Yuan, B.-F., Feng, Y.-Q., 2012. Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Talanta* 90, 123–131.
- Marega, M., Grob, K., Moret, S., Conte, L., 2013. Phthalate analysis by gas chromatography–mass spectrometry: blank problems related to the syringe needle. *J. Chromatogr. A* 1273, 105–110.
- Meeker, D.J., Thyagarayana, J.D.S.S., Swan, S.H., 2009. Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.* 364, 2097–2113.
- Muñoz-Ortuño, M., Moliner-Martínez, Y., Cogollos-Costa, S., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P., 2012. A miniaturized method for estimating di-(2-ethylhexyl) phthalate in bivalves as bioindicators. *J. Chromatogr. A* 1260, 169–173.
- Net, S., Sempéré, R., Delmont, A., Paluselli, A., Ouddane, B., 2015. Occurrence, fate, behavior and ecotoxicological state of phthalates in different environmental matrices. *Environ. Sci. Technol.* 49, 4019–4035.
- Swan, S.H., 2008. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environ. Res.* 108, 177–184.

Evaluation of Carbon Nanotubes Functionalized Polydimethylsiloxane based coatings for In-tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography

Chromatography (en prensa)

Article

Evaluation of Carbon Nanotubes Functionalized Polydimethylsiloxane based coatings for In-tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography

N. Jornet-Martinez, P. Serra-Mora, Y. Moliner-Martinez *, R. Herráez-Hernández and P. Campins-Falcó *

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia. Dr. Moliner 50, E46100 – Burjassot, Valencia, Spain

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: yolanda.moliner@uv.es (Y.M.-M.); pilar.campins@uv.es (P.C.-F.); Tel.: +34-963-543-183 (Y.M.-M.); +34-963-543-002 (P.C.-F.); Fax: +34-963-544-436 (Y.M.-M.).

Academic Editor:

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: In the present work, the performance of carbon nanotubes (c-CNTs) functionalized polydimethylsiloxane (PDMS) based coatings as extractive phases for in-tube solid phase microextraction (IT-SPME) coupled to Capillary LC (CapLC) has been evaluated. Carboxylic-single walled carbon nanotubes (c-SWCNTs) and carboxylic-multi walled carbon nanotubes (c-MWNTs) have been immobilized on the activated surface of PDMS capillary columns. The effect of different percentages of diphenyl groups in the PDMS extractive phase has also been evaluated. The extraction capability of the different capillary columns has been tested for organic pollutants with different structure and polarity (triazines, polycyclic aromatic compounds (PAHs), and pyrethroids). The results indicated that the use of the c-CNTs-PDMS capillary columns improve pyriproxyfen, chlorpyrifos and mainly PAHs extraction. Triazines were better extracted by unmodified TRB-35 and modified c-CNTs-PBMS_{TRB-5}. The results indicated that the extraction capability of the c-CNTs capillary columns depends not only on the polarity of the analytes (as it occurs with PDMS columns), but also it strongly depends on the interactions that the analytes can establish with the immobilized c-CNTs on the PDMS columns. The extraction efficiency has been evaluated on the basis of the preconcentration rate that can be achieved and in this sense the best c-CNTs-PDMS capillary column for each group of compounds can be proposed.

Keywords: in-tube solid phase microextraction, carbon nanotubes, polydimethylsiloxane, triazines, polycyclic aromatic hydrocarbon, organophosphorous pesticides

1. Introduction

Solid phase microextraction (SPME) is consolidated as an extraction technique owing to its simplicity, rapidity and wide application. This technique combines extraction and enrichment operations in one single step, and so it is a solvent free sample preparation technique, requirement which is essential to develop green analytical methodologies [1]. Among the different modalities of SPME, in-tube solid phase microextraction (IT-SPME) provides additional advantages such as automatization and on-line coupling to the separation/detection system. IT-SPME is based on the extraction and preconcentration of analytes by adsorption on the surface of a capillary column that is on-line coupled with a liquid chromatographic system [2,3].

The nature of the capillary coating for the IT-SPME is a key point to reach satisfactory extraction efficiencies, since the sorption/desorption processes strongly depend on the affinity of the analytes for the coating. Commercially available capillaries have been proposed to determine several analytes for environmental, biological or food applications. However, the utility of conventional coatings is limited mainly by the low extraction efficiency. Thus, recent research has afforded a variety of alternative capillary coatings to improve extraction efficiency, selectivity, extraction time and coating stability. [4–7].

In this scenario, carbon nanotubes (CNTs) [8] opened a new investigation area in the development of alternative coating materials for IT-SPME, since their special properties make them very attractive to improve the performance of this technique. Besides to the extraordinary electrical, thermal and mechanical properties, CNTs possess a large surface area. Their strong adsorption affinity to a wide variety of organic compounds, together with their large adsorption surface makes them excellent material for (micro)extraction [9,11].

An interesting feature of CNTs is that their surfaces can be chemically modified, resulting in functionalized adsorbents that allow the introduction of new interactions with organic molecules. [10]. Modifying the structure of the CNTs, either by covalent or non-covalent functionalization, changes the CNTs properties, such as CNT hydrophobicity, or introduces specific substituents which modify the affinity of the these adsorbent to the analytes[11].

There is a vast number of publications describing the advantages of using CNTs as adsorbent materials for SPME [12–15]. Moreover, several review articles can be found dealing with this subject [16–18]. However, the use of CNTs or carbon based nanoadsorbents for IT-SPME is still a challenge. Only a few examples of CNTs functionalized capillary columns for IT-SPME can be found [19,20].

The objective of the present work was to evaluate the performance of c-CNTs-PDMS coatings as extractive phases for IT-SPME coupled to Cap-LC. Carboxylic SWNTs (c-SWNTs) and carboxylic MWNTs (c-MWNTs) have been immobilized on a PDMS capillary column and the extraction efficiency for different compounds compared with the extraction efficiency of commercial PDMS capillary columns. The different capillary coatings have been tested for target analytes such as triazines and PAHs. It should be noted, that these analytes have been chosen taking into account that they are pollutants included in the List of Priority Pollutants [reference]. Concentration level is low in environmental samples, and so the development of sensitive, selective and rapid analytical methods is mandatory to monitor these compounds in the environment, especially when multiresidue analysis is requires. Table 1 shows the structures of the target analytes. Parameters such as extraction efficiency

precision and sensitivity have been compared in order to elucidate the potential advantage of using c-CNTs-PDMS as extractive phase for IT-SPME.

2. Experimental Section

2.1. Chemicals

SWNTs, MWNTs, 3-aminopropyl triethoxysilane (APTS), 1,3-dicyclohexylcarbodiimide, glutaraldehyde, and the triazines (atrazine, propazine, terbuthylazine-desethyl (DES-TBA) and terbuthylazine-2-hydroxy (2-OH-TBA)) were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Pyriproxyfen were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Terbuthylazine (TBA) and PAH-Mix 18 (acenaphthene acenaphthylene, anthracene, benzo[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[g,h,i]perylene, benzo[a]pyrene, chrysene, dibenzo[a,h]anthracene, fluoranthene, fluorine, indeno[1,2,3,c,d]pyrene, naphthalene, phenanthrene, perylene and pyrene) were supplied by Dr Ehrenstorfer (Germany). Acetonitrile was of HPLC grade (Scharlau, Barcelona Spain). The ultrapure water was obtained through a system Nanopure II (Sybron, Barnstead, United Kingdom).

2.2. Equipment

The capillary chromatographic system consisted of a capillary LC binary gradient pump (Agilent 1200 Series, Waldbronn, Germany), six-ports injection valve (Rheodyne 7725), a UV-Vis diode array detector (HP 1200 series) equipped with an 80 nL flow cell. The analytical signal was recorded between 210 and 360 nm. For analytes separation a Zorbax SB C18 (150 mm × 0.2 mm i. d., 0.5 μm) particulate column (Agilent) was employed.

The c-CNTs were characterized using FTIR-ATR Agilent Technologies Cary 630 FTIR (Agilent, USA). The micrographs of scanning electronic microscope (SEM) were obtained with a HITACHI-S4800 operating at 20 kV.

2.3. Functionalization of the Capillary Columns

Prior to the CNTs immobilization on the surface of the capillary, SWNTs and MWNTs were carboxylated. CNTs carboxylation was carried out following the procedures described in [21,22] for SWNTs and MWNTs, respectively. Briefly, to prepare c-SWNTs, 5 mL of H₂SO₄:HNO₃ (3:1) were added to 0.025 g of SWNTs and ultrasonicated during 90 min (50 W, 60 Hz). Then, this mixture was diluted with water (500 mL) and filtered through a 0.45 μm cellulose acetate filter. Finally, c-SWNTs were washed with 1 M HCl and left to dry at room temperature. The c-MWNTs were prepared by adding

80 mL of H₂SO₄:HNO₃ (3:1) to 0.020 g of MWNTs, and ultrasonicated for 5 h. Next, the suspension was diluted with water (1.5 L), filtered and washed with water [22].

The following step was the immobilization of c-CNTs on the surface of the PDMS capillary columns. Firstly, activation of the PDMS capillary column was carried out. For this purpose, the column was rinsed with a NaOH solution (2 M) and left to act for 24 h [23]. Next, ultrapure water was passed

through the capillary column (5 min) followed by 2% (v/v) APTS prepared in anhydrous acetone (15 min), water (5 min) and methanol (5 min) to eliminate the excess of APTS. In the next step, 10% (v/v) glutaraldehyde dissolved in 50 mM borate buffer at pH 9.0 was passed through the capillary for 10 min. Then, c-CNTs (5 mg/mL) dispersed in 4.5 mL of dimethylformamide containing 0.5 mg of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide was passed through the capillary for 30 min. Finally the capillary was rinsed with water to remove the unreacted c-CNT

2.4. IT-SPME Procedure and Chromatographic Conditions

The injection loop of an injection valve was substituted for a 40 cm of GC capillary column of PDMS functionalized with c-SWNTs and c-MWNTs. The PDMS capillary columns used in this work were TRB-35 (35% diphenyl and 65% PDMS) and TRB-5 (5% diphenyl and 95% PDMS) (0.32 mm i. d. y 3.0 μm adsorbent thickness). Capillary connections to the valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeve of 1/16 in. polyether ether ketone (PEEK) tubing; 1/16 in PEEK nuts and ferrules were used to complete the connections. The schematic diagram of the IT-SPME system is shown in Figure 1. Aliquots of 4 mL of standard solutions of triazines (50 $\mu\text{g/L}$), and pyriproxyfen (50 $\mu\text{g/L}$) and 2 mL of PAHs (up to 100 $\mu\text{g/L}$) were manually loaded into the system by means of 1.0 mL precision syringe. A clean-up step was also carried out by injecting 50 μL of ultrapure water after the sample loading. The analytes injection was performed by rotating the valve to the inject position.

The analysis of triazines was carried out in isocratic elution mode using acetonitrile: water (70:30). Gradient elution mode was used for PAHs chromatographic separation: the percentage of acetonitrile was increased from 70% at zero min to 90% at 10 min, then to 100% at 24 min; and decreased to 70% at 27 min. Pyriproxyfen were also analyzed in gradient elution mode: acetonitrile and water, in this case, the initial percentage of acetonitrile was 70%; this percentage was increased to 100% at 8 min, remained constant until 18 min, and then decreased to 70% at 20 min. In all the cases the flow rate was 10 $\mu\text{L/min}$. Acetonitrile and water were filtered through 0.45 μm nylon membrane before use.

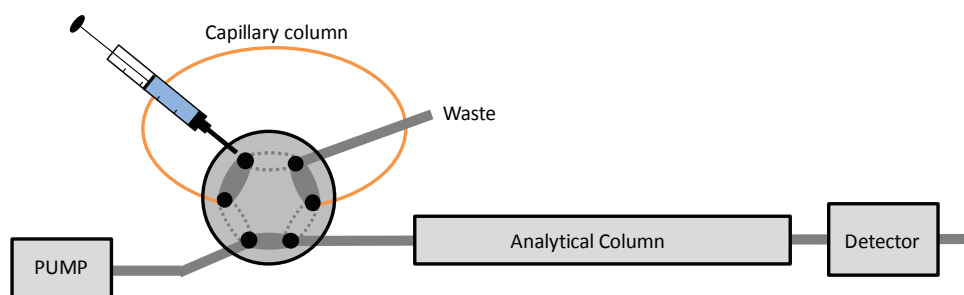


Figure 1. Schematic diagram of IT-SPME-Cap-LC-DAD system.

2.4. Functionalization of the Capillary Columns

SWNTs and MWNTs were carboxylated prior to the CNTs immobilization on the capillary column inner surface. Figure 2 shows the structure and diameters of the CNTs used in this work. Carboxylation of CNTs was carried out following the procedures described in [21,22] for SWNTs and MWNTs, respectively. Briefly, to prepare c-SWNTs, 5 mL of H₂SO₄:HNO₃ (3:1) were added to 0.025 g of SWNTs and ultrasonicated for 90 min (50 W, 60 Hz). Then, this mixture was diluted with water (500 mL) and filtered through a 0.45 μm cellulose acetate filter. Finally, c-SWNTs were washed with 1 M HCl and left to dry at room temperature. The c-MWNTs were prepared by adding 80 mL of H₂SO₄:HNO₃ (3:1) to 0.020 g of MWNTs, and ultrasonicated for 5 h. Next, the suspension was diluted with water (1.5 L), filtered and washed with water [22].

The following step was the c-CNTs immobilization on the inner surface of the PDMS capillary columns (see Figure 2). Firstly, activation of the PDMS capillary column was carried out. For this purpose, the column was rinsed with a NaOH solution (2 M) and left to act for 24 h [23]. Next, ultrapure water was passed through the capillary column (5 min) followed by 2% (v/v) APTS prepared in anhydrous acetone (15 min), water (5 min) and methanol (5 min) to eliminated the excess of APTS. In the next step, 10% (v/v) glutaraldehyde dissolved in 50 mM borate buffer at pH 9.0 was passed through the capillary for 10 min. Then, c-CNTs (5 mg/mL) dispersed in 4.5 mL of dimethylformamide containing 0.5 mg of 1,3-dicyclohexylcarbodiimide was passed through the capillary for 30 min. Finally the capillary was rinsed with water to remove the unreacted c-CNTs.

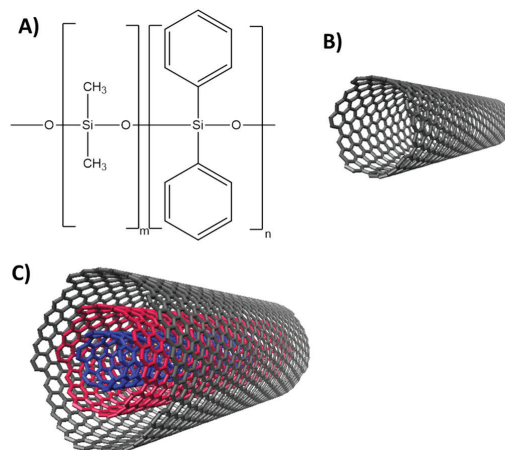


Figure 2. A) Equivalent phase of a PDMS_{TRB-5} and PDMS_{TRB-35} capillary columns coating, B) SWNTs diameter=0.7-104 nm and C) MWNTs diameter=7-15 nm.

Table 1. Structure of target analytes and Limit of Detection (LOD) achieved with different capillary columns using the synthesized capillary columns.

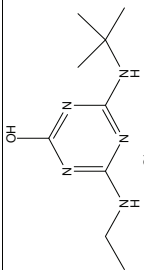
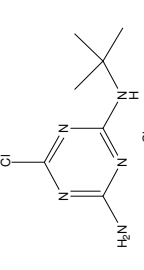
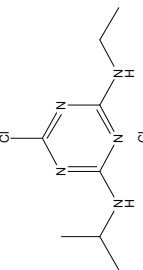
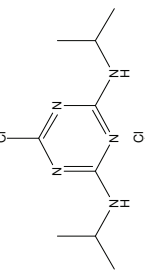
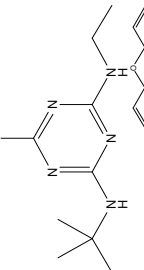
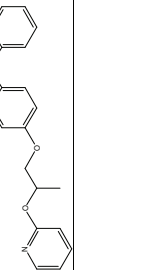
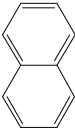
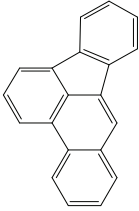
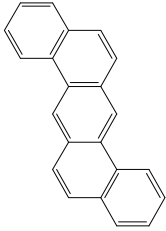
NAME	STRUCTURE	L.O.D. (µg/L)					
		PDMS _T RB-35	c-SWNTs- PDMS _{TRB-35}	c-MWNTs- PDMS _{TRB-35}	PDMS _{TRB-5}	c-SWNTs- PDMS _{TRB-5}	c-MWNTs- PDMS _{TRB-5}
Terbuthylazine-2-hydroxy (2-OH-TBA)		3.5	16	14	5	7	12
Terbuthylazine-desethyl (DES-TBA)		4	6	7	4	7	9
Atrazine		1.2	3	4	3	1.3	2
Propazine		0.7	1.9	5	1.1	1.1	2
Terbuthylazine (TBA)		0.4	0.8	1.3	0.5	0.4	0.6
Pyriproxyfen		0.1	0.06	0.05	0.08	0.08	0.07

Table 1. Cont.

NAME	STRUCTURE	L.O.D. (µg/L)							
		PDMS _T RB-35	c-SWNTs- PDMS _{TRB-35}	c-MWNTs- PDMS _{TRB-35}	PDMS _{TRB-5}	c-SWNTs- PDMS _{TRB-5}	c-MWNTs- PDMS _{TRB-5}		
Naphthalene		0.15	0.23	0.33	0.23	0.06	0.07		
Benzo[b]fluoranthene		0.35	0.37	0.21	0.17	0.03	0.07		
Dibenzo[a,h]anthracene		3.85	0.33	0.83	0.88	0.14	0.29		

3. Results and Discussion

3.1. Characterization of *c*-CNTs and Capillary Columns

Characterization of *c*-CNTs after the carboxylation process was carried out by ATR-FTIR. Figure 3 shows the registers obtained for *c*-SWNTs and *c*-MWNTs. Besides to the CH₂ band at 1360 cm⁻¹, absorption bands at 1120 and 1710 cm⁻¹ were in correspondence with C–O and C=O stretching, respectively, corroborating the existence of carboxyl groups in the functionalized SWNTs and MWNTs [21,22].

Figure 3c and Figure 3d depict the SEM micrographs of the inner surface of *c*-SWNTs-PDMS_{TRB-5} and *c*-MWNTs-PDMS_{TRB-5} capillary columns, showing the resulting coating on the surface of the capillary column. It should be remarked, that the coatings were homogeneous all along the capillary columns. A similar coating was observed in the case of *c*-CNTs-PDMS_{TRB-35} capillary columns (micrographs not shown).

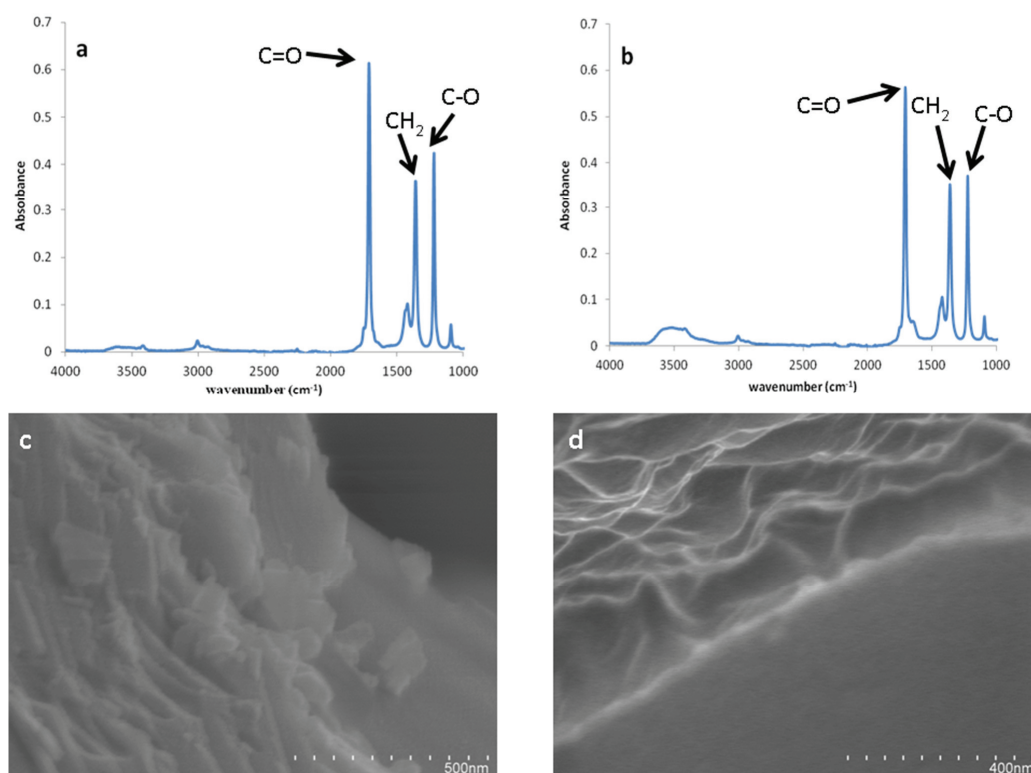


Figure 3. IR spectra of (a) *c*-SWNTs, (b) *c*-MWNTs, and SEM micrographs of (c) *c*-SWNTs-PDMS_{TRB-5} and (d) *c*-MWNTs-PDMS_{TRB-5}.

3.2. Study of the Extraction Capability of the *c*-CNTs-PDMS coated capillary columns for Nitrogen Heterocyclic Compounds

The target analytes were 2-OH-TBA, DES-TBA, propazine, atrazine, TBA and pyriproxyfen. 4 mL of a mixture of triazines (50 $\mu\text{g/L}$) and pyriproxyfen (10 $\mu\text{g/L}$) were processed in the IT-SPME-Cap-LC system. Figure 4 shows the analytical responses of the triazines obtained with the different capillary columns. Table 1 summarizes the limits of detection (LODs) under the experimental conditions described in Section 2.3. The LODs were experimentally established as concentrations that produced a peak with a signal to noise ratio of 3.

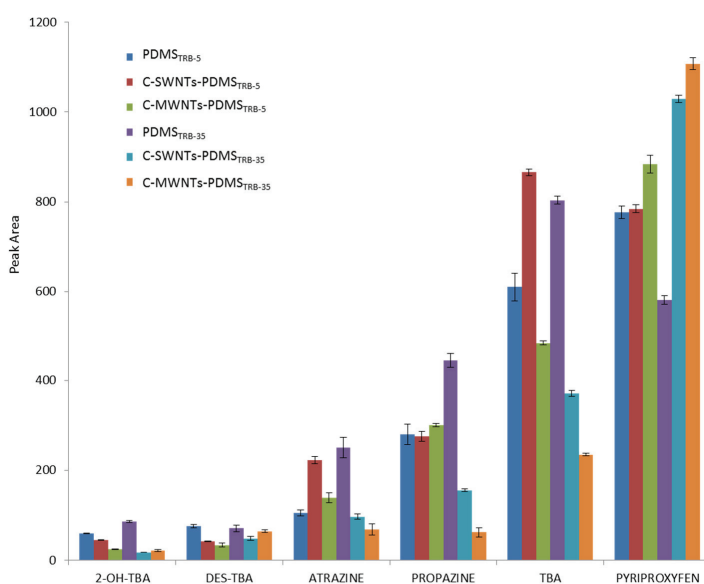


Figure 4. Analytical response of triazines (50 $\mu\text{g/L}$) obtained with PDMS and c-CNTs-PDMS coated capillary columns and employed to perform IT-SPME.

Figure 4 and Table 1 show that the use of commercial PDMS_{TRB-35} capillary columns for triazines extraction was advantageous compared with the use of PDMS_{TRB-5}. PDMS_{TRB-5} coating contains a 5% phenyl groups that provides a characteristic affinity towards aromatic rings while the percentage of phenyl groups in the PDMS_{TRB-35} coating is higher which increases the polarity of the capillary column. Therefore, the extraction of triazines was favored when the PDMS_{TRB-35} capillary column was used. In the case of pyriproxyfen the extraction efficiency was slightly better with the PDMS_{TRB-5} capillary column. In fact, a better LOD value was achieved with this capillary coating (see Table 1).

The results obtained with the c-SWNTs or c-MWNTs-PDMS coatings must be addressed considering the affinity of the PDMS capillary towards triazines but also the interactions that the c-CNTs-PDMS capillary coatings can establish with the triazines. CNTs can interact with triazines through π - π interactions, however in this work c-CNTs have been used and then, ion exchange interactions and hydrogen bonds could also be involved [19].

Experimentally, it was observed that the presence of c-CNTs in the PDMS_{TRB-35} capillary column resulted in a decrease of the analytical response for triazines, and so an increase of their LODs (see Figure 3 and Table 1). However, the pattern for both, PDMS_{TRB-5} and c-CNTs-PDMS_{TRB-5}, was different. Similar or better results were obtained for atrazine, propazine and terbutylazine with the c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} capillary column than those achieved with PDMS_{TRB-5} capillary column. This slight improvement on this extraction could be explained considering π - π interactions, since hydrogen bonds and ion exchange would provide a more significant increase on the extraction efficiency. Similar results were obtained with PDMS_{TRB-35} and c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} for trade triazines. In the case of pyriproxyfen, Table 1 show that the c-MWNTs-PDMS_{TRB-35} capillary coating was the best option since the LOD was lower compared with the other studied capillary coatings. Probably, this enhancement was also due to the π - π interactions between the aromatic systems of the analyte and the c-CNTs immobilized on the surface of the capillary column [24]. 3.4.

3.3. Study of the absorption capability for chlorpyrifos

The influence of c-CNTs on the PDMS sorbent was also evaluated for an organophosphorous compound such as chlorpyrifos. 4 mL of chlorpyrifos solutions were processed in the IT-SPME-Cap-LC system. The variation of the LOD is shown in Table 1. As can be seen, slight differences were found when using the different studied capillary columns, being the c-MWNTs-PDMS_{TRB-5} capillary column the one that shown the lower LOD. The improvement on the extraction capability of CNTs, in particular when using MWNTs, for this analyte has been previously described by several authors [25,26], However, in our case the use of c-SWNTs or c-MWNTs did not significantly enhance the adsorption capability of this compound, since the recovery value (absolute recovery 14%) [27] achieved with the commercial PDMS_{TRB-5} or PDMS_{TRB-35} capillary columns was comparable to that obtained with the c-CNTs functionalized PDMS_{TRB-5} or PDMS_{TRB-35} capillary columns (<16%).

3.4 Study of the Extraction Capability of the c-CNTs-PDMS capillary columns for PAHs

PAHs include a number of hydrocarbons compounds with very polarity Naphthalene, benzo[b]fluoranthene and dibenzo[a,h]anthracene were chosen as target analytes (100 μ g/L). Noted that the retention times at the experimental chromatographic conditions were $t_r=5.2$ min, $t_r=13.5$ min and $t_r=23$ min for naphthalene, benzo[b]fluoranthene and dibenzo[a,h]anthracene, respectively (see experimental conditions in Section 2.3) As it was expected, the use of the commercial PDMS_{TRB-5} capillary column provided better results than the PDMS_{TRB-35} column for the more apolar PAHs, while the PDMS_{TRB-35} capillary was more adequate for the more polar PAHs (Figure 4 and Table 1). These results can be explained by the lower polarity of the PDMS_{TRB-5} compared with the PDMS_{TRB-35} capillary.

The presence of c-CNTs on the surface of the PDMS capillary columns gave rise to differences on the polarity and interactions with the analytes that resulted in differences on the analytical response, and so on the LODs. As can be seen in Figure 4, the extraction efficiency of the PDMS for PAHs compounds was strongly enhanced by the presence of c-CNTs in the case of TRB-5, particularly when

c-SWNTs were immobilized on these capillaries. This improvement can be explained by the π - π interactions between the aromatic rings of the PAHs and the c-CNTs.

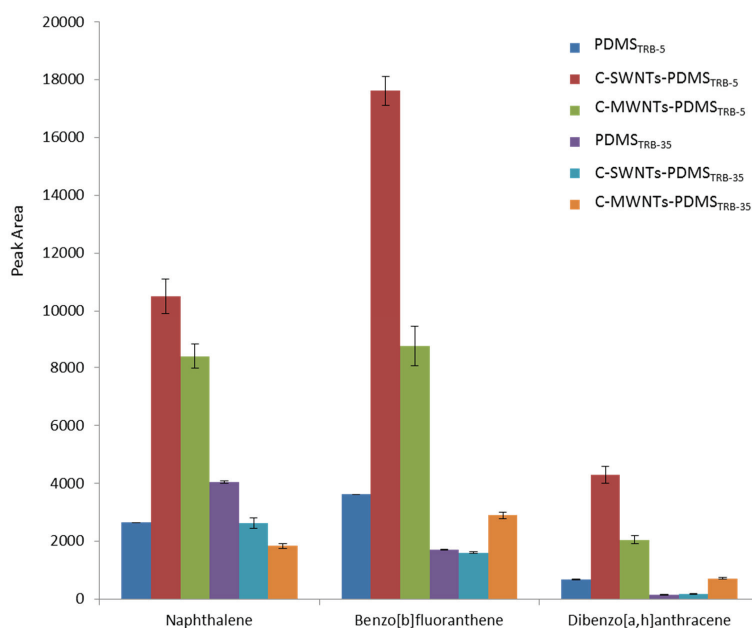


Figure 5. Analytical response of PAHs with PDMS and c-CNTs-PDMS capillary columns used for IT-SPME.

3.5. Precision

Precision was evaluated for all the analytes at concentration levels of 50 $\mu\text{g/L}$ for triazines and pyriproxifen and 100 $\mu\text{g/L}$ for PAHs. Relative standard deviations (%RSD) obtained for the different capillary coatings are shown in Table 2. Run-to-run %RSD values were lower than 9%. These results indicated that satisfactory %RSD values were achieved with all the capillary columns studied. Capillary-to-capillary precision was also evaluated. For this aim, we compared the extraction efficiency obtained for a mixture of the triazines (50 $\mu\text{g/L}$) or PAHs (100 $\mu\text{g/L}$) with two c-CNTs-PDMS capillaries columns prepared under identical conditions. Capillary-to-capillary %RSD values were lower than 16% for all the analytes. The low RSD values bear evidence to the fact that the use of c-CNTs-PDMS capillary columns was a reliable and reproducible approach to be employed for IT-SPME extraction.

Table 2. Run-to run relative standard deviation (%RSD) calculated for triazines (50 µg/L) and PAHs (100 µg/L).

	RSD (%)					
	PDMS _{TRB 5}	c-SWNTs- PDMS _{TRB 5}	c-MWNTs- PDMS _{TRB 5}	PDMS _{TRB 35}	c-SWNTs- PDMS _{TRB 35}	c-MWNTs- PDMS _{TRB 35}
2-OH-TBA	1.2	1.8	2	4.3	1.2	6.1
DES-TBA	1.9	1.2	6.5	5.2	4.1	3.8
Atrazine	3.8	3.8	7.7	7.3	6	6.9
Propazine	2.3	3.9	1.1	3.4	2.2	2.1
TBA	1.5	0.9	1.1	1.6	1.8	1.2
Chlorpyrifos	1.4	1.6	3	0.4	0.1	0.4
Pyriproxyfen	1.8	1.2	2.2	1.6	0.8	1.2
Naphthalene	7.3	5.7	4.9	7.6	6.5	5.1
Benzo[b]fluoranthene	8.5	2.8	7.7	2.7	1.5	4
Dibenz[a,h]anthracene	4.2	6.8	6.3	6.4	8.6	4.7

3.6. Evaluation of the preconcentration ration achieved with the c-CNTs-PDMS capillary coating.

A ratio *PR* was defined in order to compare the results obtained from all extractive phases:

$$PR = \frac{PA_{c-CNTs-PDMS}}{PA_{PDMS}}$$

where *PA* is the peak area obtained for the respective capillary column coating. Table 2 shows the *PR* values obtained for each analyte with the c-SWNTs-PDMS and c-MWNTs-PDMS capillary columns and considering the unmodified PDMS phases TRB-5 and TRB-35. From Table 2, it can be concluded that log *K_{ow}* does not mainly explain *PR* factor. For example, TBA and naphthalene have similar polarity (see Table 2) and their *PR* ratios were different. This is a meaningful difference compared with the commercial PDMS columns, where the difference on the polarity is the main mechanism by which the analytes interacts with the capillary column. In the case of c-CNTs-PDMS capillaries other interactions, such as π - π stacking, H bonds or ion exchange interactions can be involved. However, for the model analytes studied in this work, π - π stacking is the interaction that the c-CNTs .

The *PR* values for PAHs were higher than those ratios obtained for the other families of compounds tested, in particular when the c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} was used. Such behavior is attributed to the strong π - π interactions between the aromatic rings of PAHs and the c-CNTs based coating. It should be noted that extraction of PAHs depends on the size of the π -electron conjugated system of organic molecules that are adsorbed on the surface of CNTs [28]. The c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} capillary column provided

the highest analytical response when it was used as extractive phase for IT-SPME-Cap-LC for PAHs and similar responses for trade triazines than TRB-35 coating. However, pyriproxyfen is better extracted by c-MWNTs-PDMS_{TRB-35} and c-MWNTs-PDMS_{TRB-5} capillary columns, respectively, which means that the own interactions with the sorbents could be different to the other compounds studied.

Table 3. Preconcentration rate (PR) achieved the tested target analytes.

	Log K _{ow} [29]	c-SWNTs- PDMS _{TRB-5}	c-MWNTs- PDMS _{TRB-5}	c-SWNTs- PDMS _{TRB-35}	c-MWNTs- PDMS _{TRB-35}
2-OH-TBA	1.82	0.6	0.4	0.2	0.2
DES-TBA	2.30	0.8	0.4	0.7	0.9
Atrazine	2.61	2.1	1.3	0.4	0.3
Propazine	2.93	1.0	1.1	0.4	0.1
TBA	3.21	1.4	0.8	0.5	0.3
Naphthalene	3.37	4.0	3.2	0.6	0.5
Chlorpyrifos	4.96	1.1	1.2	1.1	1.1
Pyriproxyfen	5.37	1.0	1.1	1.8	1.9
Benzo[b]fluoranthene	6.04	4.9	2.4	0.9	1.7
Dibenz[a,h]anthracene	6.86	6.3	3.0	1.2	4.6

4. Conclusions

In the present work, the extraction capability of c-CNTs-PDMS capillary columns has been evaluated as an alternative for their use in IT-SPME-Cap-LC. C-SWNTs-PDMS and c-MWNTs-PDMS coated capillary columns have been successfully synthesized and their analytical performance has been shown for different compounds such as triazines, and PAHs. In addition, the percentage of diphenyl groups (5% and 35%) on the PDMS coating has also been considered.

The enhancement of the extraction efficiency of each coating is a function of affinity of the PDMS coating towards the analytes and the different interactions that can take place between the analytes and the c-CNTs present in the coating material. A significant enhancement of the extraction efficiency of PAHs occurs with the c-CNTs-PDMS capillary columns, and this improvement can be attributed to π - π interactions. The results indicated that this enhancement depends on the presence of biphenyl groups in the PDMS and on the structure of CNTs, c-SWNTs or c-MWNTs. Under the experimental conditions of this work, we have demonstrated that the best extraction for PAHs was achieved with the c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} capillary column. This extractive phase also shows improved results compared with unmodified PDMS_{TRB-5} for trade triazines. Pyriproxyfen are better extracted by c-MWNTs-PDMS_{TRB-35} and c-MWNTs-PDMS_{TRB-5}, respectively. Therefore, it can be concluded that the affinity of the target compounds towards CNTs-PDMS capillary columns depends not only on the polarity (log K_{ow}), but also on the interactions that the analytes can establish with the CNTs. Therefore, the structure of the analytes plays a key role for practical applications of c-CNTs based PDMS coatings for IT-SPME coupled to a chromatographic system. However, if all tested compounds want to be screened the best capillary option is the sorbent c-SWNTs-PDMS_{TRB-5} achieving a good compromise bearing in mind its extraction efficiency.

Acknowledgments

The authors thank to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Grant CTQ2014-26760) and to the Generalitat Valenciana (Grants PROMETEO Program 2012/045) for financial support received.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors and all authors have given approval to the final version.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Aupartová, J.; Mahugo-Santana, C.; Sosa-Ferrera, Z.; Santana-Rodríguez, J.J.; Nováková, L.; Solich, P. Determination of steroids hormones in biological and environmental samples using Green microextraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *704*, 33–46.
2. Eisert, R.; Pawliszyn, J. Automated in-tube solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 3140–3147.
3. Kataoka, H.; Ishizaki, A.; Nonaka, Y.; Saito, K. Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *655*, 8–29.
4. Liu, X.Y.; Ji, Y.S.; Zhang, H.X.; Liu, M.C. Highly sensitive analysis of substituted aniline compounds in water samples by using oxidized multiwalled carbon nanotubes as an in-tube solid phase microextraction medium. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1212*, 10–15.
5. Gonzalez-Fuenzalida, R.A.; Moliner-Martínez, Y.; Verdú-Andrés, J.; Molins-Legua, C.; Herráez-Hernández, R.; Campíns-Falcó, P. Nanoparticle microextraction in sample extraction techniques for biological samples: recent advances and novel applications. Ryan De Vooght-Johnson eBook Editor, Future Science Ltd, unitec House, 2 Albert Place, London, N3 1QB, UK (in press).
6. Moliner-Martínez, Y.; Prima-García, H.; Ribera, A.; Coronado, E.; Campíns-Falcó, P. Magnetic in-tube solid phase microextraction. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 7233–7240.
7. Campíns-Falcó, P.; Coronado-Miralles, E.; Moliner-Martínez, Y.; Ribera, A.; Prima-García, H. Magnetic in-tube solid phase microextraction. Patent 201100823 Spain, **2014**. International application PCT/ES2012/000205.
8. Lijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
9. Xu, J.; Zheng, J.; Tian, J.; Zhu, F.; Zeng, F.; Su, C.; Ouyang, G. New materials in solid-phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* **2013**, *47*, 68–83.
10. Pyrzynska, K. Carbon nanotubes as sorbent in the analysis of pesticides. *Chemosphere* **2011**, *83*, 1407–1413.
11. Valcarcel, M.; Cardenas, S.; Simonet, B.M.; Moliner-Martínez, Y.; Lucena, R. Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes. *Trend. Anal. Chem.* **2008**, *27*, 34–43.

12. Kueseng, P.; Pawliszyn, J. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes/polydimethylsiloxane, anew coating for 96-blade solid-phase microextraction for determination of phenolic compounds in water, *J. Chromatogr. A* **2013**, *1317*, 199–202.
13. Song, X.Y.; Ha, W.; Chen, J.; Shi, Y.P. Application of beta-cyclodextrin-modified, carbon nanotube-reinforced hollow fiber to solid-phase microextraction of plant hormones. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1374*, 23–30.
14. Feng, X.; Li, Y.; Jing, R.; Jiang, X.; Tian, M. Detection of Organophosphorous Pesticides in Soil Sample with Multiwalled Carbon Nanotubes Coating SPME Fiber. *B. Environ. Contam. Tox.* **2014**, *193*, 769–774.
15. Bahzadi, M.; Noroozian, E.; Mirzaei, M. A novel coating based on carbon nanotubes/poly-ortho-phenylenediamine composite for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Talanta* **2013**, *108*, 66–73.
16. Xu, J.; Zheng, J.; Tian, J.; Zhu, F.; Zeng, F.; Su, C.; Ouyang, G. New materials in solid-phase microextraction, *Trend. Anal. Chem.* **2013**, *47*, 68–83.
17. Ali, M.; Zanjani, A.; Ovasis, M. Advances for sensitive, rapid and selective extraction in different configurations of solid-phase microextraction. *Trend. Anal. Chem.* **2013**, *51*, 13–22.
18. Ferial, G.; Amirhassan, A.; Robian, Y. Methods for coating solid-phase microextraction fibers with carbon nanotubes. *Trac-Trend. Anal. Chem.* **2014**, *58*, 133–143.
19. Wang, X.; Li, X.; Li, Z.; Zhang, Y.; Bai, Y.; Liu, H. Online coupling of in-tube solid phase microextraction with direct analysis in real time mass spectrometry for rapid determination of triazine herbicides in water using carbon-nanotubes-incorporated polymer monolith. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 4739–4747.
20. Moliner-Martinez, Y.; Serra-Mora, P.; Verdú-Andrés, J.; Herráez-Hernández, R.; Campins-Falcó, P. Analysis of polar triazines and degradation products in waters by in-tube solid-phase microextraction and capillary chromatography: an environmentally friendly method. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 1485–1497.
21. Suarez, B.; Moliner-Martínez, Y.; Cardenas, S.; Simonet, B.M.; Valcárcel, M. Monitoring of carboxylic carbon nanotubes in surface water by using multiwalled carbon nanotube-modified filter as preconcentration unit. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *48*, 6100–6104.
22. Sombra, L.; Moliner-Martínez, Y.; Cardenas, S.; Valcárcel, M. Carboxylic multi-walled carbón nanotubes as immobilized stationary phase in capillary electrochromatography. *Electrophoresis* **2008**, *29*, 3850–3857.
23. Slentz, B.E.; Panner, N.A.; Lugowaska, E.; Regnier, F. Nanoliter capillary electrochromatography columns based on collocated monolithic support structures molded in poly(dimethyl siloxane). *Electrophoresis* **2001**, *22*, 3736–3743.
24. Wang, X.; Liu, Y.; Tao, S.; Xing, B. Relative importance of multiple mechanism in sorption of organic compounds by multiwalled carbon nanotubes. *Carbon* **2010**, *48*, 3721–3728.
25. Gonzalez-Curbelo, M.A.; Asensio-Ramos, M.; Herrera-Herrera, A.V.; Hernandez-Borges J. Pesticide residue analysis in cereal-based baby foods using multi-walled carbon nanotubes dispersive solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 183–196.

26. Hadjmohammadi, M.R; Peyrovi, M.; Biparva, P. Comparison of C-18 silica and multi-walled carbon nanotubes as the adsorbents for solid-phase microextraction of Chlorpyrifos and Phosalone in water samples using HPLC. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33*, 1044–1051.
27. Campíns-Falco, P.; Verdú-Andrés, J.; Sevillano-Cabeza, A.; Herráez-Hernández, R.; Molins-Legua, C.; Moliner-Martínez, Y. In-tube solid-phase microextraction coupled by in valve mode to capillary LC-DAD: Improving detectability to multiresidue organic pollutants analysis in several whole waters. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2695–2702.
28. Kragulj, M.; Tričković, J.; Dalmacija, B.; Kukovec, Á.; Kóya, Z.; Molnar, J.; Rončević, S. Molecular interactions between organic compounds and functionally modified multiwalled carbon nanotubes. *Chem. Eng. J.* **2013**, *225*, 144–152.
29. Schmitt, P.H.; Garrison, A.W.; Freitage, D.; Kettrup, A. Separation of s-triazine herbicides and their metabolites by capillary zone electrophoresis as a function of pH. *J. Chromatogr. A* **1996**, *723*, 169–177.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Designing Solid Optical Sensors for In Situ Discrimination of Volatile Amines Based on One step Hydrophilic PDMS Preparation

Sensors and Actuators B: Chemical (enviado)

1 Designing Solid Optical Sensors for *In Situ*
2 Discrimination of Volatile Amines Based on One-
3 step Hydrophilic PDMS Preparation.

4 *N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-*
5 *Andrés and P. Campíns-Falcó**.

6 Department of Analytical Chemistry, University of Valencia Dr. Moliner 50, 46100
7 Burjassot, Valencia, Spain. Fax:(+)963543447, E-mail: pilar.campins@uv.es

8 ABSTRACT. We reported an optimal material for embedding chemoresponsive dyes based
9 on modified commercial PDMS. A new approach to impart hydrophilicity to H-PDMS in one
10 step was developed by addition of tetraethyl orthosilicate (TEOS) and in absence of basic or
11 acid aqueous mixtures or hydroxyl-compounds during the PDMS coating process. This
12 incorporation significantly enhances the performance of PDMS-based devices for sensing
13 applications. Novel colorimetric arrays for passive detection and in situ discrimination of
14 volatile amines have been obtained. The limit of detection achieved was $1.5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ for both,
15 dimethylamine and methylamine, suitable to control real working atmospheres. This work
16 has been supported by a PATENT P201300436 [1].

17

18

19

20

21 INTRODUCTION

22 The development of passive colorimetric devices for odorants is a green and cost-effective
23 alternative to the employment of electronic or electroanalytical dispositives and complex
24 technical instrumentations. Colorimetric solid sensors respond to the increasing demand of
25 environmental monitoring programs for *in situ* control of pollutants. Volatile amines are one
26 of these intense pollutants due to their odorous and toxic characteristics. In addition, volatile
27 amines can form nitrosamines which are carcinogenic substances.

28 To design a colorimetric sensor in the terms outlined, it is essential a proper polymeric matrix
29 selection in order to archive suitable sensitivity, selectivity and response time of the sensing
30 probe. While non-permeable polymer [2-5] can provide stability and shelf-life of the
31 embedded dye avoiding sensor response to external parameters like humidity [6-10], sol-gel
32 matrix [11-16], based on orthosilicate hydrolysis and condensation, can allow fast and
33 sensitive response through its porosity. We develop a new optical polymer combines both
34 mentioned characteristics.

35 Polydimethylsiloxane (PDMS) is widely used in industry due to their properties such as: low
36 manufacturing cost, easy fabrication, optically clear, non-toxic, non- flammable, malleable,
37 elastic and gas permeable. In spite of its promising characteristics, PDMS is hydrophobic,
38 which often limits its applicability in different areas. Various methods have been proposed to
39 modify PDMS surface to impart hydrophilicity, for example, UV/ozone [17] or oxygen
40 plasma [18] treatments, and subsequent functionalization or coating of the PDMS surface
41 with hydrophilic polymers [19]. These methods are complex and required several steps.

42 We propose a new approach to impart hydrophilicity to hydride-terminated PDMS in only
43 one step by addition of tetraethyl orthosilicate (TEOS) during the PDMS coating process.
44 Ormosil preparations at present as the literature shows [20-22], require the combination of an

45 inorganic precursor as for example, tetraethyl orthosilicate and a hydroxyl-terminated PDMS
46 as organic modifier, both of them in presence of water under extremely acidic or basic
47 conditions in order to hydrolyze tetraethyl orthosilicate and then, to condense with hydroxyl-
48 terminated PDMS. Acidic or basic aqueous mixtures, hydroxyl-compound or hydroxyl-
49 terminated PDMS for obtaining the “ormosil” are not needed as demonstrated in this paper
50 for the new advanced material proposed in contrast with the general procedures [20-22].

51 Colorimetric tubes are commercial products capable to semiquantitative estimation of some
52 amines (i.e. dimethylamine starting from 5 ppm (v/v)). However, these tubes are based on pH
53 changes and can not discriminate between primary and secondary amines. Some authors have
54 proposed metalloporphyrins immobilized on reverse-phase silica [14, 15] or on hydrophobic
55 membranes [16] for estimating amines optically. Nevertheless, the mentioned devices
56 required an external source for sampling (active sampling) and then, consumption of energy.
57 A summary table of gas amine sensor developed in the last ten years has been attached in
58 order to usefulness of our designed sensor (See Taula 1).

59 The aim of this work was to employ a new strategy for developing solid optical sensors for *in*
60 *situ* monitoring of compounds by passive detection. A new approach for modifying PDMS
61 based on the addition of a more hydrophilic silicon compound into the commercial Sylgard
62 PDMS 184 and also for embedding a chemoresponsive dye during the coating, has been
63 described. Different amounts of tetraethyl orthosilicate (TEOS), as a precursor of sol-gel
64 polycondensation reactions have been tested for obtaining the optimized optical polymer.
65 This approach significantly enhances the performance of PDMS-based devices for different
66 reasons: 1) TEOS modifies the matrix structure but it does not modify its composition so, it is
67 possible to impart hydrophilicity but avoiding undesired reactions into matrix; 2) the stability
68 and inertness remained unchanged in the hybrid matrix, and 3) the matrix protects the
69 embedded dyes and preserves its optical properties. We suggest that TEOS could impart

70 hydrophilicity to hydride-terminated PDMS by giving polarity to the PDMS surface, thus
71 improving the absorption of polar compounds such as volatile amines. A cost-effective
72 approach based on modified PDMS films for optical sensing of the target analytes has been
73 developed (See Figure 1). Visual devices for *in situ* estimation and discrimination of volatile
74 amines in air through passive detection, which are robust, reproducible and stable, are
75 proposed.

76 RESULTS AND DISCUSSION

77 **Morphology performance of films.** The preparation of the devices with Sylgard 184 [24]
78 (See S1 Section in Supporting Information, SI) was inexpensive, easy and rapid. The
79 parameters studied were: 1) matrix composition, using different ratios of PDMS to TEOS, 2)
80 solvent compatibility with PDMS, by testing different kinds and volumes of solvents, and 3)
81 the protocol used to embed dyes into the matrix. Once the film was obtained, properties such
82 as a) response time and intensity to the target amines, b) selectivity and c) stability under
83 different external conditions, were tested.

84 Matrix composition was characterized by using several techniques. The texture was studied
85 by attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR- FTIR) and by ²⁹Si magnetic
86 angle spinning – nuclear magnetic resonance (MAS-NMR) analysis. The PDMS exhibits
87 characteristic IR bands (See Figure 2A), being among the most intense those associated with
88 –CH₃ rocking and Si–CH₃ stretching (753, 785 cm⁻¹), symmetric Si–O (800 cm⁻¹) stretching,
89 asymmetric Si–O stretching (1000-1150 cm⁻¹), symmetric Si–CH₃ deformations at 1257 cm⁻¹,
90 and C–H stretching in –CH₃ (2901, 2960 cm⁻¹). On the other hand, TEOS showed
91 characteristic bands due to –CH₃ rocking, as well as to the Si–O–CH₂CH₃ group (950, 1066,
92 1100, 1167 cm⁻¹). The film F1b (See Table S2 in SI) has been selected as an example of pure
93 PDMS film, and hybrid films F2, F3, F4, F5 (70:30, 50:50, 60:40, 20:80 of PDMS:TEOS

94 respectively) have selected for studying the effect of increasing TEOS ratios in the silica
95 matrix. As expected, the two bands due to the Si-CH₃ of PDMS decrease as the PDMS
96 percentage decreased (from F1b to F4 films in Figure 2A). However, it was observed that Si-
97 O-CH₂CH₃ (950, 1066, 1100, 1167 cm⁻¹) bands due to TEOS disappeared in the hybrid films
98 F2-F4 but still could be observed in F5 (See Fig. 2A). The Si-O band at 1020-1100 cm⁻¹,
99 unambiguously assigned to PDMS, increased as the PDMS ratio decreased. The absence of
100 significant TEOS bands and the increment of asymmetric Si-O band (~1055 cm⁻¹) from
101 hybrid films F2 to F4 could be explained by the occurrence of a sol-gel process (See Fig.S2
102 in SI). Therefore, the TEOS would be hydrolyzed and condensed to form Si-O-Si bonds
103 during the hydrosilylation reaction.

104 For the hybrid film F5 (which contained large amount of TEOS), the IR registers showed the
105 presence of TEOS and the vinyl functionality (Figure 2A). The corresponding band is due to
106 C=C stretch (1597 cm⁻¹) which indicates that silicon elastomer remained unchanged after
107 curing (See in Fig. 1A the C=C band at 1597 cm⁻¹). The peak at 908 cm⁻¹ could be assigned
108 to PDMS: Si-O stretching in Si-OH and the two peaks at 842 and 862 cm⁻¹ could be assigned
109 to the Si-O-Si-CH₃ groups. The intensity of the later two peaks increased from F1b (pure
110 PDMS) to hybrid F2, F3 and F4. If TEOS hydrolysis would occur different processes could
111 take place (See Fig. S2): a) self-condensation of hydrolysed TEOS (derived from absence of
112 bands at 950, 1066, 1100, 1167 cm⁻¹), b) copolymerization of hydrolysed TEOS and PDMS
113 fragments (presence of Si-O-Si-CH₃ bands 842 and 862 cm⁻¹), and c) self-condensation of
114 PDMS-Si-OH groups (presence of PDMS-Si-OH bands at 908 cm⁻¹). Films F2-F4 with lower
115 amounts of TEOS (See SI, Table S2) were efficiently hydrolysed, and PDMS was cured.

116 PDMS chemical link to inorganic silica network was studied by ²⁹Si MAS NMR (See Figure
117 S3). The spectra observed for films F1-F4 were quite similar. Two regions can be

118 distinguished, the organic region (units D) at low field, and the inorganic region (units Q) at
119 high field. In the organic region two band can be observed, a band at -12 ppm due to terminal
120 chain groups $[\text{OSi}(\text{CH}_3)_2]_n$, and the other at -22 ppm, which can be assigned to the group
121 $(\text{SiO}_4)\text{Si}$ present in the cross-linking agent (tetra(trimethylsiloxane)silane at percentages
122 <10% in the SYLGARD 184 silicone elastomer kit. The intensity of this band does not
123 depend on the percentage of PDMS. This observation suggests that TEOS could act as a
124 cross-linking agent if the amount of PDMS decrease (See Table S2), thus facilitating the
125 formation of PDMS (see band at -22 ppm in Figure S3). The band at -80 ppm can be assigned
126 to the presence of Q_3 units as $(\text{SiO}_3)\text{-OH}$, which would demonstrate that TEOS hydrolysis
127 occurs.

128 It is well-known that silicone polymers are susceptible to hydrolysis in the presence of water
129 under extremely acidic or basic conditions as mentioned before. However, the described
130 experiments were not carried out under such severe conditions, so hydrolysis was not
131 expected, but non-hydrolytic process may occur. In this sense, previous works [21,22]
132 indicated that it is possible to produce sol-gel condensation without adding water to the
133 precursor through non-hydrolytic sol-gel process between hydroxyl-compound and
134 alkoxyisoxanes. Hydrolytic process consists of a nucleophilic attack of oxygen of hydroxyl
135 group (-OH) and the loss of the leaving group $-\text{OC}_2\text{H}_5$. Hydroxyl groups were provided by
136 the solvent (ethanol) in F1b film. In PDMS-H/TEOS (F4) the catalyst of the SYLGAR 184
137 kit which could contain traces of water, alcohol or acids; such traces would be sufficient for
138 poisoning catalytic cycle [23] and to trigger hydrolysis reactions.

139 The morphology of films was studied by scanning electron microscopy (SEM). As can be
140 seen in Figure 2B we observed that it is possible to differentiate between films F1b to F4 (See
141 Table S2 for device composition). Hybrid films showed two zones, one corresponding to the

142 surface and the other to the inner part of the polymer (See Fig. 2B). This behaviour is
143 consistent with the properties observed for hybrid films in reference to pure PDMS films, as
144 the elasticity and hydrophilicity, which increased from F1 to F4 films. Elasticity was
145 evaluated qualitatively and hydrophilicity could be estimated from the responses obtained for
146 the amines described below.

147 **Embedding chemoresponsive dyes for volatile amine sensing.** In this work, the
148 chromophore 2-naphthoquinone-4-sulphonate (NQS) was selected as dye to be embedded into
149 the PDMS matrix to discriminate primary and secondary amines. NQS forms different
150 coloured derivatives: brown-grey and orange colours for primary and secondary amines,
151 respectively (See Figure 3A). NQS was embedded using ethanol or chloroform (see Section 2
152 and Table S1 in SI) in pure PDMS or directly from TEOS in the new hydrophilic PDMS
153 material. The 4-(N,N-dioctylamino)-4' trifluoroacetylazobenzene (ETH^T 4001) was tested for
154 detection of tertiary amines (See Figure 3B). In this case, acetone was chosen as solvent to
155 avoid secondary reactions between ETH^T 4001 and hydroxyl groups of ethanol in pure
156 PDMS films.

157 **Effect of films composition on device response.** The films were also evaluated according to
158 their response to amine atmospheres. The best results were obtained for F4 device for
159 primary and secondary amines. The response (color intensity) appears more intensive from
160 F1b to F4, which is in agreement with SEM images (Figure 2B) and hydrophilicity. The
161 responses of F1b, F4, F10, F11 devices (see Table S2) to amines were evaluated through
162 parameters such as amine concentration and exposure time. The responses of methylamine
163 and dimethylamine with F1b and F4 films are depicted in Figure 4. The color of the PDMS
164 device changed from yellow to
165 brown or orange, for primary amine or secondary amine, respectively; the changes could be

166 followed by naked eye, but also quantitative analysis can be carried out by UV-Vis diffuse
167 reflectance measurements. Limits of detection (LODs) for both methylamine and
168 dimethylamine were $1.5 \text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ after 1 h, when NQS-PDMS/TEOS sensing supports were
169 used (see S5 section in SI and Table 3S). It should be noted that LOD could be improved by a
170 factor of 2.5 by extending the exposure time of the passive device to 4 h owing to the
171 increase of the analytical signal (see Figure 4C and 4D). Similar LODs and limits of
172 quantitation (LOQs) were obtained with F1b films (without TEOS) when the exposure time
173 was 8 h (a workday) instead of 1 h used for F4 device. Moreover, the response for ammonia
174 as a possible interfering was also evaluated (see Table S3), the results showed that 24 h were
175 needed to obtain response and then, no interference can be considered. The compounds tested
176 were methylamine, ethylamine, dimethylamine and diethylamine. Each amine exhibited a
177 characteristic colour tone, with brown-grey tonalities for primary amines and orange-red for
178 secondary amines (Figure 3A). Taking into account these results, reproducibility of F4 device
179 was evaluated. The relative standard deviations (%RSD) for response devices ($n=5$) obtained
180 from three different synthesis, were lower than 9 % for each one and near 10 % if a pool
181 ($n=5$) of the three synthesis has been measured.

182 The devices can be used to estimate threshold limit value (TLV) limits for amines (i.e. in 8 h:
183 3.8 mg m^{-3} of air at $20 \text{ }^\circ\text{C}$ and $1.013 \times 10^5 \text{ Pa}$ or 2 ppm (ml m^{-3}) and in short time : 9.4 mg m^{-3}
184 or 5 ppm legislated values for dimethylamine [25]). The European norm establishes sampling
185 a percentage of 25% of the time of exposition (8 h) if the atmosphere is uniform. If the
186 sampling time is 1 h, only two samples are required. The limit of detection expressed as mg m^{-3}
187 considering 60 min as sampling time at 30 mLmin^{-1} were 1.1 for an active sampling
188 method [26]. The passive device F4 proposed in this paper achieves a similar LOD to that
189 obtained by active sampling, without energy consumption. Amine test colorimetric tubes
190 (Dräger) provide a semiquantitative estimation of dimethylamine starting from 5 ppm. This

191 test based on pH changes can not discriminate between primary and secondary amines, and
192 then worse selectivity is achieved and worse LODs too.

193 Tertiary amines do not react with NQS, therefore ETH^t was studied as chemoresponsive dye
194 for trimethylamine and triethylamine (films F8a, F8b and F9). In this case, the color of the
195 device changed from orange to yellow after exposure to 1 g·m⁻³ of trimethylamine and 5 g·m⁻³
196 ³ of triethylamine for 8 hours. The reversibility of ETH^t 4001 reaction showed in solution
197 remains unchanged when this dye is embedded in the polymeric matrix, these devices are
198 reversible.

199 CONCLUSIONS

200 In summary, we have demonstrated that the incorporation of more hydrophilic molecules as
201 TEOS during PDMS curing is a simple alternative to impart hydrophilicity to commercial
202 Sylgard 184. We have studied the film composition by characterization techniques and we
203 suggest that a catalytic non-hydrolytic process of TEOS could trigger a sol-gel process during
204 PDMS curing. The use of aqueous mixtures or hydroxyl-compounds or alkoxy siloxanes for
205 obtaining the organically modified silane has been avoided here. Finally, we have developed
206 a cost-effective and long-term stability sensors for the in situ estimation and discrimination of
207 amines in a passive way, without consumption of energy as active sampling needs. Also the
208 possibility of a dense deployment of passive devices, covering large areas, could provide
209 adequate spatial resolution to reflect the peculiarities of some environments. The limit of
210 detection achieved was 1.5 mg·m⁻³ for both, dimethylamine and methylamine, using F1b and
211 F4 devices for 8 and 1 hour, respectively. It should be noted that dimethylamine, is in the list
212 of priority pollutants in Europe, and it is demonstrated that the passive devices serve to
213 control working atmospheres. Currently, we are investigating the possibility of using the

214 reported methodology for the development of optical devices for *in situ* gas and liquid
215 sensing of other analytes.

216 **Acknowledgements.** The authors are grateful to Generalitat Valenciana (PROMETEO
217 program 2012/045) and MINECO (CTQ2011-26760) for financial support. NJ expresses her
218 gratitude to PROMETEO program for a grant

219

Amine	LODs (ppmv)	Estimation	Dye	Device design	Sampling	Device response	Ref*
Ammonia	0.08 ^a	Amine discrimination	36 commercial dyes: Metalloporphyrins, pH indicators, vapochromic and solvatochromic dyes, metal salt redox indicators	Dyes were immobilized in ormosil solution and were robotic printing on nanoporous polyethylene terephthalate	Active: 2 min at 500 mL/min by multigas analyzer 2030	Difference maps by digital images (Adobe Photoshop)	1
Methylamine	0.01 ^a						
Dimethylamine	0.01 ^a						
Trimethylamine	0.03 ^a						
Butylamine	10	Semi-quantitative	-	Liquid crystals doped with lauric aldehyde	Passive : 30 min of exposure	Dark appearance	2
						The same response for all primary and secondary amines	
Methylamine	10 ^b	Amine discrimination	Synthesized chemoresponsive dye (ETH ^r 4001)	Dye encapsulated into two types of polymer nanoparticles with different polarity and were printed on paper	Active: 20 min at 2000 mL/min	Digital Images (ImageJ)	3
Ethylamine	10 ^b						
Propylamine	50						
Butylamine	50						
Pentylamine	10 ^b						
Hexylamine	10 ^b						
Heptylamine	10 ^b						
Ammonia	< 10	-	Metalloporphyrin	Embedded dye in the plasma polymerised and was sprayed by an ultrasonic atomising nozzle polyethylene terephthalate foil	Active: 50 min at 100 mL/min by mass flow controllers	Response of high humidity	4
Dimethylamine	10	-				Not amine discrimination	
Triethylamine	10	10 - 10000					
Trimethylamine	10	-				Application in fish storage	

Amine	LODs (ppmv)	Estimation	Dye	Device design	Sampling	Response	Ref*
Trimethylamine	20000	Semi-quantitative	Cholesteric crystalline polymers film	Inkjet-printed Liquid Crystalline	Passive: 100 min of amine exposure	Water saturated air improve the sensor response Application in Spoiling codfish	5
Propylamine	90	90 - 320	Tripodal porphyrin	Spin-coating chloroform solutions on glass	Active: 0.5 L/min ⁻¹ by Bronkhorst F-201FV mass flow controllers	Stable for 1 month	6
Aniline							
Butylamine							
Hexylamine							
Methylamine	4 · 10 ⁵	4.5 · 10 ⁵ - 9 · 10 ⁶	Copper phthalocyanines	Spin-casting the solutions onto gold-coated slides and onto silicon substrates using a photoresist spinner	Passive: 10 min of amine exposure	-	7
Dimethylamine	5.4 · 10 ⁵	6 · 10 ⁵ - 1.3 · 10 ⁶					
Trimethylamine	4.5 · 10 ⁵	5 · 10 ⁵ - 10 · 10 ⁶					
Methylamine	1.2	3.9 - 39.7	Commercial naphthoquinone-4-	Embedded dyes into PDMS	Passive: LODs were estimated at 8h	Quantification and discrimination	
Ethylamine	0.8	2.7 - 26.6	sulfonate (NQS) and 4-	tetraorthosilicate	exposure, amine quantification was estimated at 1h and ammonia sensing was taken at 24 h	No affects RH, T°, but the sensor PDMS/TEOS/ET	
Dimethylamine	0.8	2.7 - 26.6				H ⁺ response to OH groups.	
Diethylamine	0.5	1.6 - 16.4	(N,N-dioctylamino)-4'-				
Trimethylamine	71.23	71.2 - 712.3	(trifluoroacetyl)azobenz				
Ammonia	14.10	14.10	ne (ETH ^T 4001)				

a : LODs were estimated by extrapolating observed array response of their Permissible Exposure Limit with are ammonia (50 ppm), methylamine (10 ppm), dimethylamine (10ppm) trimethylamine (10 ppm). b: The sensor fail in discrimination of the amines at 10 ppm. Discrimination of amines at concentrations above 50 ppm is achieved.

References:[1] L. Feng, C.J. Musto, J. W. Kemling, S.H. Lim, W. Zhong, K. S. Suslick. Colorimetric Sensor Array for Determination and Identification of Toxic Industrial Chemicals. *Anal. Chem.* 82 (2010) 9433–9440. [2] X. Ding, K.-L. Yang, Liquid crystal based optical sensor for detection of vaporous butylamine in air. *Sensor Actuators B*. 173 (2012) 607-613. [3] Tamaki Soga, Yusuke Jimbo, Koji Suzuki, and Daniel Citterio Inkjet-Printed Paper-Based Colorimetric Sensor Array for the Discrimination of Volatile Primary Amines. *Anal. Chem* 85 (2013) 8973-8978 [4] N.D.Boscher, T.Bohn, P. Heiera, F. Moisy, B. Untereiner, K. Heinzec, P. Choquet. Optical sensing responses of Cr-III(C)(TPP)(H₂O)-based coatings obtained by an atmospheric pressure plasma method – Application to the detection of volatile amines. *Sensor Actuator B* 191 (2015) 553. [5] J. E. Stumpel, C. Wouters, N. Herzer, J. Ziegler, D.J. Broer, C.W.M. Bastiaansen, A. P. H. J. Schenning An Optical Sensor for Volatile Amines Based on an Inkjet-Printed, Hydrogen-Bonded, Cholesteric Liquid Adv. *Optical. Mater* 2 (2014) 459–464. [6] J. Rosales, J. M. Pedrosa, M. G. Guilléna, T. Lopes-Costa, S.M.A. Pinto, M. J.F. Calvete, M. M. Pereira Optical detection of amine vapors using ZnTriad porphyrin thin films. *Sensor Actuator B*: 210 (2015) 28. [7] V. H. Banimuslem, A. Hassana, T. Basova, A. A. Esenpinar, S. Tuncel, M. Durmus, A. G. Güreklı, V. AhsenDye-modified carbon nanotubes for the optical detection of amines *Sensor Actuator B* 207 (2015) 224-234.

Imparting hydrophilicity to commercial H-PDMS by chemical treatment*	Steps	Materials	Application	Ref*
Hydrogel Adhesion to Polydimethylsiloxane Substrates Using Polysaccharide Glue	<p>The PDMS surface was chemically grafted with alginate:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Oxidation: PDMS-OH 2) Silanization with APTES: PDMS- NH₂ 3) Coupling between amino groups and carboxylic acid: PDMS-alginate 4) Ionic crosslinking with calcium ions or covalent crosslinking with AAD 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sylgard Silicon Elastomer 184 kit 2) Hydrogen peroxide and sulfuric acid 3) 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) 4) Alginate 5) Sulfonated N-hydroxysuccinimide, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) and carbodiimide Adipic acid dihydrazide (AAD) 	Study the effect of external mechanical force on cells adhered to the hydrogel	8
Preparation of an antiadhesive nanofilm onto PDMS by mimicking the glycocalyx	<p>The residual SiH of PDMS was grafted with polysaccharide:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) PDMS was immersed in an aqueous methylatedpolysaccharide solution 2) Sample was washed within several water baths and dried out with air flow 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sylgard Silicon Elastomer 184 kit 2) Methylatedpolysaccharide (methylcellulose) 	Antiadhesive nanofilm for some proteins and bacteria	9
Functionalization of PDMS Elastomer Surfaces Using Thiol-Ene Chemistry	<p>The PDMS was grafted with thiol groups via base-catalyzed equilibration of MTS:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) PDMS disk was soaked in the base/MTS solution during sonication 2) It was washed with methanol and sonicated. 3) It was extracted in fresh DCM and dried under nitrogen. 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sylgard Silicon Elastomer 184 kit 2) (3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (MTS) 3) KOH, methanol and dichloromethane (DCM) 	-	10

Imparting hydrophilicity to commercial H-PDMS by chemical treatment	Steps	Materials	Application	Ref
<p>Polydimethylsiloxane (PDMS)-based parallel device</p> <p>PDMS functionalized with APTES and PEGs:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Silanization by incubation with a solution of H₂O H₂O₂: HCl 2) It was washed with water and dried under a stream of nitrogen. 3) A solution of APTES and PEG-silane was dissolved in ethanol and heated. 4) It was rinsed several times with ethanol and dried under a stream of nitrogen 	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sylgard Silicon Elastomer 184 kit 2) 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) 3) Polyethylene Glycol (PEG-Silane) 4) Lysis buffer 5) Water, hydrogen peroxide, chloroform and ethanol 	<p>Microdevice for the purification and reverse transcription of circulating miRNAs</p>	11	
<p>functionalized aminopropyltriethoxysilane (APTES) alone or mixed with two different neutral glycol poly(ethylene silanes (PEG-s)</p> <p>1) The PDMS and TEOS were stirred and the mixture was left at room temperature for 2-5 dye.</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1) Sylgard Silicon Elastomer 184 kit 2) Tetraethyl orthosilicate (TEOS) 	<p>Optical sensor for in-situ discrimination of volatile amine</p>		

References: [8] C. Cha, E. Antoniadou, M. Lee, J. H. Jeong, W. W. Ahmed, T. A. Saif, S. A. Boppart, and H. Kon. Tailoring Hydrogel Adhesion to Polydimethylsiloxane Substrates Using Polysaccharide Glue. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 6949–6952 [9] W. Mussard, N. Kebir, I. Kriegel, M. Estève, V. Semetey. *Angew. Facile and Efficient Control of Bioadhesion on Poly(dimethylsiloxane) by Using a Biomimetic Approach* *Chem. Int. Ed.* 50 (2011) 10871–10874. [10] J. Zhang, Y. Chen, M. A. Brook. Facile Functionalization of PDMS Elastomer Surfaces Using Thiol–Ene Click Chemistry. *Langmuir* 29 (2013) 12432–12442. [11] C. Potrich, V. Vaghi, L. Lunelli, L. Pasquardini, G.C. Santini, C. Ortone, M. Quaglio, et al. OncomiR detection in circulating body fluids: a PDMS microdevice perspective. *Lab on Chip* (2014) DOI: 10.1039/c4lc00630e.

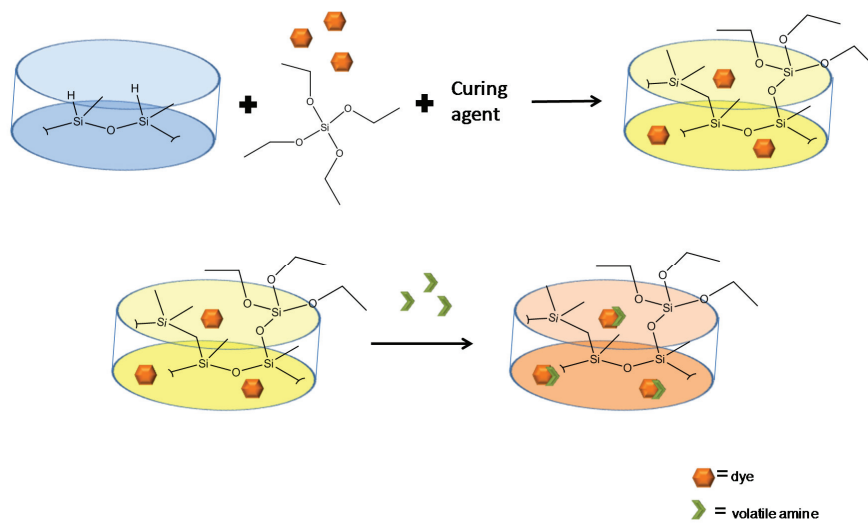


Figure 1. A) Synthesis of devices using chemo-responsive dye dissolved in TEOS and embedded on commercial PDMS, B) Schematic representation of device response to volatile amine.

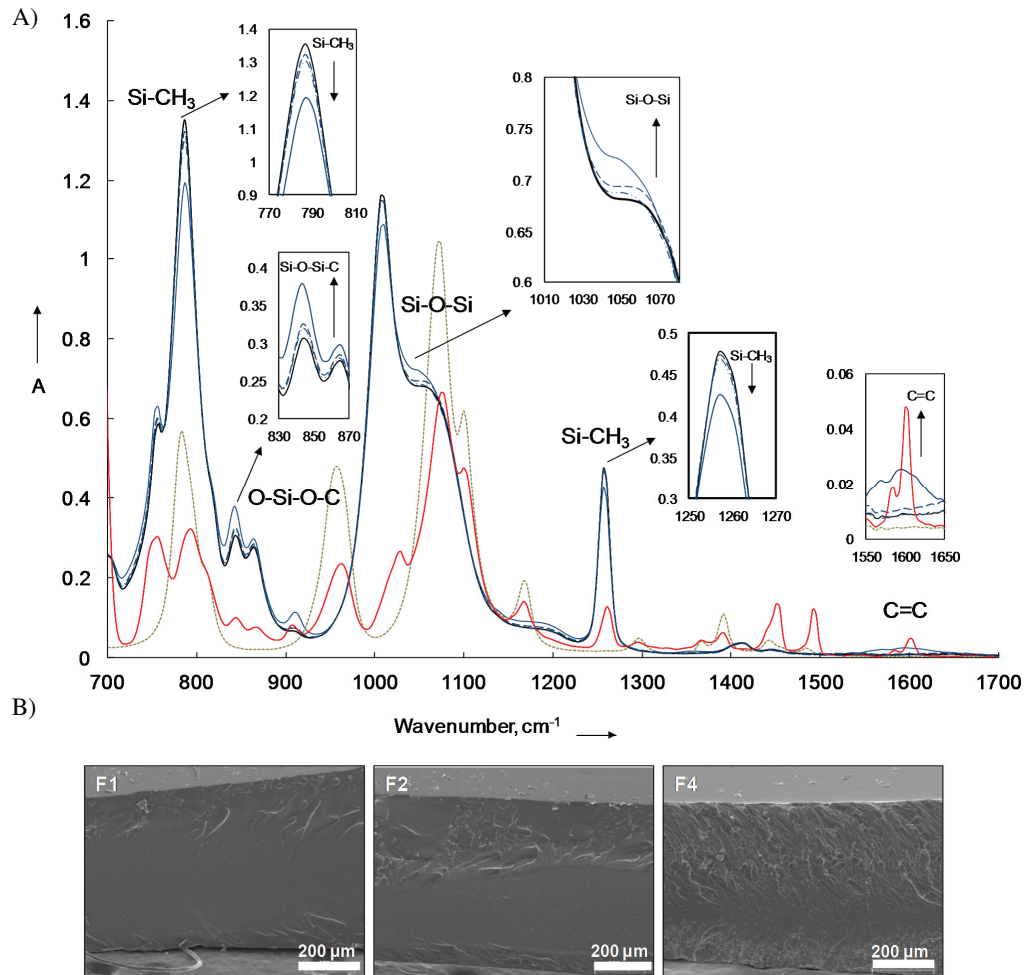


Figure 2. A) FT-IR spectra of pure and hybrid PDMS film ; — F1, - - - F2, - · - F3, — F4, F11 and — F5. Also, TEOS spectra was added B) SEM images of increasing TEOS in films F1, F2 and F4.

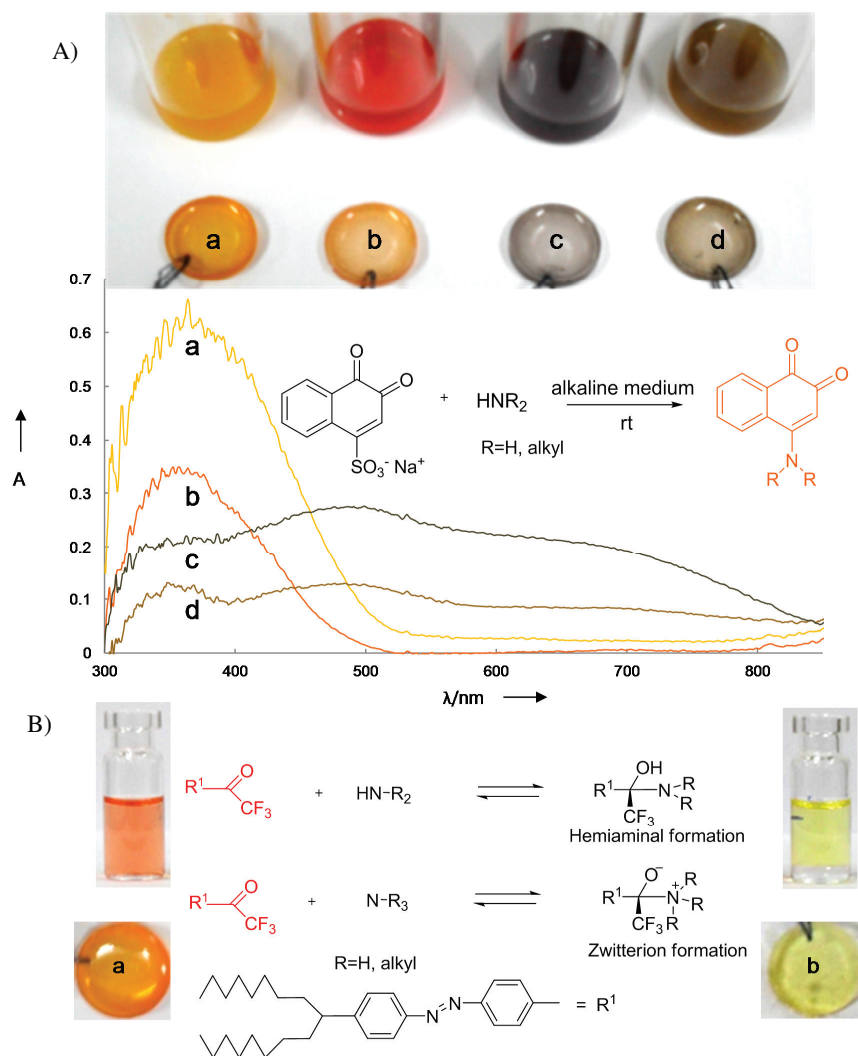


Figure 3. A) Response of 1, 2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) in presence of a) dimethylamine, b) diethylamine, c) methylamine and d) ethylamine in aqueous environment and in air by F1b films. B) Response of 4-(N,N-dioctylamino)-4' trifluoroacetylazobenzenec (ETH^T 4001) in presence of trimethylamine in aqueous environment and in air by F8a film.

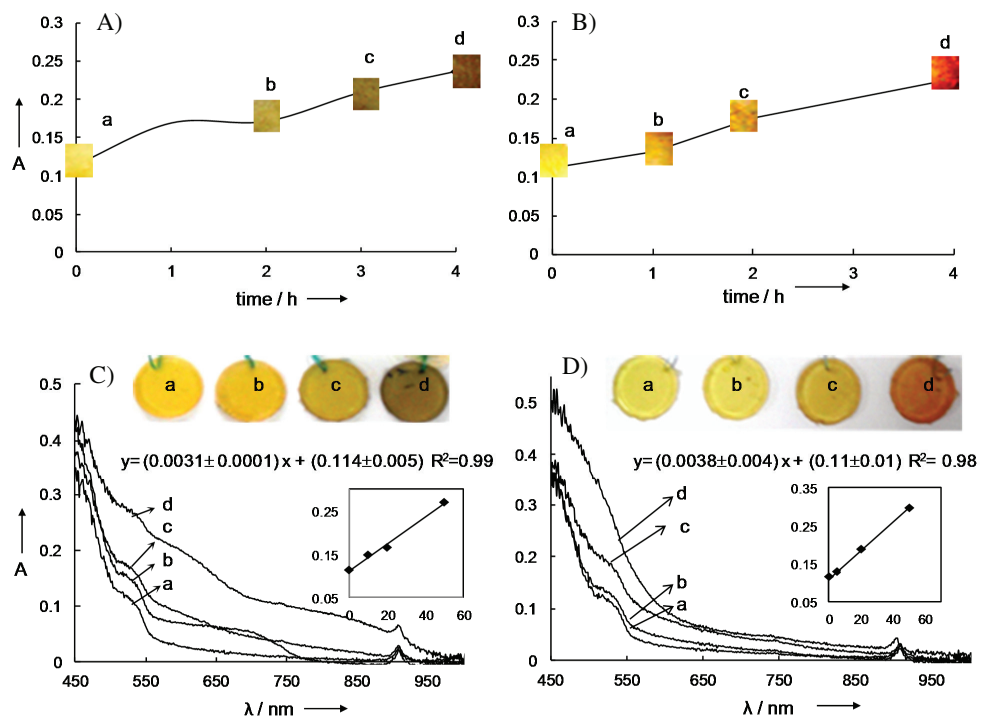


Figure 4. Absorbance representation at 525 nm of F4 response A) methylamine, B) dimethylamine at $5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ during a) 1, b) 2, c) 3, d) 4 hours. Absorbance representation front wavelength of F1b response C), methylamine, D) dimethylamine in concentrations: a) 0, b) 10, c) 20, d) $50 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ during 8h.

REFERENCES

- [1] P. Campíns-Falcó, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, N. Jornet-Martinez. Passive Sensor for In Situ Amines Detection in Atmospheres. Patent P201300436, Spain.
- [2] S.H. Lim, L. Feng, L. W. Kemling, C.J. Musto, S.K. Suslick, An Optoelectronic Nose for the Detection of Toxic Gases, *Nat. Chem.* 1 (2009) 562-567.
- [3] J.W. Kemling, K.S. Suslick, Nanoscale Porosity in Pigments for Chemical Sensing, *Nanoscale*, 3 (2011) 1971-1973.
- [4] S.H. Lim, J.K. Kemling, L. Feng, K.A. Suslick, A Colorimetric Sensor Array of Porous Pigments, *Analyst* 134 (2009) 2453-2457.
- [5] J.H. Bang, S.H. Lim, E. Park, K.S. Suslick, Chemically Responsive Nanoporous Pigments: Colorimetric Sensor Arrays and the Identification of Aliphatic Amines, *Langmuir* 24 (2008) 13168-13172.
- [6] N.A. Rakow, K.S. Suslick, A Colorimetric Sensor Array for Odour Visualization, *Nature* 406 (2000) 710-713.
- [7] M. C. Janzen, J.B. Ponder, D.P. Bailey, C.K. Ingison, K.S. Suslick, Colorimetric Sensor Arrays for Volatile Organic Compounds. *Anal. Chem.* 78 (2006) 3591-3600.
- [8] L. Feng, C.J. Musto, J.W. Kemling, S.H. Lim, W. Zhong, K.S. Suslick, K.S. Colorimetric Sensor Array for Determination and Identification of Toxic Industrial Chemicals, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9433-9440.

- [9] K.S. Suslick, D.P. Bailey, C.K. Ingison, M. Janzen, K.A. Kosal, W.B. McNamara III, et al. Seeing Smells: Development Of An Optoelectronic Nose, *Quím. Nova* 30 (2007) 677-681.
- [10] P.C.A Jerónimo, A.N. Araújo, M. Conceição, B.S.M Montenegro, Optical Sensors and Biosensors Based on Sol–Gel Films, *Talanta* 72 (2007) 13-27.
- [11] C. Rottman, G. Grader, Y. De Hazan, S. Melchior D. Avnir, Surfactant-Induced Modification of Dopants Reactivity in Sol–Gel Matrixes, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 121, 8533-8543.
- [12] A. Lukowiak, W. Strek, Sensing Abilities of Materials Prepared by Sol–Gel Technology, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 50 (2009) 201-215.
- [13] H. Podbielska, A. Ulatowska-Jarza, G. Muller, H.J Eichler, Sol-Gels for Optical Sensors. In *Optical Chemical sensors*. Baldini, F.; Chester, A. N.; Homola, J.; Martellucci, S., Eds.; Springer; Erice, Italy, 2006, pp 353-385.
- [14] C.J Nielsen, H. Herrmann, C. Weller, Atmospheric Chemistry and Environmental Impact of the Use of Amines in Carbon Capture and Storage (CCS), *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 6684-6704.
- [15] Z. Tang, J. Yang, J. Yu, B. Cui, A Colorimetric Sensor for Qualitative Discrimination and Quantitative Detection of Volatile Amines, *Sensors* 10 (2010) 6346-6376.
- [16] N.A. Rakow, A.R. Sen, M.C. Jazen, J.B. Ponder, K.S. Suslick, Molecular Recognition and Discrimination of Amines with a Colorimetric Array. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44 (2005) 4528-4532.
- [17] K. Ma, J. Rivera, G.J. Hirasaki, S.B. Biswal, Wettability Control and Patterning of PDMS Using UV–ozone and Water Immersion, *J. Colloid Interface Sci.* 363 (2011) 371-378.

- [18] H. Mao, W. Wu, D. She, G. Sun, P. Lv, J. Xu, Microfluidic Surface-Enhanced Raman Scattering Sensors Based on Nanopillar Forests Realized by an Oxygen-Plasma-Stripping-of-Photoresist Technique, *Small* 2014, DOI: 10.1002/smll.201300036.
- [19] C. Cha, E. Antoniadou, M. Lee, J. H. Jeong, W. W. Ahmed, Tailoring Hydrogel Adhesion to Polydimethylsiloxane Substrates Using Polysaccharide Glue, *Angew. Chem. International Ed.* 52 (2013) 6949-6952.
- [20] J.R. Askim, M. Mahmoudi, K.S. Suslick, Optical Sensor Arrays for Chemical Sensing: The Optoelectronic Nose. *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 8649-8682.
- [21] J.-S. Kim, S.C. Yang, S.Y. Kwak, Y. Choi, K.-V. Paik, B.S. Bae, High Performance Encapsulant for Light-Emitting Diodes (LEDs) by a Sol–Gel Derived Hydrogen Siloxane Hybrid, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 7954-7960.
- [22] J.-S. Kim, S.C. Yang, B.-S. Bae, Thermally Stable Transparent Sol–Gel Based Siloxane Hybrid Material with High Refractive Index for Light Emitting Diode (LED) Encapsulation, *J. Chem. Mater.* 22 (2010) 3549-3555.
- [23] K.A. Heyries, C.A. Marquette, L.J. Blum, Straightforward Protein Immobilization on Sylgard 184 PDMS Microarray Surface. *Langmuir* 23 (2007) 4523-4527.
- [24] Dow Corning 2006 Material Safety data sheet Sylgard 184.
- [25] European Directive 2000/39/CE, Brussels, 6/8/2000.
- [26] Y. Moliner-Martinez, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández, A Method for the Determination of Dimethylamine in Air by Collection on Solid Support Sorbent with Subsequent Derivatization and Spectrophotometric Analysis, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 17-24.

Supporting Information

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

Designing Solid Optical Sensors for In-situ Discrimination of Volatile Amines Based on One-step Hydrophilic PDMS Preparation **

*N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés and P. Campíns-Falcó **

* Department of Analytical Chemistry, University of Valencia Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain.

Fax:(+):(+)963543447

E-mail: pilar.campins@uv.es

** Acknowledgements. The authors are grateful to Generalitat Valenciana (PROMETEO program 2012/045) and MINECO (CTQ2011-26760) for financial support. NJ expresses her gratitude to PROMETEO program for a grant.

S1. Synthesis of PDMS using Sylgard Elastomer 184.

S2. Effect of solvent on device synthesis.

S3. Devices preparation.

S4. ²⁹Si magnetic angle spinning – nuclear magnetic resonance (MAS-NMR) analysis of PDMS_TEOS films

S5. Amine measurements.

S6. Device stability and selectivity.

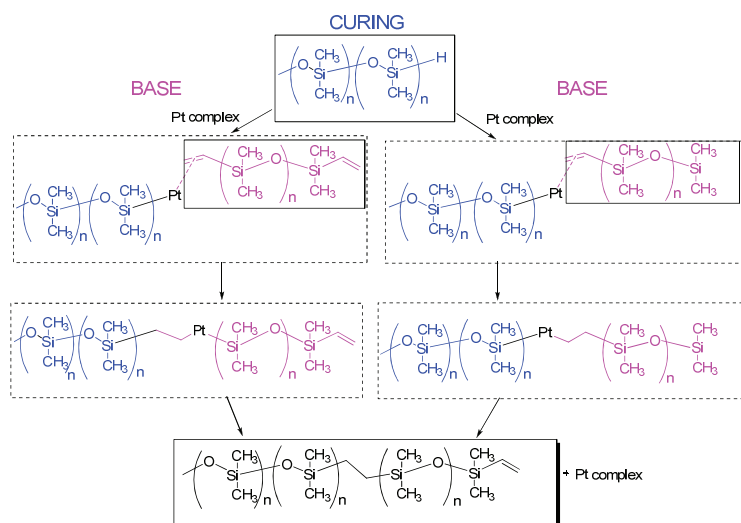
S7. Instruments

S8. Materials

29

30 **S1. Synthesis of PDMS using Sylgard Elastomer 184.**

31 Commercial PDMS Sylgard Elastomer 184 kit contains two parts: a base agent that is
32 dimethylvinyl-terminated dimethyl siloxane and a curing agent that is made of dimethyl
33 methylhydrogen siloxane (Figure S1). Cross-linking of PDMS is based on the reaction between
34 silicon hydride (Si-H) groups and vinyl group (Si-CH=CH₂) in presence of platinum catalyst
35 [1]. The synthesis of PDMS is based on a transition metal catalyzed hydrosilylation reaction.
36 The catalytic cycle has two alternative routes; both routes start with the oxidative addition of
37 hydrosilane ((R)₃-Si-H), followed by the migratory insertion of the coordinated alkene either
38 into the M-H bond (hydrometalation) or into the M-Si bond (silylmetalation). The final step is a
39 reductive elimination, which liberates the product and the recycling catalyst.



40

41

42 **Figure S1.** Synthesis of PDMS using Sylgard Elastomer 184.

43

44

45 **S2. Effect of solvent on device synthesis.**

46 Different solvents with variable polarities were tested in order to establish the compatibilities
 47 for both, dye and PDMS in absence of TEOS (See Table S2). The solvent was chosen
 48 considering: a) its solubility in PDMS, b) the solubility of dye in PDMS, c) it has to be non-
 49 reactive towards the dye, and not to affect the PDMS cross-linking process, and finally, d) its
 50 toxicity. It was observed that when using ethanol (F1a-F1c films, Table S1) and chloroform
 51 (F6) the film required three days to be cured, while with acetone (F8a-b) only one day was
 52 needed. In addition, with chloroform larger volumes of solvent could be used for preparation of
 53 PDMS. The employment of water (F7) lead to loss of colour and the formation of bubbles, thus
 54 defaulting homogenization and gel compaction.

55 The results can be explained through the solubility parameter established in [1] (Table S1). This
 56 parameter is useful for predicting the swelling behaviour of a polymer in a solvent without
 57 knowing any other information about the solvent. Solvents that have a solubility parameter
 58 similar to that of PDMS typically showed high solubility in PDMS both, chloroform and
 59 acetone, non-polar and aprotic solvents, showed high solubility in the polymer. Ethanol, a
 60 solvent with moderate solubility showed compatibility with PDMS using lower amounts than
 61 those that can be used with chloroform. Finally, water ($\delta = 23.4$) showed low solubility in
 62 PDMS ($\delta = 7.3$) as their respective solubility parameters are quite different. It is clear that
 63 PDMS films can be obtained using different types of solvents, provided that a suitable solvent
 64 volume is used. We established that solvents with solubility parameter in the range $9.9 < \delta \leq$
 65 12.9 allow the employment of volumes of $0.35 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ polymer, and solvents with $7.3 < \delta \leq 9.9$
 66 admit up to $0.7 \text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ polymer. In this way, it is possible to extend the methodology to embed
 67 dyes with different solubility, taking in account that different solvent volumes are needed.

68 **Table S1.** Physic-chemical characteristics of the solvents tested.. See table S2 for devices composition.

Device	Solvent	Volume (mL)	Polarity	Solubility parameter (δ , $\text{cal}^{1/2}\text{cm}^{-3/2}$)
F1a	Ethanol	0.7	Polar protic	12.9
F1b-c	Ethanol	0.35	Polar protic	12.9
F6	Chloroform	0.7	Aprotic	9.9
F7	Water	0.35	Polar protic	23.4
F8a-b	Acetone	0.35	Non-polar Protic	9.4
PDMS	-	-	Hydrophobic	7.3

73 **S3. Devices preparation.**

74 Elastomer base and a NQS or ETH^I solution of dye were stirred vigorously to obtain a
 75 homogeneous mixture. Then, SYLGARD 184 curing agent was added and the PDMS
 76 mixture was cured at room temperature for 2-5 days depending on the device (see
 77 results and discussion section for more explanation). Hybrid PDMS devices were
 78 prepared using the same process. When TEOS was used the dyes was dissolved directly
 79 in TEOS in order to avoid the use of additional solvents. Table S2 shows the
 80 composition of the several devices prepared. We prepared the devices in molds and by
 81 weighing, being the optima thickness and diameter 1.2 and 1.5 cm, respectively.

82 *Table S2. Devices preparation.*

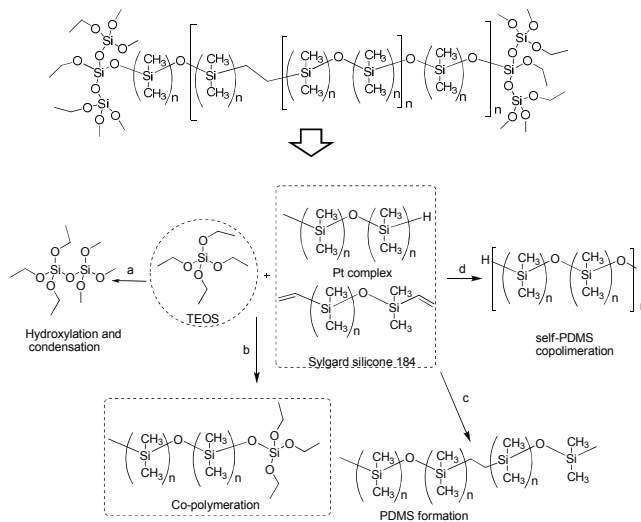
Device	Dye		Solvent		Polymer	
	Type	Mg/g	Type	Vol. (mL)	PDMS%	TEOS %
F1a	NQS	3.4	ETOH	0.7	100	-
F1b	NQS	1.7	ETOH	0.35	100	-
F1c	NQS	0.85	ETOH	0.35	100	-
F2	NQS	1.7	-	-	70	30
F3	NQS	1.7	-	-	50	50
F4	NQS	1.7	-	-	40	60
F5	NQS	0.85	ETOH	0.35	100	-
F6	NQS	3.4	CHCl ₃	0.35	100	-
F7	NQS	1.7	H ₂ O	0.35	100	-
F8a	ETH ^I 4001	0.4	acetone	0.35	100	-
F8b	ETH ^I 4001	1.7	acetone	0.35	100	-
F9	ETH ^I 4001	0.4	acetone	0.35	80	20
F10	NQS	1.7	acetone	0.35	100	-
F11	NQS	1.7	-	-	50	50

83

84

85 Different process could explain the formation of hybrid TEOS_ PDMS: a) self-condensation of
 86 hydrolyzed TEOS, b) copolymerization to hydrolyzed TEOS and PDMS c) PDMS formation
 87 and d) shelf-condensation of PDMS-Si-OH groups.

88

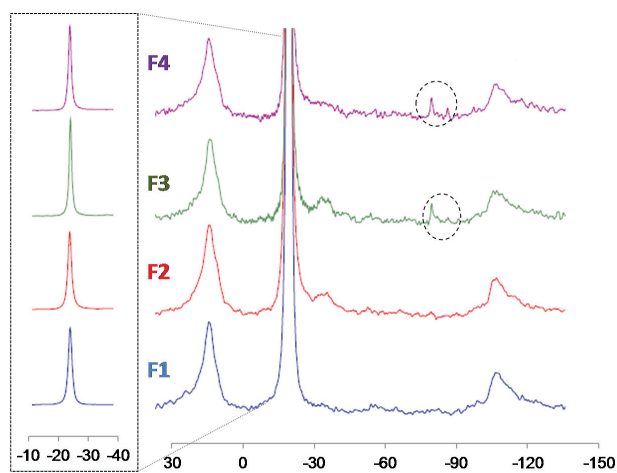


89

90 **Figure S2.** Idealized structure of the hybrid TEOS/PDMS and their possible reactions between
 91 PDMS and TEOS to formation the hydrophilic PDMS material.

92

93 **4S. ²⁹Si magnetic angle spinning – nuclear magnetic resonance (MAS-NMR)**
 94 **analysis of PDMS/TEOS films**



95

96 **Figure S3.** ²⁹Si MAS-NRM spectra of PDMS/TEOS films — F1 — F2 — F3 —
 97 F4.

98

99

100 **S5. Amine measurements**

101 The gaseous standards of amines were generated into a 2000 mL ball glass flask. The
 102 device was suspended into the flask. Aliquots of standard solutions of the amines were
 103 on the bottom of the flask. In order to facilitate volatilization, aliquots of 10 M NaOH
 104 were also placed inside the flask; the resulting mixture was stirred during sampling.
 105 After the sampling, the device was removed from the flaks for visual inspection and
 106 reflectance diffuse measurement.

107

Device	Amine	Color device	Color response	(mg m ⁻³)/ Time(h)	LQ mg·m ⁻³	LD mg·m ⁻³
F4	MeNH ₂	yellow	brown	5-50/ 1	5	1.5
F4	Me ₂ NH	yellow	orange	5-50 / 1	5	1.5
F1b	MeNH ₂	yellow	brown	5-50 / 8	5	1.5
F1b	Me ₂ NH	yellow	orange	5-50 / 8	5	1.5
F1b	NH ₃	yellow	brown	10 / 24	10	3
F8a	MeNH ₂	orange	yellow	50-500/ 8	50	15
F8b	Me ₃ N	orange	yellow	10 ³ - 10 ⁴ / 8	1000	300

108

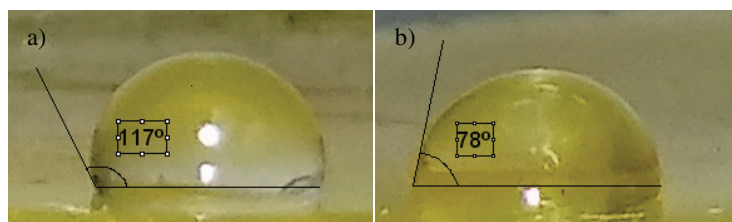
109 *Table S3.* Devices response from amine in air.

110 **S6. Device stability and selectivity**

111 Naphtoquinone-4-sulphonate and (N,N-dioctylamino)-4' trifluoroacetylazobenzece as
 112 many derivatization reagents, is photolabile and unstable at high temperatures.
 113 However, the reagent remained stable inside the silicone polymeric film and no
 114 chemical reaction, crystallization or leaching occurred for several month.

115 Humidity effect was tested by exposing the devices at high humidity conditions. The
 116 performance of PDMS sensors was not affected by humidity because of the
 117 hydrophobicity of the PDMS SYLGARD 184 . However, PDMS:TEOS (60:40) devices
 118 are hydrophilic (the contact angle is <90°) and change color to alcohols and humidity in
 119 over time. Also, hydrophobicity of device was tested. A drop of 10 µL distilled water
 120 was applied to the sample surface and an image was taken after 20s. The angle
 121 mesurement was obtained using ImageJ.

122



123

124 **Figure S4.** Water contact angle on a) unmodified PDMS device and b) PDMS_TEOs (60:40)
 125 device.

126 **S6 Application**

127



128

129

130 **Figure S5.** A) Image of the fish into airtight after 5 days with; 1) a sensor outside of
 131 the bag, 2) sensor inside of the bag and 3) sensor inside of the bag for 6 days.

132

133 **S7. Instruments**

134 All of the spectrophotometric measurements were done on a UV-vis spectrophotometer
 135 HP-8453 (Hewlett-Packard, Avondale, CA, USA) furnished with a 1cm-pathlength
 136 quartz cuvette. Diffuse reflectance measurements were done with the same UV-vis
 137 spectrophotometer equipped with a Labsphere RSA-HP-8453 reflectance spectroscopy
 138 accessory also from Hewlett Packard. Diffuse reflectance spectra were registered from
 139 300 to 850 nm using a certified reflectance standard USRS-99-010 from Labsphere
 140 (Hewlett Packard). Attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR)
 141 spectra were recorded using a Cary 630 FTIR spectrometer equipped with a diamond
 142 ATR sampling accessory from Agilent Technologies (Böblingen, Germany). Spectra
 143 were recorded at a resolution of 4 cm⁻¹. For data collection a MicroLab FTIR software
 144 from Agilent Technologies was used; for data processing a ResolutionsPro software

145 (Agilent Technologies) was used. AVANCE 400 Bruker Spectrophotometer was used for
146 Si magnetic angle spinning–nuclear magnetic resonance (Si MAS-NMR) analysis. SEM
147 images were obtained with a HITACHI-S4100 equipment operated at 20 kV.

148 **S8. Materials**

149 Aliphatic amines: methylamine hydrochloride, ethylamine (70 wt%), dimethylamine
150 (40 wt%), diethylamine (1 wt%) and trimethylamine were purchased from Sigma-
151 Aldrich. Sodium 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate (NQS) and 4-(N,N-dioctylamino)-4'-
152 trifluoroacetylazobenzece, chloroform and Silicon dioxide (5-15 nm spherical particle
153 size, 99.5% trace metal basis) were purchased from Sigma-Aldrich. SYLGARD 184
154 silicon elastomer bases and SYLGARD 184 curing agent were from Dow Corning
155 Corporation. Stock standard solutions of amine were prepared in water ultrapure.
156 Standard solution of derivative reagent 1,2-naphtoquinone-4-sulfonate and 4-(N,N-
157 dioctylamino)-4'-trifluoroacetylazobenzece was prepared at the moment by dissolving
158 solid reagent in a solvent or TEOS

159

160 (1) Stein, J.; Lewis, L.N.; Gao, Y.; Scott, R.A. In Situ Determination of the Active
161 Catalyst in Hydrosilylation Reactions Using Highly Reactive Pt(0) Catalyst Precursors.
162 J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 3693-3703.

163 (2) Lee, J.N.; Park, C.; Whitesides, G.M. Solvent Compatibility of
164 Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. Anal. Chem. 2003, 75, 6544-6554

165

On-site screening of amphetamine and ecstasy type drugs by using a rapid and low-cost colorimetric kit

Talanta (enviado)

1 **ON-SITE SCREENING OF AMPHETAMINE AND ECSTASY TYPE DRUGS**
2 **BY USING A RAPID AND LOW-COST COLORIMETRIC KIT**

3 A. Argente-García, N. Jornet-Martínez, C. Molins-Lagua, Y. Moliner-Martinez, and P.
4 Campíns-Falcó*

5 Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Dr Moliner 50, 46100-
6 Burjassot, Valencia, Spain

7
8 **ABSTRACT**

9
10 Amphetamine and ecstasy type drugs play an important role in European drug market.
11 Therefore, the development of rapid and cost effective methods that allow on-site detection of
12 these illicit substances is necessary for police controls. For this purpose, we have proposed a
13 viable colorimetric kit to determine amphetamine, metamphetamine, 3,4-
14 methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine. The kit is based on a
15 colorimetric sensor of the derivatizing reagent 1,2-naphthoquinone-4-sulphonate (NQS)
16 embedded into Polydimethylsiloxane - Tetraethylortosilicate - Silicon dioxide nanoparticles
17 composite. When the sensor is immersed into powder drug dissolved in basic buffer, a color
18 change of this sensor is observed before 10 min. The NQS reacts with the amino groups of
19 amphetamine compounds inside the polymeric sensor to form different colored derivatives as a
20 function of the amine. By visual inspection, a qualitative analysis and screening between
21 primary and secondary amines can be made. For quantitative purposes, diffuse reflectance
22 spectroscopy and/or color intensity measurements by image-processing software can be carried
23 out. The proposed sensor was applied to an ecstasy sample. Comparable results were obtained
24 by liquid chromatography and polymeric sensor. Satisfactory linearity and precision were
25 obtained by this colorimetric kit. No trained personal is required neither reagent or sample
26 preparation. Thus, the proposed kit allows an *in situ* analysis of illicit drugs for police control
27 owing to its rapidity, simplicity, portability and low-cost.

28
29 **1. Introduction**

30
31 Illicit synthetic drugs have become an important part in the human society, especially among
32 young people. These drugs are popular owing to their stimulating power on the central nervous
33 system. The consumption, production and commercialization of illicit drugs remains today a big
34 problem for many countries. In terms of both production and use, three synthetic drugs
35 dominate the European market: amphetamine (AMP), methamphetamine (MAMP) and ecstasy-
36 type drugs, especially 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDMA). Although AMP has
37 always been more common used than MAMP, there have been recent signs of the increasing
38 availability of MAMP. Under the generic name "ecstasy", MDMA is usually the active
39 substance but tablets sold as ecstasy may contain other methylenedioxyated amphetamines such
40 as 3,4-methylenedioxyamphetamine (MDA) and 3,4-methylenedioxyethylamphetamine
41 (MDEA). It has been observed an increase in the amount of ecstasy tablets, powder and crystals
42 seized and a higher purity of MDMA in these seizures. According to official investigations, the
43 confiscated amounts of amphetamines and ecstasy samples have increased in recent years, with
44 29000, 7000 and 11200 seizures of AMP, MAMP and MDMA, respectively, in 2012 [1].
45 Therefore, there is increasing interest in the development of an affordable, easy-to-use and
46 handheld method that allows police force to detect and identify these illicit substances in the

47 field. The identification and quantification of amphetamine and ecstasy compounds in illicit
48 tablets have been described using several methods such as capillary electrophoresis [2], near
49 infrared spectroscopy [3,4], gas chromatography [5,6] or liquid chromatography [7-9].
50 However, these methods require strict laboratory conditions and trained analytical experts. *In*
51 *situ* methods that improve efficiency in the field and reduce sample backlogs in the laboratory
52 are necessary for police controls. The development of a suitable assay for instant and selective
53 quantification of the most frequency drugs in road-side would take legal action swiftly.
54 Therefore, uncertainly and duress time on suspects are minimized thanks to a workplace
55 screening. Fast detections of illicit drugs have been performed using portable ion mobility
56 spectrometer (IMS) [10, 11]. An alternative method based on surface ionization gas detection
57 has been proposed [12] to avoid the disadvantage of IMS of using radioactive sources for the
58 ionization process. For on-site screening purposes, portable Fourier transform infrared
59 (FTIR)[13] and Raman [14-16] spectrometers have been also developed in recent years. These
60 spectrometers provide a rapid *in situ* screening of active principle as well as the characterization
61 of several excipients and mixtures, without sample treatment. Nevertheless, street drugs are
62 usually modified with excipients (i.e. adulterants or diluents) because they are typically sold by
63 weight. Adulterants are added to mimic the effects of the active substance and thus, increase its
64 perceived quality. On the other hand, diluents are simply added to increase the bulk and
65 consequently, the profits of the drug dealer. Spectral library available is limited owing to the
66 wide range of excipients and their proportions in illicit drugs. This fact difficults the
67 identification of some street drugs. Moreover, these spectrometers are expensive and trained
68 personal is required to interpret some results. Colorimetric tests such as Marquis, Mandelin,
69 Mecke and Simon's test are an inexpensive and fast alternative for on-site screening of
70 suspected illicit substances. The main drawbacks of these tests are usually the use of hazardous
71 reagents, the instability of them in solution and the tedious preparation of reagent solution. A
72 suitable solution to avoid the drawbacks of solution tests is the entrapment of reagents in
73 polymeric matrices in order to develop a sensor. For this purpose, polydimethylsiloxane
74 (PDMS) has been employed for chemosensor fabrication in many recent works [17-23] due to
75 its properties [24,25]: non-toxicity, inertness, stability, ease processing and cost effectiveness.
76 However, the hydrophobicity of PDMS difficults its use for sensors to detect polar compounds.
77 Tetraethyl orthosilicate (TEOS) can be added into PDMS for obtaining organic/inorganic hybrid
78 materials to decrease the hydrophobicity. Silica nanoparticles (SiO₂-NPs) can be also added to
79 increase the matrix porosity and reduce the cracking of the sensor during the drying phase as
80 reported some authors [26,27].

81

82 In the present work, we have developed a kit based on a device of PDMS-TEOS-SiO₂ NPs
83 doped with NQS reagent [28] for the *in situ* analysis of AMP, MAMP, MDMA and MDA. The
84 non-hazard reagent NQS has been selected for derivatizing reagent because it forms colored
85 derivatives with the amphetamine and ecstasy-type drugs due to their amine groups. According
86 to the literature [29,30,31], brown-grey and orange derivatives are formed for primary and
87 secondary amines in alkaline medium, respectively. The color of the device change by
88 immersing it in a vial with sample and basic buffer. Therefore, semiquantitative analysis by
89 visual inspection of the colored devices can be carried out. For quantitative analysis, the color
90 intensity of a digitalized image of the devices or diffuse reflectance measurements of the
91 colored devices can be made. The kit was applied to street ecstasy sample and the accuracy was
92 validate by comparing with liquid chromatography (LC). Characterization of sample was also
93 performed by Fourier Transform Infrared-Attenuated Total Reflectance (FTIR-ATR)

94 spectroscopy. We have also demonstrated the stability of the NQS when is embedded in
95 polymeric matrix, unlike its instability in solution against the time and sunlight to allow an *in*
96 *situ* analysis. Thus, a simple, rapid and cost-effective way to analyze street drugs in the field,
97 without trained personal neither sample treatment, can be carried out by the proposed kit.

98

99 **2. Experimental**

100

101 *2.1 Materials and reagents*

102

103 All the reagents were of analytical grade. Acetonitrile (HPLC grade) and ethanol was purchased
104 from Romil (Cambridge, UK). Amphetamine sulfate, metamphetamine hydrochloride, 3,4-
105 methylenedioxymetamphetamine hydrochloride (MDMA), 3,4-
106 methylenedioxyethylamphetamine hydrochloride (MDE), TEOS, SiO₂-NPs (5-15 nm spherical
107 particle size, 99.5 % trace metal basis), NQS, ibuprofen, acetylsalicylic acid, levamisol
108 hydrochloride, procaine hydrochloride and ephedrine hydrochloride were obtained from
109 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 9-Fluorenylmethyl chloroformate (Fmoc) was
110 purchased by Aldrich (Steinheim, Germany). Sodium hydrogencarbonate, starch and
111 magnesium sulphate were from Probus, (Badalona, Spain). Sodium hydroxide and
112 maltose-1-hydrate were supplied from Panreac (Barcelona, Spain). Paracetamol, caffeine,
113 saccharose and D-lactose monohydrate were obtained from Guinama (Alboraya, Spain).
114 Hydrochloric acid, mannitol and glucose anhydrous (Scharlau, Barcelona, Spain) were also used.
115 PDMS Sylgard® 184 Silicone Elastomer Kit (Sylgard® 184 silicone elastomer base and
116 Sylgard® 184 silicone elastomer curing agent) was provided by Dow Corning (Midland, MI,
117 USA). Ultrapure water was obtained from a Nanopure II system (Sybron, Barnstead). All
118 solutions were stored in the dark at 4 °C to avoid possible decomposition.

119 *2.2 Preparation of solutions*

120

121 For study the stability of the derivatizing reagent NQS and the drug color test, both in aqueous
122 solution, a solution of NQS at 2.4×10^{-4} mol L⁻¹ was prepared by dissolving the compound in
123 distilled water. The solution was freshly prepared each day and protected from light during use.
124 Bicarbonate buffer solution of 8% (w/v) at pH 11 was prepared by dissolving the adequate
125 amount of sodium hydrogencarbonate in distilled water. The pH was adjusted to different values
126 by adding the minimum amount of 10 mol L⁻¹ NaOH or 1 mol L⁻¹ HCl.

127 For liquid chromatography method, stock standard solution of MDMA (100 µg mL⁻¹) was
128 prepared in water. Working standard solutions of the analyte, at concentration ranging from 1 to
129 20 µg mL⁻¹, were prepared by dilution of the stock standard solutions with water. Water was
130 distilled, deionized and filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona,
131 Spain). All solutions were stored in the dark at 2 °C. The 1 mM Fmoc solution was freshly
132 prepared by dissolving the pure compound in acetonitrile. The 0.01 M hydrogencarbonate
133 buffer used in derivatization with Fmoc was prepared by dissolving the appropriate amount of
134 sodium hydrogencarbonate in water, then, adjusting the pH to 10.0 with 10% w/v sodium
135 hydroxide solution.

136

137 *2.3 Apparatus and conditions*

138

139 Spectrophotometric measurements of aqueous solutions were carried out on a Hewlett-Packard
140 8453 diode-array spectrophotometer (Waldbronn, Germany) furnished with a 1cm pathlength
141 quartz cell. The spectral range measured was from 200 to 800 nm. Data system used was
142 UV-Visible ChemStation Software from Hewlett-Packard. All pH measurements were
143 performed on pH-meter model Crison micropH 2000 (Barcelona, Spain).

144 For the spectrophotometric measurements of polymeric sensors, a Cary 60 Fiber Optic
145 UV-Vis spectrophotometer from Agilent Technologies, fitted with the remote fiber optic
146 diffuse reflectance accessory from Harrick Scientific Products (Pleasantville, NY) was
147 used. The DR spectrum was registered in absorbance mode. Spectra were recorded at
148 room temperature in the range of 200-1000 nm. The working wavelength for
149 measurement of the NQS derivatives formed for primary amines was 600 nm, whereas for
150 secondary amines was 525 nm. Data was recorded and processed using Cary WinUV
151 Software (Agilent Technologies). Prior to samples measurement, a background scan was made
152 against a white paper. For polymeric film preparation was also used an ultrasonic bath (300
153 W) from Sonitech, magnetic stirrer (450 W) from Stuart Scientific (Staffordshire, UK) and
154 an oven from J.P.Selecta (Barcelona, Spain). Photographic images were taken by a Nikon
155 CoolPix S2600 digital camera with 14 megapixels and 5x wide optical zoom. These images
156 were imported into the computer and their color differences were analyzed by free image
157 editor software GIMP (version 2.8). Microscopic images of sensors were taken with a
158 Nikon microscope ECLIPSE E200LED MV Series (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) under
159 bright-field illumination and by using 10x objective. Nis-Elements 4.20.02 software
160 (Nikon) was used for acquiring the images.

161
162 To validate the accuracy obtained by polymeric sensor, the chromatographic system
163 consisted of a quaternary pump (Jasco PU-2089 Plus, Tokyo, Japan), a 20 μ L sample loop
164 injector and a six port injection valve (Rheodyne 7725). A fluorescence detector (Jasco FP-
165 2020 Plus Intelligent) was coupled in series and link to a data system (Jasco, ChromNAV
166 Chromatography Data System) for data acquisition and calculation. The analytical signal was
167 recorded from 190 to 400 nm. Excitation and emission wavelengths were 264 and 313 nm. A
168 LiChrospher 100 RP₁₈ column with dimensions of (125 mm \times 4 mm i.d., 5 μ m) purchased from
169 Merck was used for separation of the analytes. The mobile phase used was a mixture of
170 acetonitrile:water in gradient elution mode according to our previous experience [7]: the initial
171 acetonitrile content was 40%, increased to 50 % at 2.5 min, then to 70 % at 5 min, kept constant
172 from 5 to 10 min and then increased linearly from 70 to 100% at 14 min, from 14 min to the end
173 100 % acetonitrile. The mobile phase flow rate was 1.0 mL min⁻¹. All solutions were filtered
174 with 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain), and degassed in an
175 ultrasonic bath before use.

176 Characterization of the sample was carried out with a Cary 630 FTIR spectrophotometer
177 equipped with a diamond ATR sampling accessory from Agilent Technologies (Böblingen,
178 Germany). Spectra were recorded in the frequency range of 4000-600 cm⁻¹ at a resolution
179 of 4 cm⁻¹. For data collection and processing were used MicroLab FTIR and ResolutionPro
180 softwares from Agilent Technologies, respectively. IR spectra were obtained in absorbance
181 mode.

182

183 2.4 Stability of NQS in aqueous solution

184

185 In order to study the stability of the derivatizing reagent used, the effect of various parameters
186 such as sunlight and time were studied. The NQS solution of 2.4×10^{-4} mol L⁻¹, was divided into
187 several separate containers and these were allocated a different storage conditions. For studying
188 sunlight effect, the aqueous solution of NQS (2.4×10^{-4} mol L⁻¹) was exposed to sunlight for a
189 week and, for studying time effect, the solutions were stored in the dark for different times.
190 Then, 0.6 mL of each one was introduced into a quartz cuvette for measuring the UV-Vis
191 spectra against a blank of water. Absorbance was measured at 380 nm at room temperature. The
192 colors produced in each one were observed and recorded.

193

194 2.5 Fabrication of polymeric sensor

195

196 The pure PDMS films (A) were prepared by the following procedure. First, NQS was dissolved
197 in ethanol under ultrasonic condition for 10 min. This NQS solution and PDMS base were
198 stirred vigorously at room temperature for 15 min to get homogeneous dispersion. Then,
199 PDMS curing agent was added with a weight ratio of 1:10 to the PDMS base under vigorous
200 stirring for 15 min at room temperature. Finally, an amount of this mixture was deposited
201 on a plastic molds and was cured at room temperature for approximately 2 days in the
202 dark. Several forms and size of film were assayed in order to improve the time response.
203 Hybrid PDMS films were prepared following a similar process. NQS and SiO₂-NPs were
204 dissolved in TEOS under ultrasonic condition for 10 min. This solution was then added to
205 PDMS base under vigorous magnetic stirring at room temperature for 15 min. Lastly,
206 curing agent was added in a 1(curing):10 (base) weight ratio under vigorous stirring for 15
207 min at room temperature. Finally, the dispersion was poured on a mold, and then was
208 cured in a 30°C oven for days or hours, depending on the film composition. Various weight
209 ratios of PDMS to TEOS were tested: 50:50 (B) and 40:60 (C). All films were stored in dark
210 at room temperature. Composition and form of all films fabricated are shown in Table 1.

211

212 **Table 1**

213 Films composition and form.

Film	NQS (%, w/w)	Ethanol (%, w/w)	PDMS (Base+Curing) (%, w/w)	TEOS (%, w/w)	SiO ₂ -NPs (%,w/w)	Form	
						Square (side; thickness, mm)	Circular (diameter; thickness, mm)
A	0.1	3.6	96.3	-	-	2; 1	3; 1
B	0.1	-	49.9	49.9	0.1	-	3; 1
C	0.1	-	39.92	59.88	0.1	-	3; 1

214

215 2.6 Polymeric device test

216

217 An amount of drug powder was transferred into a glass vial, which contains 1 mL of the
218 hydrogencarbonate buffer (8 %, w/v) at pH 11. Manual agitation was performed to dissolve the
219 compound. Then, the polymeric sensors were added. After 10 min, the sensors were removed
220 from the vial and their color was monitored by diffuse reflectance or digitalized image. For

221 qualitative purposes and screening, visual inspection of colored devices was done. All assays
222 were carried out in triplicate at ambient temperature.

223

224 2.7 *Procedures of quantification by polymeric sensor*

225

226 2.7.1 *Quantification by diffuse reflectance*

227

228 Once the device is colored due to the reaction between NQS and amphetamine or ecstasy
229 compound, the device was placed under the camera of the remote fiber optic diffuse reflectance
230 accessory and the absorbance spectrum was registered. Prior to colored device measurements, a
231 background scan was made against a white paper and a blank was also made with a device only
232 exposed to buffer solution without the analyte.

233

234 2.7.2 *Quantification by color intensity*

235

236 Another procedure based on the color intensity measurements was carried out for a quantitative
237 analysis. Colored devices were firstly photographed using ordinary digital camera programmed
238 without flashlight. The object distance was 10 cm. These photographs were transferred into
239 computer and color differences were analyzed using GIMP (Version 2.8). The color intensity
240 was assessed using the color picker tool on GIMP, with an average of 35x35 pixels close to the
241 center of the circular devices. An area of 100x100 pixels was selected using the ellipse select
242 tool. The red-green-blue (RGB) color mode was applied to transform the images into numerical
243 color values. Color difference patterns were obtained by calculating the difference of the green
244 values at the center of images devices. Green color of each device was picked to describe
245 color difference.

246

247 2.8 *Validation procedures*

248

249 To validate the accuracy of polymeric devices, we applied liquid chromatography with
250 derivatization by FMOC and fluorimetric detection. Based on the literature, this reagent
251 is capable of reacting with amphetamine compounds rapidly at ambient temperature and
252 at basic pH. The procedure was carried out according to our previous work [7] as follows:
253 0.125 mL of the sample and 0.125 mL of the hydrogencarbonate buffer (10 %, w/v) at pH
254 10.0 were placed in a glass vial; next, 0.250 mL of derivatizing reagent was added and the
255 resulting mixture was left to react for 5 min. Finally, aliquots of 20 μ L of the reaction
256 solution were filtered with 0.45 μ m nylon membranes and injected into the
257 chromatographic system. Derivatization was performed at ambient temperature and the
258 sample was assayed in triplicate.

259 For sample characterization and corroborate the results, ATR-FTIR spectra of ecstasy sample
260 and some of its typical adulterants were registered. A small amount of powdered sample and
261 adulterants were placed in contact with the ATR crystal into the spectrophotometer to collect the
262 spectra. A background scan was made against the air, and 8 scans were averaged for each
263 measurement. The crystal surface was cleaned by using a piece of paper.

264

265 2.9 *Analysis of ecstasy sample*

266

267 Illicit tablets were finely powdered and homogenized thoroughly. For the analysis of
268 sample by liquid chromatography, an amount of 6,7 g of the powder obtained from tablets
269 was weighed and dissolved in 50 mL of water under sonication. The resulting solution was
270 further diluted to 250 mL with water. Finally, 20 μ L of this solution was injected into the
271 chromatograph. However, for the analysis by polymeric device an amount of powdered
272 sample obtained from tablets was simply transferred into a glass vial with buffer solution
273 and was dissolved together with the devices. Sample was processed by the two
274 derivatization methods under conditions abovementioned and was assayed in triplicate.

275

276 **3 Results and discussion**

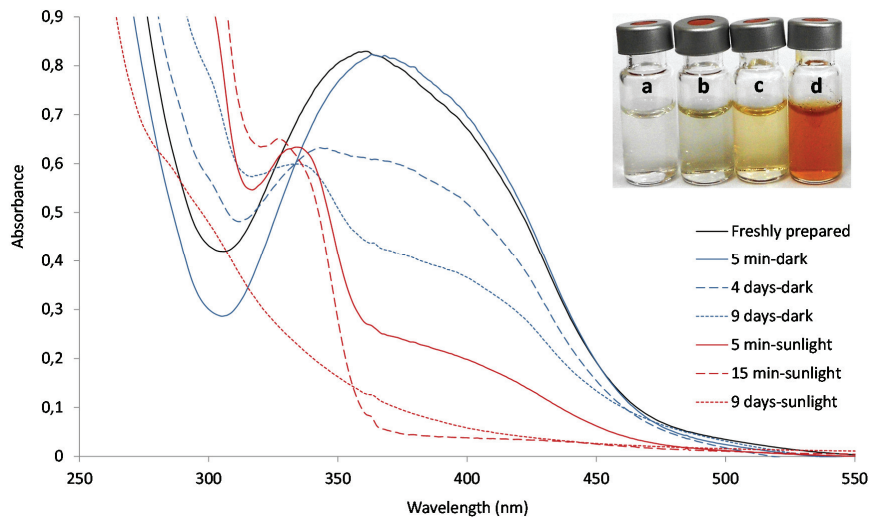
277

278 *3.1 Stability of NQS*

279

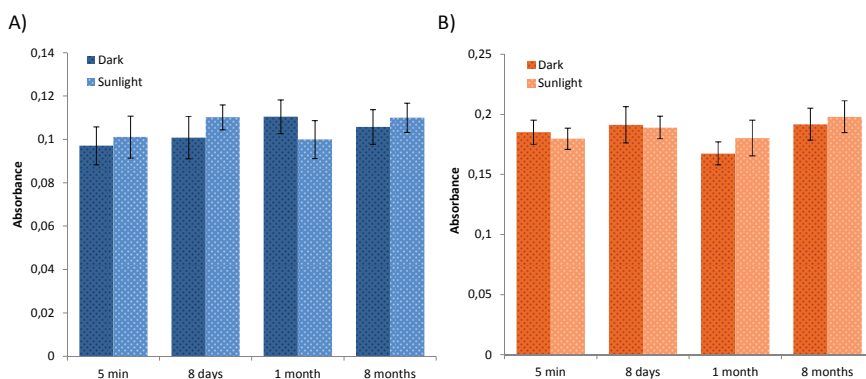
280 The storage stability of the derivatizing reagent in aqueous solution was evaluated by measuring
281 the absorption of the aqueous solution of NQS over time, stored in the dark and exposed to the
282 sunlight. Figure 1 shows the storage stability histogram quantified by the absorption maximum
283 of NQS (380 nm) in response to the two storage conditions over a period of 9 days. A
284 concentration of 2.4×10^{-4} mol L⁻¹ NQS was used in these measurements. The results
285 demonstrated the limited stability of the NQS solution over time, even when stored in the dark
286 at room temperature. The solution stored in the dark showed decrease in response after 1 day
287 and continued to decrease significantly in the next 9 days. When the solution is exposed to
288 sunlight it was observed a decrease of the absorbance during the first 30 min and a decrease in
289 response after 1 day. The recorded spectra revealed a change in the profile spectrum over time,
290 both under darkness and sunlight. It was observed that the absorbance of the band at 380 nm
291 decreased while a band at 330 nm appeared and its absorbance increased over storage time. As
292 can be seen in the photography inside the Figure 1, the NQS solution had a yellow color when
293 was freshly prepared. The reagent turned colorless following storage under sunlight for 5 min.
294 However, after one week the solution returned to a yellowish color and after one month it turned
295 to an intense brown color, even it developed brown precipitates. These color changes were
296 attributed to the instability of the NQS in solution. Hence, we concluded that the application of
297 NQS as a colorimetric reagent in solution would require freshly preparation and storage
298 protected from sunlight. Therefore, the NQS in aqueous solution is limited for on-site analysis
299 in police control.

300



301
 302 **Fig. 1.** Spectra of the stability of NQS in aqueous solution over time under dark (blue lines) and sunlight
 303 storage (red lines). Responses are quantified as the absorbance at 380 nm of 2.4×10^{-4} mol L⁻¹ NQS. Inset:
 304 Photography of colorimetric responses of NQS solution against sunlight at a) 5 min, b) 7 days, c) 0 min,
 305 d) 30 days.
 306

307 However, the NQS remained stable inside the PDMS/TEOS matrix as our research group
 308 reported in previous unpublished work [32]. Excellent storage stability of the sensors over a
 309 period of 8 months was observed. RSD of 5 % was obtained for absorbance measurements of
 310 sensors stored at two different conditions: in the dark and exposed to sunlight (See Fig. 2). On
 311 the other hand, the responsiveness of the sensors after being stored in the dark and exposed to
 312 sunlight was evaluated by measuring the absorbance of sensors after contact with 0.01 g mL⁻¹ of
 313 MAMP in the optimal conditions. As can be seen in Fig. 2, a remarkable responsiveness of the
 314 initial response was retained after 8 months of storage in both darkness and under sunlight (RSD
 315 = 4 %). These results indicate that the NQS is stable over time when it is embedded into a
 316 polymeric matrix regardless of storage conditions tested. Thus, the proposed kit will allow an
 317 on-site analysis of amphetamine and ecstasy type drugs without the requirement of daily reagent
 318 preparation.



321 **Fig. 2.** Stability of the polymeric sensors in two storage conditions over time: in the dark and exposed to
322 sunlight. Responses are quantified as the absorbance of A) Sensors without drug contact, B) Sensors after
323 immersion in 0.01 g mL⁻¹ of MAMP in the optimal conditions. Average responses and standard deviation
324 for n = 3 sensors.

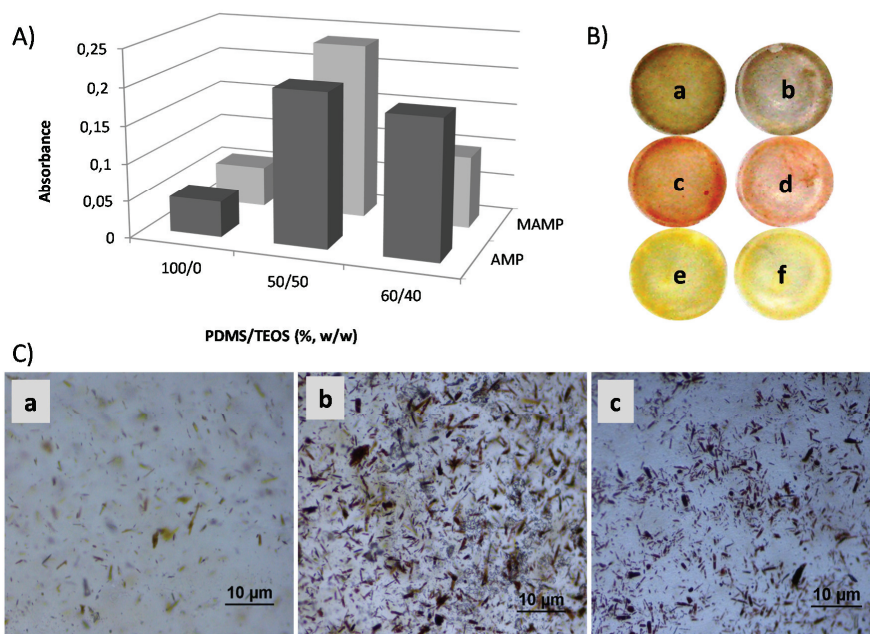
325

326

327 3.2 *Effect of sensor form and composition on the colorimetric response*

328

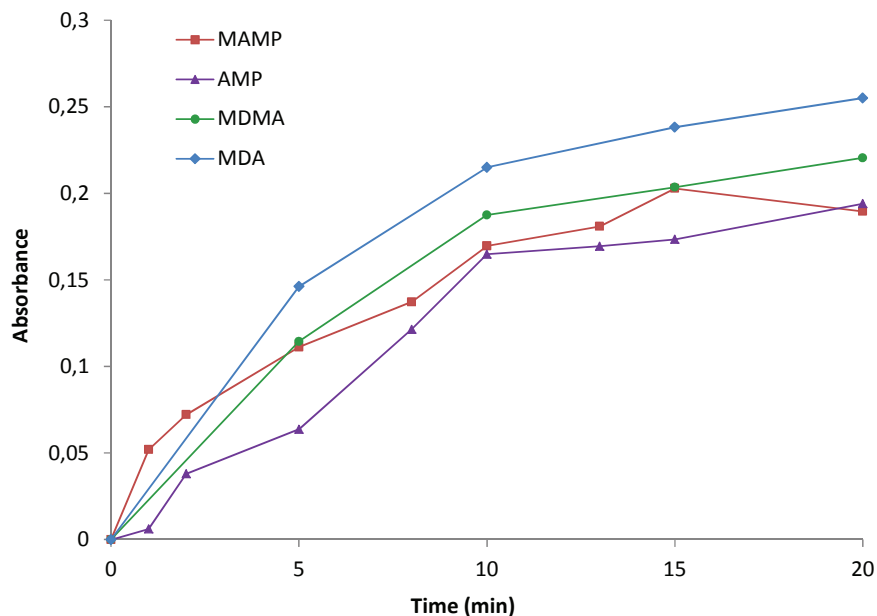
329 Different forms and sizes of the sensor were tested. First, square sensors (2 x 2 mm of side, 1
330 mm of thickness) were assayed with a basic solution of 0.01 g/mL of AMP. It was observed that
331 the coloration began at the edges of the sensor after 5 min but the complete coloration occurred
332 after 20 min. In order to get the fastest response, we fabricated circular sensors for increasing
333 the contact surface. Circular sensors with 3 mm of diameter and 1 mm of thickness were
334 proposed due to the short time required to complete the color change (10-15 min) as well as the
335 low consumption of reagents needed for this sensor fabrication. On the other hand, the sensor
336 composition was studied in order to get the best gelation properties and accessibility of the
337 analyte to the reagent. The pure PDMS films showed gelation after 3 hours at 30 °C. However,
338 PDMS/TEOS films showed an increment of the gelling time of 1 day at 30 °C. Despite the
339 longer gelling time of hybrid films, they provided higher analytical signal because TEOS impart
340 hydrophilicity to the polymeric material for improving the accessibility of our analytes (in
341 aqueous solution) to the chromogenic centers. The amount of TEOS was evaluated according to
342 the analytical response of films exposed to amphetamine compounds. We selected a device with
343 50/50 weight ratio of PDMS/TEOS because it provides the highest analytical signal and more
344 homogeneous color distribution as can be seen in Fig. 3. When TEOS was added, the thickness
345 of the film decreased after drying and the matrix presented a sticky texture. To avoid this, SiO₂
346 NPs at 0.1 % (w/w) were added to the hybrid matrix. From these results, we finally proposed a
347 film with 50/50 weight ratio of PDMS/TEOS, 0.1 % (w/w) of NQS and 0.1% (w/w) of SiO₂
348 NPs.



349
 350 **Fig. 3.** Optimization of the sensor composition. A) Effect of different weight ratios of PDMS/TEOS on
 351 the analytical response. Conditions: 0.01 g mL⁻¹ of AMP and MAMP, 5 min of exposure, sensors with 0.1
 352 % NQS and 0.1 % NPs. B) Photographic images of sensors containing 50/50 (left) and 60/40 (right) of
 353 PDMS/TEOS (w/w) exposed to 0.01 g mL⁻¹ of AMP (a, b) and MAMP (c, d) during 8 min and blanks (e,
 354 f). C) Bright-field microscopy photographs of sensors with different weight ratios of PDMS/TEOS after
 355 contact with 0.01 g mL⁻¹ of AMP during 8 min a) 100/0, b) 50/50, c) 40/60 PDMS/TEOS (w/w), at 10x
 356 magnification.

357
 358 *3.3 Analytical characteristics of sensor*

359
 360 The reaction time between NQS and the amine groups of the different drugs into the sensor was
 361 studied (See Figure 4). For this purpose, the absorbance of colored sensor after contact with
 362 0.02 g mL⁻¹ of drug solution was measured at different times. The color change started after 1
 363 min and continued increasing along the time. The response of the sensor varied with the
 364 compounds studied but typically the signal was higher after 10 min. According to these results,
 365 10 min were selected as a compromise between the signal and analysis time.

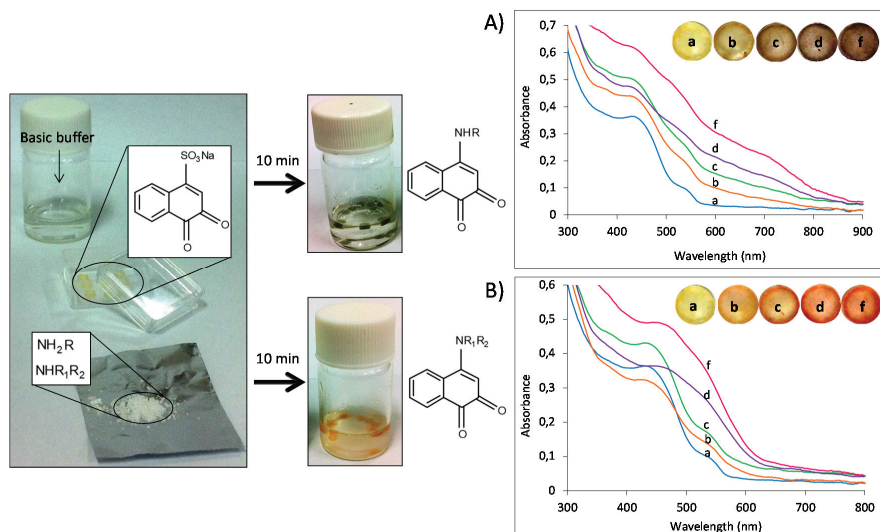


366
367

368 **Fig. 4.** Absorbance at 525 or 600 nm corresponding for the reaction products into the sensor, MAMP and
369 MDMA-NQS or AMP and MDA-NQS, recorded against a reagent blank at different reaction times.
370 Conditions: sensor composition: 0.1 % NQS, 0.1 % NPs, 50/50 PDMS/TEOS; analyte concentration:
371 AMP and MAMP 0.02 g mL⁻¹, MDMA and MDA 0.01 g mL⁻¹.

372

373 The colorimetric kit was tested for the detection of AMP, MAMP, MDMA and MDA. The color
374 of the sensor changed after contact with analyte. As reported in [33], a nucleophilic substitution
375 reaction between the amino group of the drugs and the sulfonate group of the NQS happened in
376 alkaline medium, obtaining colored derivates. Different colors have been observed depending
377 on the amino group: orange for secondary amine groups and grey-brown for primary amine
378 groups (See Fig. 5). The concentration of the amphetamine and ecstasy type drugs can be
379 estimated by naked eyes. For quantification purposes, the absorbance or color intensity of the
380 colored sensors was measured. Figure 5 shows the response as function of the analyte
381 concentration together with photographic images of sensors containing various concentrations.



382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415

Fig. 5. Photographic image of the analysis by the colorimetric kit (composed by a vial with basic buffer, NQS-polymeric sensors and powder drug) for of AMP (above) and MAMP (down) at 0.02 g mL^{-1} , together with absorbance spectra at different concentrations a) blank, b) 0.005 , c) 0.01 , d) 0.03 and f) 0.05 g mL^{-1} of A) AMP and B) MAMP. Inset: photographic image of sensors containing previous concentration levels. Optimal conditions.

The reliability of the proposed procedure was tested by analyzing aqueous solutions containing AMP, MAMP, MDA and MDMA under the proposed conditions. The concentrations studied were in the range $0.0025\text{-}0.05 \text{ g mL}^{-1}$ for amphetamine type drugs and $0.0025\text{-}0.025 \text{ g mL}^{-1}$ for ecstasy type drugs. The linearity was evaluated by plotting the absorbance against the concentration of the analytes. Alternative calibration curve was calculated by using color intensity as the analytical signal. Table 1 shows the figures of merits obtained employing both absorbance and color intensity as analytical signals. Adequate linearity was obtained as can be seen in Table 1. The results obtained indicated that no significant differences in linearity are achieved between both procedures tested. The precision was evaluated by obtaining the intra and inter-day relative standard deviations (RSD) for 0.015 g mL^{-1} of each drug. For the reproducibility, we compared the response of sensors prepared in three different batches under identical conditions. Both procedures gave satisfactory results (See Table 1), RSD values were lower than 15% in all instances. These results indicated that the proposed procedures have adequate repeatability and reproducibility. Better RSDs were achieved by using color intensity as analytical signal. The limits of detection (LOD) obtained were lower than 0.007 g mL^{-1} (calculated as $3s_{blank}/b$, where s_{blank} is the standard deviation of the intercept and b is the slope of linear calibration graph). The differences between the two alternatives were not large.

416 **Table 1.** Analytical data for the determination of AMP, MAMP, MDA and MDMA by two
 417 proposed procedures

Compound	Absorbance (Diffuse Reflectance)				CI (GIMP)			
	Linearity ^a $y = a + bx$	Intra-day (%) (n=3)	Inter-day (%) (n=3)	LOD (g mL ⁻¹)	Linearity ^b $y = a + bx$	Intra-day (%) (n=3)	Inter-day (%) (n=3)	LOD (g mL ⁻¹)
AMP	$a \pm S_a$: 0.050 ± 0.010 $b \pm S_b$: 5.3 ± 0.4 $R^2 = 0.985$	11	14	0.006	$a \pm S_a$: 0.0141 ± 0.0008 $b \pm S_b$: 0.42 ± 0.03 $R^2 = 0.968$	2	7	0.005
MAMP	$a \pm S_a$: 0.119 ± 0.005 $b \pm S_b$: 5.2 ± 0.2 $R^2 = 0.992$	4	15	0.003	$a \pm S_a$: 0.0123 ± 0.0003 $b \pm S_b$: 0.212 ± 0.013 $R^2 = 0.981$	3	7	0.004
MDA	$a \pm S_a$: 0.032 ± 0.003 $b \pm S_b$: 3.7 ± 0.5 $R^2 = 0.982$	10	13	0.006	$a \pm S_a$: 0.0128 ± 0.0003 $b \pm S_b$: 0.13 ± 0.02 $R^2 = 0.983$	7	11	0.007
MDMA	$a \pm S_a$: 0.048 ± 0.006 $b \pm S_b$: 7.9 ± 0.5 $R^2 = 0.996$	7	11	0.002	$a \pm S_a$: 0.0143 ± 0.0003 $b \pm S_b$: 0.28 ± 0.02 $R^2 = 0.994$	5	9	0.003

418 a : ordinate, b : slope, s_a and s_b standar: deviation of the ordinate and slope, respectively, R^2 : determination coefficient,
 419 $RSD_{intra-day}$ and $RSD_{inter-day}$: reproducibility and repeatability, respectively, LOD: detection limit ^aAbsorbance at 525 and 600
 420 nm for secondary and primary amine groups, respectively (in DR mode) vs concentration (g mL⁻¹) ^b1/(green CI) vs
 421 concentration (g mL⁻¹)
 422

423 In order to establish possible interferences, the proposed procedure was applied to other
 424 substances commonly used as adulterants and diluents in clandestine samples. The
 425 compounds examined were caffeine, ephedrine, procaine, paracetamol, ibuprophen and
 426 acetilsalicylic acid, levamisol, starch, mannitol, sucrose, glucose, lactose and magnesic
 427 sulphate (0.005 g mL⁻¹ in the optimal conditions). This selectivity can be visualized by
 428 naked eye. The color of the sensor did not change in the presence of the individually
 429 tested compounds, except for ephedrine and procaine. The reason was the amine groups
 430 of the ephedrine and procaine that could react with NQS. Therefore, no interferences
 431 were observed with the diluents tested.
 432

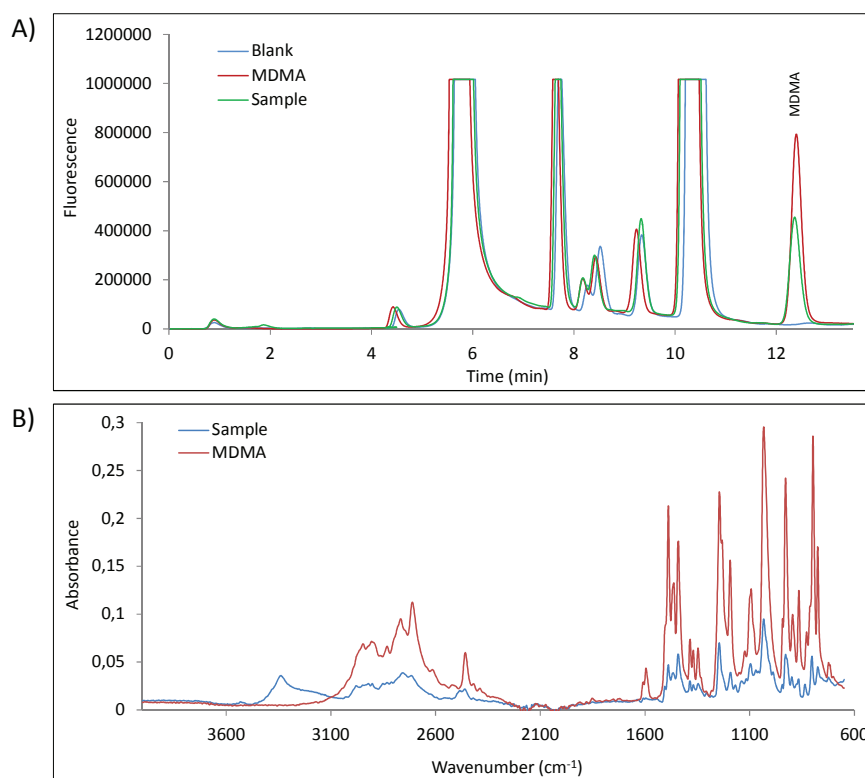
433 3.4 Application to ecstasy sample

434
 435 Illicit sample containing active drugs and additives in varying percentages was
 436 analyzed using the colorimetric kit and their results were compared with results from LC
 437 and also was characterized by FTIR-ATR technique.

438 In order to validate the accuracy of the method of polymeric sensors, a procedure of
 439 derivatization of MDMA with FMOC and subsequent separation and fluorimetric
 440 detection by LC based on our previous work [7] was applied to analyze illicit sample. The
 441 chromatograms obtained for ecstasy sample revealed that MDMA was the only compound
 442 present (See Fig. 6A). The concentration of this drug was calculated from the calibration curves
 443 obtained by analyzing aqueous standard solutions in the range 0.5-20.0 µg mL⁻¹ under the
 444 proposed conditions. The linearity was evaluated by plotting the peak area against the
 445 concentration of the analyte. The calibration equations obtained were $a \pm s_a = (3.4 \pm 1.7) \times 10^5$,
 446 $b \pm s_b = (6.3 \pm 1.2) \times 10^5$ (µg mL⁻¹), $R^2 = 0.9998$, $s_{y/x}/b = 0.33$, $n = 5$ (where a : Ordinate; b :
 447 slope; s_a and s_b : standard deviation of the ordinate and slope, respectively; R^2 : determination
 448 coefficient, and $s_{y/x}/b$: standard deviation of the procedure).

449 The values of MDMA found were 36.1 ± 1.4 and 36 ± 6 % (w/w) by LC method and by
 450 polymeric device method (absorbance measurements), respectively. Both values calculated
 451 from the calibration curves using the external calibration method. No significant differences

452 were found between the values of MDMA calculated in ecstasy sample at 95 % confidence
453 level. Therefore, it can be concluded that the two approaches provided comparable results.
454 In order to characterize the sample and corroborate the results obtained by LC and
455 polymeric sensor, FTIR-ATR was also applied. For this purpose, illicit sample, its possible
456 adulterants/diluents and pure reference substances have been analyzed in powdered form by
457 using FTIR-ATR technique and their spectra were compared to find similarities (Fig. 6B). As
458 expected, characteristic bands of MDMA were noted in the spectrum of illicit sample, such as
459 2710 cm^{-1} (N-H stretching of amine), 2454 cm^{-1} (C-H stretching of CH_3 group), 1488 cm^{-1} (C-H
460 bend), 1244 and 1030 cm^{-1} (C-O-C stretching of methoxy group) and 930 cm^{-1} (C-O stretching).
461 It was observed that the absorbances of sample spectrum were less than the absorbances of the
462 pure MDMA spectrum. Moreover, the infrared spectrum of sample showed an additional band
463 at 3300 cm^{-1} . Thus, it was hypothesized, according to the previous results obtained, that the
464 illicit sample could contain MDMA together with other substances such as lactose, starch,
465 mannitol, or paracetamol owing to their O-H stretching band. Although ephedrine could also be
466 another possible adulterant in the street sample as we observed by comparing the spectra
467 recorded, the analysis of ephedrine by LC did to rule out this option.
468



469
470
471
472
473
474

Fig. 6. A) Chromatograms obtained for a blank (water), $16.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ of MDMA and ecstasy sample, obtained by FMOc derivation with FL detection. B) FTIR-ATR spectra of MDMA reference powder and ecstasy sample powder. Conditions: See Experimental Section Typical.

475 **4. CONCLUSIONS**

476

477 The purpose of this work was to develop a colorimetric kit based on a sensor obtained by simply
478 embedding of NQS into PDMS-TEOS-SiO₂NPs matrix, to carry out a screening of some
479 amphetamine and ecstasy type drugs. The detection is based on the colorimetric known reaction
480 between NQS and amine groups of these compounds, with the innovation of the dye embedding
481 into a polymeric support to avoid its degradation over time. A semiquantitative analysis can be
482 carried out because the color change can be observed by naked eye. The color change is
483 concentration dependent, also allowing a quantitative analysis by absorbance or color intensity
484 measurements. Moreover, the sensor can distinguish drugs according to their amine groups:
485 brown-grey color for primary amines (e.g. AMP, MDA) and orange for secondary amines (e.g.
486 MAMP, MDMA). In contrast with the reported methods to determine drugs, the proposed kit
487 has advantages: it does not need expensive instrumentation and trained personnel, it is portable,
488 easy to use, rapid, economic and the sensor has long term stability under the dark or sunlight.
489 Furthermore, the procedure provided suitable linearity, precision and accuracy for the drugs
490 tested. Therefore, this colorimetric kit could be a very useful tool for on-site determination of
491 illicit drugs in routine police control.

492

493 **Acknowledgement**

494 The authors would like to thank the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain
495 (Grant CTQ2011-26760) and to the Generalitat Valenciana (Grants PROMETEO
496 Program 2012/045 and ACOMP/2013/155) for financial support. Ana Isabel Argente
497 García expresses her grateful to Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain
498 for her pre-doctoral grant.

499

500 **References**

501

502 [1] *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Perspectives on drug,*
503 *Synthetic drug production in Europe*

504 [2] V. Piette, F. Parmentier, *J. Chromatogr. A* 979 (2002) 345-352 *Analysis of amphetamines by*
505 *capillary electrophoresis and liquid chromatography: application to drug seizures and cross-*
506 *validation*

507 [3]Nicole Sondermann, Karl-Artur Kovar, *Screening experiments of ecstasy street samples*
508 *using near infrared spectroscopy, Forensic Science International, 106 (1999) 147-156*

509 [4] Ralph Carsten Schneider, Karl-Artur Kovar, *Analysis of ecstasy tablets:comparison of*
510 *reflectance and transmittance near infrared spectroscopy, Forensic Science International 134*
511 *(2003) 187-195*

512 [5] B.M. El-Haja, A.M. Al-Amria, M.H. Hassana, H.S. Alib, R.K. Bin Khadema, *Forensic*
513 *Science International 135 (2003) 16–26 The use of cyclohexanone as a “derivatizing” reagent*
514 *for the GC–MS detection of amphetamines and ephedrine in seizures and the urine*

515 [6] K.E. Kongshaug, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, M.Krogh, *Solid-phase*
516 *microextraction/capillary gas chromatography for the profiling of confiscated ecstasy and*
517 *amphetamine, Chromatographia 50 (1999) 247–252*

- 518 [7] R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, *Sensitive determination of*
519 *methylenedioxyated amphetamines by liquid chromatography*, *Analyst* 126 (2001) 581-586
- 520• [8] C. Cháfer-Pericás, P. Campins-Falcó, R. Herráez-Hernández, *Application of solid-phase*
521 *microextraction combined with derivatization to the determination of amphetamines by liquid*
522 *chromatography*, *Analytical Biochemistry* 333, 2004, 328–335
- 523• [9] K.B. Chan, *A normal phase HPLC method for the quantitation of MDMA in illicit ecstasy*
524 *tablets. MICROGRAM XXXIV (2001) 237–243.*
- 525• [10] J.R. Verkouteren, J.L. Staymates, *Reliability of ion mobility spectrometry for quantitative*
526 *analysis of complex, multicomponent illicit drug samples*, *Forensic Science International* (2010)
- 527• [11] G.A. Eiceman, Z. Karpas, *Ion Mobility Spectrometry*, CRC Press, Boca Raton, 2005
- 528 [12] Angelica Hacker, Sebastian Beer, Gerhard Müller, Thomas Fischer, Sanjay Mathur,
529 *Surface ionization detection of methamphetamine type illicit drugs*, *Sensors and Actuators B:*
530 *Chemical* 162 (2012) 209-215
- 531 [13] K. Tsujikawa, K. Kuwayama, H. Miyaguchi, T. Kanamori, Y. T. Iwata, T. Yoshida, H.
532 Inoue, *Development of an on-site screening system for amphetamine-type stimulant tablets with*
533 *a portable attenuated total reflection Fourier transform infrared spectrometer*. *Anal. Chim.*
534 *Acta* 608 (2008) 95-103
- 535 [14] C. Weyerman, Y. Mimoune, F. Anglada, G. Massonet, P. Esseiva, P. Buzzini, *Applications*
536 *of a transportable Raman spectrometer for the in situ detection of controlled substances at*
537 *border controls*, *Forensic Science International* 209 (2011) 21-28
- 538 [15] B.A. Eckenrode, E.G. Bartick, S.D. Harvey, M.E. Vucelick, B.W. Wright, R.A. Huff,
539 *Portable Raman spectroscopy systems for field analysis*, *Forensic Science Communications* 3
540 (4) (2001),
- 541 [16] M.D. Hargreaves, K. Page, T. Munsch, R. Tomsett, G. Lynch, H.G.M. Edwards, *Analysis*
542 *of seized drugs using portable Raman spectroscopy in an airport environment– a proof of*
543 *principle study*, *Journal of Raman Spectroscopy* 39 (2008) 873–880
- 544 [17] Xu, H.; Wu, J.; Chen, C. H.; Zhang, L.; Yang, K. L.; *Sens. Actuator B-Chem.* **2010**, 143,
545 535
- 546 [18] Sutarlie, L.; Yang, K. L.; *Sens. Actuator B-Chem.* **2008**, 134, 1000
- 547 [19] Park, I. S.; Heo, E.; Nam, Y. S.; Lee C. W.; Kim, J. M. *J. Photochem. Photobiol., A* **2012**,
548 238, 1
- 549 [20] Meng, Q.; Han, T.; Wang, G.; Zheng, N.; Cao, C.; Xie, S. *Sens. Actuator B-Chem.* **2014**,
550 196, 238
- 551 [21] Jornet-Martínez, J.; Moliner-Martínez, Y; Herráez-Hernández, R.; Molins-Legua, C.;
552 Verdú-Andrés, J.; Campins-Falcó, P. **2014**, unpublished results.
- 553 [22] Wang, W.; Wu, W. Y.; Zhong, X.; Wei, W.; Miao, Q.; Zhu, J. J.; *Biosens. Bioelectron.* **2011**,
554 26, 3110
- 555 [23] Mojca Korent, S.; Lobnik, A.; Mohr, G. J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 387, 2863

- 556 [24] Lottersy, J.C.; Olthuis, W.; Veltink, P.H.; Bergveld, P. *J. Micromech. Microeng.* **1997**, 7,
557 145-147
- 558 [25] Scott, A.; Gupta, R.; Kulkarni, G.U. *Macromol. Chem. Phys.* **2010**, 211, 1640-1647
- 559 [26] Li, D.; Xu, F.; Liu, Z.; Zhu, J.; Zhang, Q.; Shao, L. *Appl. Surf. Sci.* **2013**, 266, 368
- 560 [27] Xu, F.; Li, D.; Zhang, H.; Xu, J. *Prog. Org. Coat.* **2012**, 75, 429
- 561 [28] Campins-Falcó, P.; Moliner-Martínez, Y.; Herráez-Hernández, R.; Molins-Legua, C.;
562 Verdú-Andrés, J.; Jornet-Martínez, N. Passive sensor for in situ detection of amines in
563 atmospheres. **2013**, Patent P201300436.
- 564 [29] P. Campíns-Falcó, C. Molins-Legua, A. Sevillano-Cabeza, R. PorrasSerrano, *Analyst* 122
565 (1997) 673.
- 566 [30] Hlabangana, L.; Hernández-Cassou, S; Saurina, J. *Journal of Chromatography A.* **2006**,
567 1130, 130
- 568 [31] Quan-Min Li; Zhan-Jun Yang. *Spectrochimica Acta Part A* **2007**, 66, 656
- 569 [32] Argente-García, A.; Muñoz-Ortuño, M.; Molins-Legua, C.; Moliner-Martínez, Y.; Campíns-
570 Falcó, P. 2014, unpublished results
- 571 [33] Abdalla, A. Elbashir; Alawia H.E.Elwagee *Journal of the Association of Arab Universities*
572 *for Basic and Applied Sciences* 2012, 11, 32-36

A biodegradable zein test kit for phosphate sensing in water..

Biosensors and Bioelectronics (enviado)

1 A biodegradable zein test kit for phosphate
2 sensing in water.

3 *N. Jornet-Martínez¹, P. Campíns-Falcó¹ and E.A.H. Hall.²*

4 Departament de Química Analítica , Facultat de Química. Universitat of València. Dr.

5 Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain. Fax:(+)963543447, E-mail:

6 pilar.campins@uv.es

7 Institute of Biotechnology, Department of Chemical Engineering and Biotechnology,

8 University of Cambridge, Tennis Court Road, Cambridge, CB2 1QT. Email

9 lisa.hall@biotech.cam.ac.uk .

10 ABSTRACT.

11 A new biodevice based on the inhibition of alkaline phosphatase (ALP) for inorganic
12 phosphate (P) in water is proposed. The immobilization of ALP in a biodegradable and
13 low-cost material such as zein, prolamine from maize, and in combination with glycerol
14 as plasticiser were investigated. The activity of the enzyme was preserved in the
15 biofilm, even after 20 days at room temperature or 4°C. The biodevice was successfully
16 applied to the measurement of P_i in river, lake, coastal water and tap water samples and
17 the results were found to be in good agreement with those provided using the standard
18 colorimetric method. The detection limit was found at 0.2 mg/L of P_i and the linear
19 range was from 0.5 to 5 mg/L, making it suitable for control of water quality,
20 (Legislation specifies P_i concentration below 1-2 mg/L). A dual kit to contain the ALP-

21 biodevice and also the substrate 3-O-methylfluorescein phosphate cyclohexammonium
22 salt (OMFP) biodevice was proposed for the screening of samples containing phosphate
23 at concentrations higher than 0.5 mg/L of P_i.

24

25 **1. Introduction**

26 Phosphorous is an essential nutrient for the growth of biological organisms
27 including both their metabolic and photosynthetic processes. However, excess of
28 phosphate levels in water resulted in the proliferation of aquatic vegetation producing
29 eutrophication. Therefore, when algae and plants die, their microbial decomposition
30 consumes oxygen, which reduces the concentration of dissolved oxygen and can be
31 potentially damaging to aquatic life. Eutrophication is one of the widespread, costly and
32 challenging environmental problems in European and North American lakes and
33 reservoirs since the mid-20th century. Nowadays, phosphate levels in water are
34 regulated by EU through the Urban Water Treatment Directive, which specifies
35 maximum annual mean total concentration between 1-2 mg/L as a function of the size
36 of the urban zone. The measurement of phosphate levels in rivers, lakes and coast
37 waters is also increasingly important with the need to reach good ecological and
38 chemical status by 2015, as stated in the Water Framework Directive (EU Directive
39 2000/60/EC). Prevention policy, based on continuous monitoring of nutrient
40 concentrations is the most reliable and economical way to preserve water quality.
41 Consequently, there is an increased demand for a cost effective device that is both
42 specific enough for phosphate and achieves the required limit of detection.

43 The current standard method for the determination of phosphate in environmental
44 water samples is based on a colorimetric approach, developed in the early 1960's

45 (Murphy and Riley, 1962). This method suffers from interference from arsenates,
46 silicates, sulfides and oxidizing agents (Environmental Agency, 1992). Also,
47 molybdenum which is the reagent required for the test, is a carcinogen, making this
48 procedure a potential health hazard (Gilbert et al., 2011 ; Zhang et al., 2008) Despite a
49 wide variety of methodologies having been developed to detect and quantify
50 phosphates, no sensor based technology has replaced the standard colorimetric method.
51 A lack of selectivity for phosphate against other anions and also, the required optimal
52 wide range of phosphate concentration (detection limits needed below 1mg/mL) remain
53 problems in results in both field electrochemical and optical sensors (Warwick et al.,
54 2013).

55 In order to find an alternative, biosensors have been explored, mainly using
56 combinations of enzymes including alkaline phosphatase (where phosphate is an
57 inhibitor) or pyruvate oxidase (where phosphate is cosubstrate) (Villalba et. al., 2009).
58 The main choice of detection in these biosensors has been electrochemical, linked with
59 multi-enzyme systems that produce a better electroactive product or current
60 amplification. Nevertheless, the same reagents can be used in a colorimetric assay, or
61 by changing the enzyme's substrate, so that a fluorophore product is generated. For
62 example, alkaline phosphatase is a nonspecific phosphomonoesterase that is
63 competitively inhibited by phosphate. Previous studies have used alkaline phosphatase
64 for phosphate estimation developing the assay in solution (Coburn et al., 1998; Fernley
65 and Walker, 1967; Torriani, 1968, Upadhyay et al., 2015) and also for heavy metals and
66 pesticide analysis (Bachan Upadhyay and Verma, 2013; Berezhetsky et al.,
67 2008;García Sánchez et al., 2003; Mazzei et al., 2004; Prieto-Simón et al., 2006),
68 However, these papers have not included assays in the field with real environmental
69 samples or made the step to an integrated solid-state sensor.

70 The work reported herein, proposes a solid state system created entirely from the
71 protein, zein, a film forming prolamine from maize which is rendered reactive towards
72 phosphate through the inclusion in the film of alkaline phosphatase and the substrate 3-
73 O-methylfluorescein phosphate cyclohexammonium salt (OMFP). The availability of
74 these polymers, of agricultural origin, provide a low-cost bio-based material which is
75 chemically, rather compatible with the alkaline phosphatase (ALP) enzyme required for
76 the assay development, thereby taking a “green chemistry” approach to the development
77 of biodevices. Characteristics such as low maintenance, stability, ease of manufacture
78 and low-cost production could draw significant interest from the industrial
79 environmental sector. In this work, ALP-biofilm and ALP + OMFP- biofilms were
80 developed for testing for the fluorimetric determination of phosphate at legislated values
81 in river, coast, lake and tap waters starting from the inhibition of alkaline phosphatase.
82 These simple biodevices could replace enzyme and/or substrate preparation in solution.

83 **2. Materials and methods**

84 *2.1 Materials*

85 Zein, 3-O-methylfluorescein phosphate cyclohexammonium salt (OMFP) and alkaline
86 phosphatase (ALP) from bovine intestinal mucosa lyophilized power ≥ 10 DEA
87 units/mg solid were purchased from Sigma Aldrich, while absolute ethanol was
88 obtained from Romil and sodium monobasic phosphate from Merck.

89 *2.2 Equipment and instrumentation*

90 All the emission measurements were made in a spectrofluorometer Jasco FP-750 and
91 the absorbance values in a spectrophotometer Agilent 8453.

92 *2.2 Preparation of the biodevice: enzyme immobilized on zein film*

93 Protein film casting was carried out by dissolving zein (10% w/v) in aqueous ethanol
94 (90% v/v) along with glycerol (0%, 30%, 50%, 70% and 90% on a zein weight basis) as
95 a plasticizer and then the enzyme, alkaline phosphatase (ALP) was added. Fresh
96 alkaline phosphatase (ALP) aqueous solution (80 μ L of 10 mg/mL) was added and the
97 mixture was stirred for 20-30 minutes. Finally, it was placed into a well-plate mold with
98 8 positions, 200 μ L was used for each biodevice, containing 10 units of ALP. After 6
99 hours at room temperature, the biosensors were obtained and were frozen (-20°C) until
100 further usage. Also, devices with OMFP embedded into the film were prepared. The
101 OMFP was dissolved in ethanol and was added to the zein mixture following the same
102 experimental process used for ALP immobilization. The devices were stored at -20°C
103 for 20 days.

104 *2.3 Procedures*

105 For free alkaline phosphatase in solution, measurements were carried out in a vial
106 containing Tris HCl buffer (2 mL, 100 mM, pH = 9.0), alkaline phosphatase (100 DEA
107 units/mg) and artificial substrate 3-O-methylfluorescein phosphate (OMFP) (2.4 μ M).
108 The OMFP was hydrolyzed by alkaline phosphatase to yield 3-O-methylfluorescein
109 (OMF) that was detected at 485 nm excitation/513 nm emission in a quartz cuvette. All
110 the emission measurements were carried out at room temperature every 30 seconds for 5
111 minutes. The variation of the fluorescence intensity (RFI) over time, $\Delta(\text{RFI})/\Delta t$, was
112 used to determine the initial rate (V). For the calibration of free ALP activity in aqueous
113 solution, a calibration linear curve was calculated by initial rate vs ALP concentration
114 from 2.5 to 500 units/mg. A linear calibration curve of inhibition by P_i was calculated
115 by initial rate vs inorganic P_i concentration from 0.5 to 5 mg/L in presence of 100
116 units/mL of ALP. Finally, the inhibition efficiency was obtained by the logarithm of P_i

117 concentration vs the percentage of inhibition. The percentage of inhibition (%INH) was
118 calculated as follows:

$$119 \quad \%INH = \frac{V - V_p}{V} \times 100$$

120 Where V is the initial rate without phosphate and, V_p is the initial rate with phosphate.

121 For the biodevice, measurements were carried out in a vial containing the enzyme-zein
122 film disc and tris HCl buffer (2 mL, 100 mM, pH = 9.0), followed by OMFP (2.4 μM)
123 addition after 30 seconds. The water spiked and unspiked samples were prepared in
124 buffer tris HCl (100 mM, pH 9.0) and all the emission measurements were carried out at
125 room temperature every 30 seconds for 5 minutes. The emission values obtained were
126 processed following the mentioned procedure above. A calibration curve was obtained
127 by initial rate vs log of P_i concentration from 0.5 to 5 mg/L. In order to compare the
128 response provided by immobilized ALP with respect to free ALP in solution, the
129 following ratio called % relative activity were calculated by using the expression:

$$130 \quad \% \text{ relative activity} = \frac{V_{\text{immobilized_ALP}}}{V_{\text{free_ALP}}} \times 100 \quad \text{equation 1}$$

131 For the kit which contains the OMFP-device and ALP-device the experimental process
132 was: the OMFP-device was added to the buffer solution (2 mL, 100 mM, pH = 9.0)
133 followed of addition of the ALP-device after 30 seconds. A calibration linear curve was
134 calculated by initial rate vs log P concentration from 0.5 to 5 mg/L. All the emission
135 measurements were carried out at room temperature every 30 seconds for 5 minutes.
136 The same ratio established in equation 1 was calculated.

137

138 **3. Results and discussion**

139 *3.1 Study of the inhibition of the alkaline phosphatase by phosphate*

140 ALP catalyses the non-specific hydrolysis of orthophosphoric monoesters to alcohols.
141 The biosensor is based on the inhibition of alkaline phosphatase (ALP) by hydrolyzing
142 non-fluorescent OMFP to fluorescent OMF and phosphate (Fig. 1). The OMFP was
143 selected for this initial study due to its high binding, efficient hydrolysis and the simple
144 enzyme kinetics compared to the diphosphate substrates. Their product OMF, is
145 fluorescent ($\lambda_{\text{ex}} = 485\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 513\text{ nm}$) and also, yellow in solution (450 and 485 nm
146 absorption maxima). Both color intensity and fluorescence increase over time (Tierno
147 et. al., 2007). Inorganic phosphate acts as an inhibitor of ALP competing with the
148 substrate for the enzyme active site and results in the interference of enzyme for
149 substrate specificity. Since the fluorescence intensity is proportional to the product
150 concentration, resulting from the hydrolysis reaction, the decrease of the fluorescence
151 caused by P_i inhibition was used for monitoring the P_i concentration (Fig. 1).

152 *3.2 Developing the biodevices*

153 Zein is a storage protein isolated from the maize endosperm. It consists of a mixture of
154 polypeptides, dominated by α -zein (~20-25kDa, 70-85%), which is rich in leucine,
155 proline, alanine, serine and glutamine, and γ -zein (~15k-30Da, 10-20%), which also has
156 a high cysteine content. This creates an amphipathic structure which combines an
157 antiparallel α -helical structure from α -zein, with the N-terminal driven polyproline II
158 (Argos et al., 1982) type structure from γ -zein, held together by disulfide bridges and
159 inter- and intra-chain hydrogen bonding. Despite the polar glutamine and serine, this
160 results in a rather hydrophobic insoluble material. Rhys and Dougan, for example have
161 shown that hydrogen bonding between the side chain and backbone, associated with the

162 polyglutamine sequence causes an insoluble structure due to side-chain/backbone
163 internal hydrogen bond formation taking preference over hydrogen bonding with
164 water.(Rhys et. al., 2013) Nevertheless, ~50% of the amino acid content of zein is polar
165 and side chain interactions provide a potentially well-stabilized environment for
166 incorporation and stabilization of other proteins.

167 Zein will self assemble into fibers, micelles or films depending on the conditions used.
168 For solutions cast onto surfaces (as used here), Yoshino et al. (2002) report that assembly
169 into a film is first driven by interactions with the underlying surface the thence
170 evaporation of the ethanol and reorganization of zein in the aqueous overlayer. ALP,
171 present during the casting, is expected to become trapped in the zein matrix, possibly
172 with some change in film morphology.

173 Access to the ALP in the zein film and the immobilized ALP activity were tested by the
174 fluorescent assay using the substrate OMFP in buffer. Free ALP in solution from 2.5 to
175 500 units/(mg·L) (Fig. 1a) and also immobilized ALP in zein from 50 to 500
176 units/(mg·L) (Fig.2) were analyzed every 30 seconds for 5 minutes. The fluorescent
177 signal rate increased with increasing enzyme concentration until saturation, the enzyme
178 activity in both cases; free ALP and ALP-biodevice followed a classical Michaelis-
179 Menten behavior (Fig.2). As expected, the biodevices synthesized with different
180 concentration of ALP showed increasing fluorescent rate according to the amount of
181 enzyme immobilized. However, the initial rate of immobilized ALP activity was lower
182 (Fig. 2B) than free ALP (Fig. 3A), suggesting that all the ALP was not immediately
183 accessible to the OMFP enzyme substrate.

184 Zein films are generally rather brittle with low water vapor permeability (Xu et. al.,
185 2012). In order to improve the access to active ALP immobilized in the film, a more

186 flexible film with higher water vapor permeability (and higher substrate and analyte
187 permeability) is required. Plasticisers with polar groups like glycerol, sugars,
188 polyethylene glycol, will generate numerous hydrogen bonds with the zein polypeptide
189 chain (Emmambux and Standing, 2007), reducing the intermolecular forces between
190 zein chains and potentially increasing water vapor permeability into the interior of the
191 polymer (Xu et. al., 2012, Chen et al.,2014). Different concentrations of glycerol
192 embedded into zein films were tested with 0%, 30%, 50%, 70% and 90% glycerol in
193 zein by weight and were tested by the fluorescent assay using the substrate OMFP in
194 buffer (Fig.2C). The effectiveness of active ALP immobilization was expressed as a %
195 relative ALP activity (See Section 2.3), calculated from initial rates for free ALP and
196 immobilized ALP at different % of glycerol (Fig.2a and Fig.2c respectively). As
197 expected from this more hydrophilic plasticized film, we showed an increasing in the
198 ratio % relative activity of ALP (see equation 1) from 2% to 22% with increasing % of
199 glycerol (Table 1). The glycerol is also a biodegradable common polyol plasticizer; it
200 has been used previously as plasticizer in zein films to improve their physical
201 properties, by polymer swelling, as a result of diffusion of water molecules into the
202 polymeric film matrix (Mastromatteo et al., 2010). Therefore, the increase of
203 hydrophilicity of the film helps the ALP diffusion to solution and then, the fluorescent
204 response increases. However, an overload of glycerol has a detrimental effect on the
205 overall film physical properties. This has been seen in other studies, as an anti-plasticizing
206 effect caused by high glycerol concentration, which can damage the continuity of the
207 polymer network of a composite matrix resulting in a reduced integrity of the film
208 (Wongsasulak et al., 2010). When 90% glycerol in zein by weight was used, the ALP-
209 biofilms are not completely formed and are brittle. 70% glycerol was chosen as an
210 optimal plasticizer amount for ALP- biodevice preparation. The zein film with ALP

211 immobilized (without glycerol) and the film S1 (with 70% of glycerol) was analyzed by
212 SEM. Figure 3 suggests that the porosity of the selected film S1 (Fig. 3B) may be
213 higher compared with a film prepared without glycerol (Fig 3A), due to stacked
214 channels penetrating through the film. As can be seen from the image, the channels in
215 S1 appear to be fully distributed throughout the film, which may improve access to the
216 ALP and explain the increasing of % relative activity according to increasing the % of
217 glycerol. The relative enzymatic activity observed for this biodevice (~22%) is
218 comparable with that reported for a sol-gel alkaline phosphatase (21%) (G.Sánchez et
219 al., 2003), but presently we are not able to distinguish between loss in ALP activity and
220 poor access to the enzyme.

221 Zein film devices with OMFP immobilization could also be prepared. A non-plasticizing
222 effect was observed at 90% of glycerol on a zein weight basis and we decided to use
223 this amount for developing the OMFP-device. This then allows a solid state kit to be
224 produced containing the OMFP-device and the ALP-device. However, combining these
225 film discs, despite attempts to further optimize the response, resulted in ~7% ALP
226 activity compared with the free enzyme and substrate in solution. This is still sufficient
227 to produce a useful measurement.

228

229 *3.3 Inhibition curves*

230 The substrate concentration for inorganic phosphate was investigated by varying it from
231 0.6 to 11.9 μM in buffer (pH 9.0) to find the maximum difference between the active
232 enzymatic response to enzymatic inhibition caused by P_i (Fig.4A). For 2.4 μM of
233 OMFP in solution, the difference in emission values observed was around 26% while

234 for 6 μM OMFP in solution it is 19% and for 0.6 μM , only 5%. Therefore, 2.4 μM of
235 OMFP was selected as optimal substrate concentration.

236 Also, it is important to determine the pH optimum for all enzyme assays to maximize
237 the signal window between active enzymatic response and the inhibition response. The
238 biodevice was monitored at different pH in order to show the variation in the response
239 with and without inhibitor at substrate concentration 2.4 (μM) in buffer (Tris HCl 100
240 mM). We showed maximum variation in fluorescent signal at pH 9 and non variation
241 signals at pH >9 (Fig. 4B). This is consistent with the normal optimum pH for alkaline
242 phosphatases. pH 9 was selected as optimal pH for P_i detection.

243 The inhibition efficiency curves for phosphate were obtained by varying the inhibitor
244 concentration (maintaining a constant substrate concentration, 2.4 μM of OMFP in
245 solution) for 0.5 to 129.5 μM immobilized enzyme as shown in Fig.5A. Finally,
246 according to the Michaelis-Menten treatment the parameters to determine the enzymatic
247 catalysis were calculated. To determine K_m for the selected substrate and biodevice, we
248 varied the substrate concentration OMFP from 2.4 to 47.5 μM using six substrate
249 concentrations and enzymatic response was measured at every 30 seconds for a total of
250 5 min. Fig.5B confirms the competitive nature of the phosphate ion inhibition, as an
251 increment in the value of the apparent Michaelis constant (K_m) from 9.4 μM to 37.6 μM
252 min^{-1} which a similar V_{max} of 250 $\mu\text{M min}^{-1}$. The inhibition constant (K_i) was also
253 calculated for P_i concentration of 1mg/L. The K_i value was 108.6 μM .

254 The detection limit (LOD) using the ALP-biofilms was experimentally found at 0.2
255 mg/L (concentration that gives a three-times higher analytical signal than the blank) of
256 P_i and the linear range was from 0.2 to 5 mg/L. The calibration equation was: Initial
257 rate (V) = -7.6708 $\log\text{P}_i$ + 11.062 ($R^2=0.99$). When both bio-film disc devices, ALP-

258 biofilm and OMFP-biofilm, were employed the linear range was from 1.5 to 10 mg/L,
259 LOD achieved was 0.5 mg/mL and the calibration equation was: $V = -2,1295 \log P$
260 $+6.8238$ ($R^2=0.99$)

261 *3.4 Application in real water samples*

262 The application of the biodevice was investigated for tap water, sea (Caracola beach,
263 code DP007), river (Jucár river, code TJU3) and transition waters (Cullera lake, code
264 TES3) collected at different points along the coast of the Comunidad Valencia
265 area (Spain). The samples were prepared in buffer Tris HCl (100 mM, pH 9.0). The
266 fluorescent substrate was added to the biodevice in buffer after 30s and the fluorescence
267 intensity signal was measured. Table 2 shows the concentrations of phosphate found
268 using the ALP-biodevice compared with those provided by ALP in solution. As can be
269 seen the results achieved by the two methods are in agreement. For all samples, the
270 phosphate concentration was lower than 1 mg/L, according to maximum concentration
271 of phosphate in coastal and surface waters allowed by legislation. Also tap water was in
272 accordance with legislation (lower than 1mg/L). The phosphate recoveries obtained
273 from all the samples spiked at 1.25 mg/L and at 5 mg/L were near 100 %, so the matrix
274 effect is absent. The samples were also, analyzed by the conventional ammonium-
275 molybdate method [Harris. D.C., 2001]. The mean concentrations of P_i found by the
276 ammonium molybdate method for samples TJU3, TES3, DP007 and tap water are in
277 agreement with those found by the enzyme methods as can be seen in Table 1
278 considering that the LOD is 1.0 mg/L for this method. The calibration equation was:
279 $Abs = 0.0411 [P] + 0.1976$ ($n=5$, $R^2 = 0.999$).

280 The samples were also tested by using the kit containing both biofilms, in accordance of
281 the results shown in Table 2, all samples except tap-water were positively screened.

282 *3.6 Precision and stability of biofilms*

283 The precision of the immobilized ALP in back to back manufacture was assessed by
284 carrying out the process six times using the same experimental process. The biodevice
285 was tested by fluorescence to show that the relative standard deviation (RSD) was 6.6 %
286 ($n = 6$). The precision for phosphate detection at 1 mg/L was calculated for $n=3$
287 measurements for 5 days and the relative standard deviation (RSD) was 6.2 %. The
288 storage stability was assessed by measuring activity after storage at room temperature,
289 at 4°C and at -20°C for 20 days (Table 1). The activity is not markedly modified as can
290 be derived from Table 1.

291 **3. Conclusions**

292 A simple disposable environmentally friendly biodevice for phosphate determination in
293 natural waters was developed. These bio-film devices can replace reagent solutions of
294 enzyme and/or substrate used in phosphate assay. They were successfully applied to the
295 measurement of P_i in river, lake, coastal water and tap water samples. The detection
296 limit achieved by the ALP-biodevice was 0.2 mg/L of P_i and the linear range from 0.5
297 to 5 mg/L, which covers the legislative range, which specifies maximum annual mean
298 total concentration of 1-2 mg/L, is fulfilled. The LOD found, employing the two
299 devices, ALP-biofilm and OPFP biofilm, was 0.5 mg/L, which is useful for rapid or out-
300 on-laboratory sample screening analysis. In addition, the immobilization of both the
301 OMFP and ALP shown in this work, is of interest to replace reagent solutions and
302 develop green devices based on the utilization of a biodegradable materials (Leucha et
303 al. 2011). Consequently, in the present work, we have described biodevices that take the
304 first step to respond to the needs of environmental analysis, particularly in monitoring
305 campaigns. In conclusion, the methodologies reported represent reliable and green

306 alternatives to the conventional colorimetric method of phosphate due to its sensitivity,
307 simplicity and low cost. The comparison of the proposed procedure with the standard
308 method revealed that the biodevice shows good sensitivity and selectivity, but with an
309 improvement in the portability, since on site detection can be carried out by inspection
310 of the solutions. In addition, the proposed biodevices minimized the generated waste for
311 the determination procedure. Besides, the solid state biofilms can be a convenient tool
312 for on-site monitoring of phosphate in environmental field testing.

313 **Acknowledgements.** The authors are grateful to Generalitat Valenciana (PROMETEO
314 program 2012/045). NJ expresses her gratitude to PROMETEO program for her
315 predoctoral grant.

316

317

318

319

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

Device	Day 0	-20°C for 20 days	4°C for 20 days	Room temperature for 20 days
S1	6%	6%	6%	6%
S1_30%	8%	19%	8%	7%
S1_50%	16%	12%	14%	12%
S1_70%	18%	22%	13%	12%
S1_90%	22%	26%	29%	10%

332

Measurements were day after 20 days of the synthesis device

333

S1 is the device prepared by zein,

334

S1_30%, 50%, 70%, 90% refers to devices prepared with zein and % of glycerol.

335

336 **Table 1.** Stability of devices after 20 days in different conditions of storage.

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

Water sample	Standard method	Free ALP	Biodevice	Spiked [P]	Biodevice	Spiked [P]	Biodevice	Recovery (%)
TJU3	≈1(LOD)	0.8±0,1	0.9±0,1	1.25	2.4±0,2	5	6.5±0,5	112, 98
TES3	nd	0.5±0,1	0.4±0,1	1.25	1.6±0,2	5	5.4±0,5	97, 100
DP007	nd	0.5±0,1	0.4±0,1	1.25	1.5±0,2	5	4.7±0,5	103, 89
Tap	nd	nd	nd	1.25	1.4±0,2	5	4.9±0,5	112, 98

348

349 nd-not detected
350 [P]-phosphate concentration at mg/L
351

352 **Table 2.** Phosphate recovery from water samples by fluorescence inhibition of free
353 ALP and ALP immobilized biodevice.

354

355

356

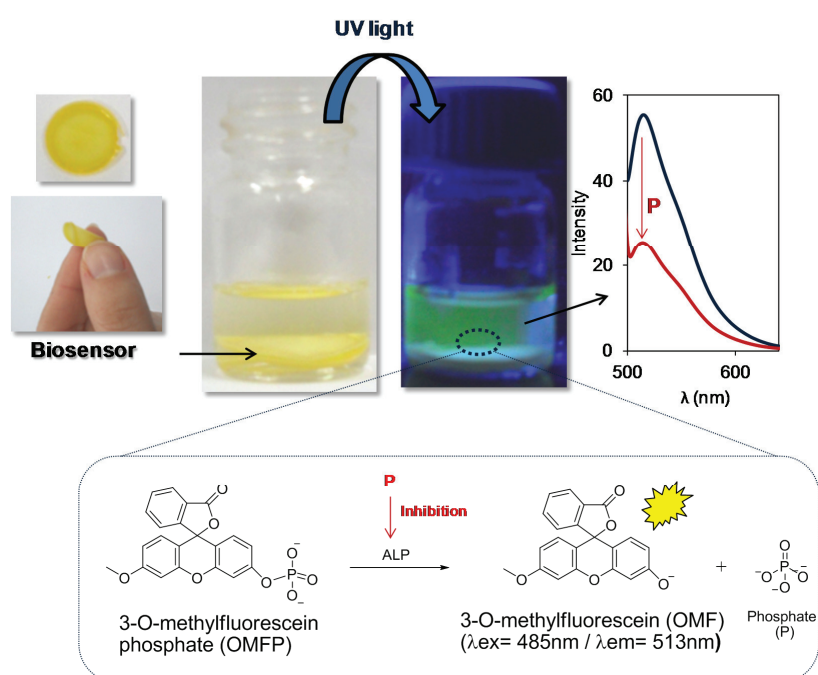
357

358

359

360

361



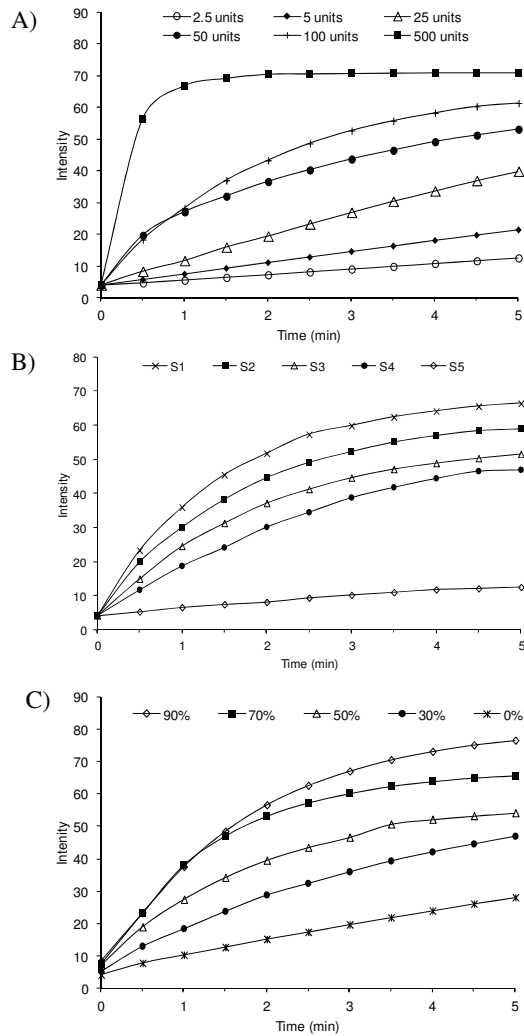
362

363 **Fig. 1.**Picture of biodevice and schematic representation of alkaline phosphatase based

364 fluorescent biodevice assay where the alkaline phosphatase (ALP) that hydrolyzed

365 unfluorescent OMFP to fluorescent OMF is inhibited by inorganic phosphate in buffer

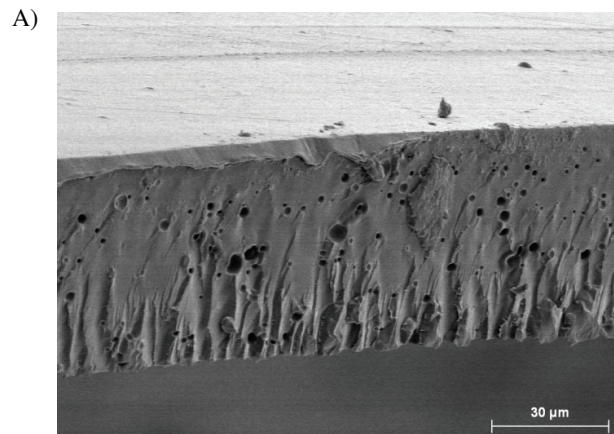
366 solution at pH=9.



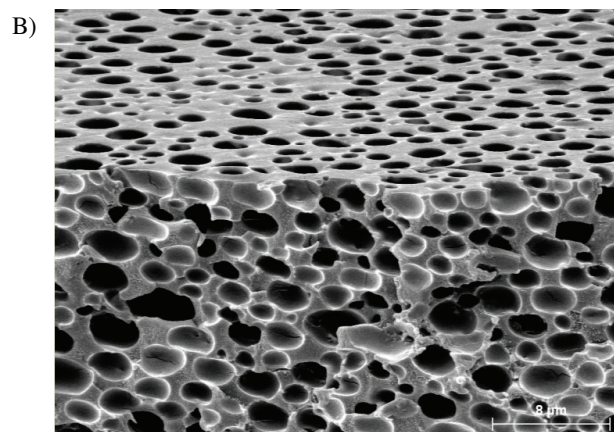
367

368 **Fig.2.** The variation of the fluorescence intensity over time was used to determine the
 369 initial rate (a) for free ALP at concentrations from 2.5 to 500 units/mg, (b) immobilized
 370 ALP (S1, S2, S3, S4, S5 to 500, 437.5, 375, 250 and 50 ALP units/mg respectively) and
 371 (c) immobilized ALP (S1; 500 ALP units/mg) in a zein film prepared with different
 372 amounts of glycerol. All the assays were done in buffer solution (Tris HCl 100 mM,
 373 pH=9.0) with 2.4 μ M of OMFP the fluorescence was observed every 30s for 5 min.

374



375



376

377

378 **Fig. 3.** SEM images of zein device with ALP immobilized using A) 0% of glycerol and

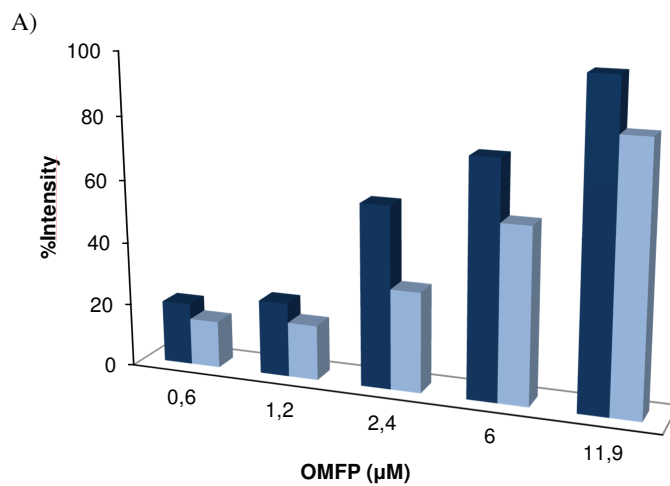
379 B) 70% of glycerol. The porosity is higher in presence of glycerol.

380

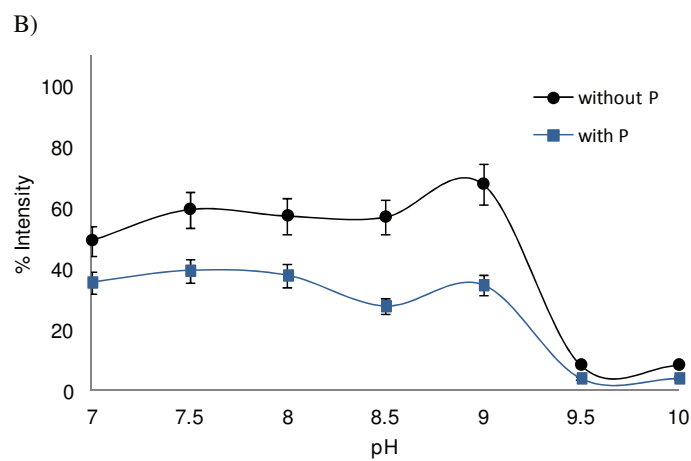
381

382

383

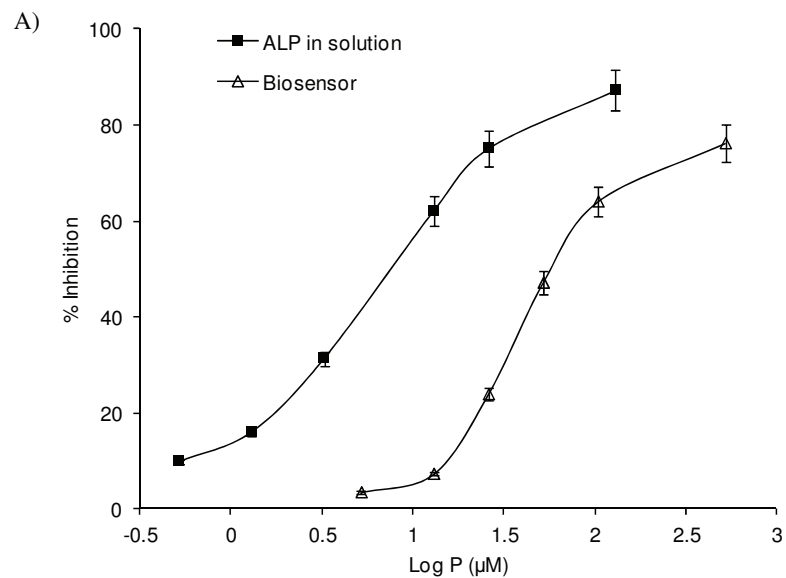


384



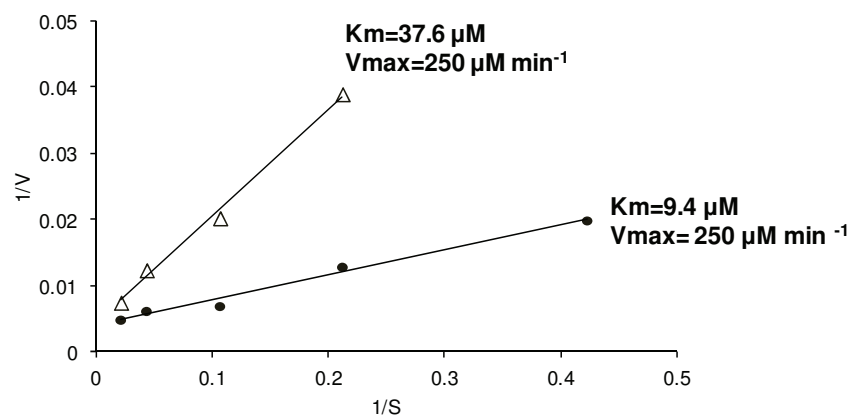
385

386 **Fig.4.** Effect of varying (a) the OMFP concentration and (b) pH on the biodevice
387 response in absence (navy blue) and presence of inhibitor (sky-blue). Both experiments,
388 the biodevice was measured in Tris HCl buffer (100 mM) and (b) at concentration 2.4
389 μM OMFP. The concentration of phosphate was 1 mg/L



390

B)



391

392 **Fig. 5** A) Inhibition efficiency curves for the free and immobilization ALP in the
 393 presence of P. The biodevice and free ALP (100 units/mg) was measured in Tris HCl
 394 buffer (100 mM, pH= 9.0) and (b) at concentration 2.4 µM OMFP. B) Lineweaver-
 395 Burk plot for immobilized ALP in the presence of P at 1 mg/L. All measurements were
 396 carried out in Tris HCl buffer (100 mM, pH=9.0) and at concentration 2.4 µM OMFP.

397 REFERENCES

- 398 Argos, P., Pedersen, K., Marks, M.D., Larkins, B.A.J. 1982. *Biol. Chem.* 257,
399 9984–9990.
- 400 Berezhetsky, A.L., Sosovska, O.F., Durrieu, C., Chovelon, J.-M., Dzyadevych, S.V.,
401 Tran-Minh, C., 2008. *IRBM* 29, 136–140.
- 402 Chen, Y., Ye, R., Liu, J., 2014. *Ind. Crop. Prod.* 53, 140-147.
- 403 Coburn, S.P., Mahuren, J.D., Jain, M., Zubovic, Y., Wortsman, J., 1998. *J. Clin.*
404 *Endocrinol. Metab.* 83, 3951–3957.
- 405 Emmambux, M.N., Stading, M., 2007. *Food Hydrocoll.* 21, 1245–1255
- 406 García Sánchez, F., Navas Díaz, A., Ramos Peinado, M., Belledone, C., 2003. *Anal.*
407 *Chim. Acta* 484, 45–51.
- 408 Gilbert, L., Jenkins, A.T.A., Browning, S., Hart, J.P., 2011. *Sens. Actuators B Chem.*
409 160, 1322–1327.
- 410 Harris D.C., 2001. *Análisis Químico Cuantitativo*. Reverte, Barcelona, Spain.
- 411 Leucha, J., Hsio, A., Brodsky, S., Liu, G.L., Kokini, J.L., 2011. *Lab Chip.* 11, 3419-
412 3425.
- 413 Mazzei, F., Botrè, F., Montilla, S., Pilloton, R., Podestà, E., Botrè, C., 2004. *J.*
414 *Electroanal. Chem.* 574, 95–100.
- 415 Murphy, J., Riley, J., 1962. *Anal. Chim. Acta*, 31–36.
- 416 Rhys N.H., Dougan L., 2013. *Soft Matter.* 9, 2359-2364.

417 Prieto-Simón, B., Campàs, M., Andreescu, S., Marty, J.-L., 2006. *Sensors* 6, 1161–
418 1186.

419 Tierno, M.B., Johnston, P.A., Foster, C., Skoko J.J., Shinde, S.N., Shun T.Y., Lazo,
420 J.S., 2007. *Nat. Protoc.* 2, 1134-1144.

421 Upadhyay, B. L.S., Verma, N., 2013. *Anal. Lett.* 46, 225–241.

422 Upadhyay, L.S.B., Verma, N., 2014. *Process Biochem.* 49, 1139–1143.

423 Upadhyay, L.S.B., Verma, N., 2015. *Biosens. Bioelectron.* 68, 611-616.

424 Villalba, M. M. McKeegan, J.K., Vaughan, D.H., Cardoso, M.F., Davis, J., 2009. *J. Mol.*
425 *Cat. B: Enzym*, 59, 1-8.

426 Warwick, C., Guerreiro, A., Soares, A., 2013. *Biosens. Bioelectron.* 41, 1-11.

427 Wongsasulak, S., Tongsin, P., Intasanta, N., Yoovidhya, T., 2010. *J. Appl. Polym.*
428 *Sci.* 118, 910–919.

429 Xu, H., Chai, Y., Zhang G., 2012. *J. Agric. Food Chem.* 60, 10075–10081

430 Yoshino, T., Isobe, S., Maekawa, T., 2002. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 79, 345-349.

431

432

