



VNIVERSITAT [ò*]
DE VALÈNCIA
Facultat de Química

TESIS DOCTORAL

Desarrollo de metodologías sostenibles de análisis

MEMORIA ELABORADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Javier Pla Tolós

Programa de Doctorado
en “Química”



Directores:

Carmen Molins Legua

Jorge Verdú Andrés

Mayo 2017

Dña. Carmen Molins Legua, Profesora Titular de Universidad y D. Jorge Verdú Andrés, Profesor Titular de Universidad, ambos del Departamento de Química Analítica de la Universitat de València, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por Javier Pla Tolós, con el título *“Desarrollo de metodologías sostenibles de análisis”*.

CERTIFICAN,

Que la citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios de Departamento de Química Analítica de la Universitat de València y han dirigido y supervisado los distintos aspectos del presente trabajo, así como su redacción.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Valencia, a 20 de Mayo de 2017.

Prof. Dra. Carmen Molins Legua

Prof. Dr. Jorge Verdú Andrés

Als meus pares

*“Experiencia es el nombre que damos
a nuestras equivocaciones”. (Oscar Wilde)*

AGRAÏMENTS

Arribats a aquest punt, m'agradaria aturar-me un moment per tal d'agrair a totes aquelles persones que, d'una manera o altra, han fet possible que aquest treball haja pogut realitzar-se.

En primer lloc, vull donar les gràcies a Carmen i Jorge, els principals responsables de que esta Tesi siga una realitat. Sense la seua ajuda i consell (i correccions d'última hora), el treball recollit en aquestes pàgines no s'haguera pogut dur a terme.

De la mateixa manera, també m'agradaria destacar el paper desenvolupat per Pilar, Rosa i Yolanda, les quals han estat sempre disposades a ajudar-me quan les he necessitat (espere no haver sigut molt pesat).

Seguint amb els reconeixements dintre del grup d'investigació MINTOTA, m'agradaria donar les gràcies als meus companys (Pascu, Anabel, Rodrigo, Maria, Lusine i Neus), amb els que he compartit moltes hores (massa?) entre les parets del laboratori. Sense la seua col·laboració i empenta, no haguera pogut arribat fins aquí.

Així mateix, vull fer extensius els agraïments als membres del Departament de Química Analítica que, d'alguna manera, m'han ajudat en algun moment d'aquest període.

Deixant de banda l'àmbit universitari, vull agrair a la meua família el suport i el recolzament oferts en tot moment. En especial, vull donar les gràcies als meus pares (Pepe i M^a Carmen) per haver-me animat a seguir endavant quan no estava massa convençut. També vull donar les gràcies al meus germans (José Domingo i Óscar) i a Imma per la seua ajuda i consells.

Gràcies també a Arnau, per amenitzar les vesprades de redacció amb la locució de partits de futbol inacabables, i a Júlia, per fer-me somriure sense necessitat de dir una paraula.

A Rebeca que, aunque estando a muchos kilómetros de distancia, me ha transmitido su ilusión y alegría durante los largos días de redacción de la Tesis (además, siempre resulta más agradable escribir con una tableta de chocolate cerca).

Per últim, i no per això menys important, agrair a Andreu, Franc, Javi i Victor l'interès mostrat al preguntar-me que "*com ho portava*", a més de per comentar-me els innumerables avantatges que suposa fer una Tesi (com la possibilitat de marcar la casella de "Dr." en el moment de reservar un bitllet d'avió). Només per això, ja val la pena.

RESUMEN

Uno de los retos actuales en la Química Analítica reside en el desarrollo de metodologías analíticas sostenibles que respeten los principios planteados por la Química Verde, de manera su impacto sobre el entorno sea mínimo. Para conseguir este objetivo se han establecido diferentes estrategias o líneas de investigación.

En primer lugar, las técnicas de microextracción están aportando numerosas ventajas, aunque todavía presentan algunas limitaciones. Por consiguiente, resulta necesario desarrollar técnicas que automaticen la etapa relativa al pretratamiento de la muestra con el fin de disminuir tanto el tiempo de análisis como la manipulación de la muestra.

En segundo lugar, y atendiendo a los mismos principios, también existe interés en el desarrollo de dispositivos capaces de realizar determinaciones *in situ*, además de proponer mecanismos que permitan disminuir de manera significativa el coste de la instrumentación requerida para llevar a cabo los análisis.

Por lo tanto, los métodos propuestos en esta Tesis se han basado en: (i) el acoplamiento de la microextracción en fase sólida en tubo a sistemas cromatográficos y (ii) en el desarrollo de dispositivos colorimétricos de análisis *in situ*. Por una parte, la microextracción en fase sólida acoplada a un sistema de cromatografía capilar permite unificar la etapa de pretratamiento de la muestra y el análisis en una sola etapa, mientras que, por otra parte, los dispositivos de análisis *in situ* permiten realizar determinaciones en el lugar donde se encuentra el analito, sin necesidad de desplazarse al laboratorio.

Las metodologías propuestas han aportado algunas mejoras a las ya existentes, obteniéndose buenas características como rapidez, bajo coste, simplicidad y respeto hacia el medio ambiente y el operador.

Finalmente, para evaluar la aplicabilidad de estas nuevas estrategias, se han aplicado a la determinación distintos compuestos de interés en diferentes matrices ambientales, industriales y biológicas.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Situación actual de la Química Analítica..... | 3 |
| 1.2. Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida capilar ... | 10 |
| 1.2.1. Modalidades de IT-SPME..... | 16 |
| 1.2.2. Parámetros a tener en cuenta en la IT-SPME-LC..... | 18 |
| 1.3. Dispositivos de análisis <i>in situ</i> | 21 |
| 1.3.1. Sensores y biosensores..... | 25 |
| 1.3.2. Obtención de la señal analítica..... | 32 |
| 1.4. Muestras y sustancias estudiadas | 37 |
| 1.4.1. Monocloramina | 37 |
| 1.4.2. Irgarol-1051 y diurón | 40 |
| 1.4.3. Sulfuro de hidrógeno | 43 |
| 1.4.4. Peróxido de hidrógeno | 46 |
| 1.4.5. Glucosa | 48 |
| 1.4.6. Meropenem..... | 50 |
| CAPÍTULO II - OBJETIVOS | 55 |
| CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS..... | 63 |
| 3.1. Reactivos..... | 65 |
| 3.2. Instrumentación | 67 |
| 3.2.1. Técnicas cromatográficas | 67 |
| 3.2.2. Técnicas espectrofotométricas | 68 |
| 3.3. Procedimiento experimental..... | 69 |
| 3.3.1. Preparación de las disoluciones patrón | 69 |
| 3.3.2. IT-SPME acoplada a CapLC | 69 |

| | |
|--|-----|
| 3.3.3. Dispositivos de análisis <i>in situ</i> | 71 |
| 3.3.3.1. Preparación de sensores | 71 |
| 3.4. Muestras analizadas | 78 |
| 3.4.1. Muestras medioambientales | 78 |
| 3.4.2. Muestras industriales | 79 |
| 3.4.3. Muestras biológicas | 79 |
| CAPÍTULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 83 |
| 4.1. Determinación de cloraminas en agua mediante el acoplamiento de la microextracción en fase sólida en tubo a un sistema de cromatografía líquida capilar (IT-SPME-CapLC-DAD) | 85 |
| 4.1.1. Preparación de las disoluciones estándar | 88 |
| 4.1.2. Estabilidad de las disoluciones de MCA | 91 |
| 4.1.3. Estudio de la etapa de preconcentración | 92 |
| 4.1.4. Estudio de la influencia del pH de la fase móvil | 94 |
| 4.1.5. Parámetros analíticos | 95 |
| 4.1.6. Análisis de muestras de agua | 96 |
| 4.1.7. Aplicabilidad del método | 98 |
| 4.1.7. Comparación con otros métodos | 99 |
| 4.1.7. Conclusiones | 100 |
| 4.2. Microextracción en fase sólida en tubo acoplada a un sistema cromatográfico capilar (IT-SPME-CapLC-DAD) para la determinación de biocidas en aguas | 101 |
| 4.2.1. Optimización del procedimiento de IT- SPME | 102 |
| 4.2.2. Parámetros analíticos | 105 |
| 4.2.3. Análisis de muestras de agua | 106 |
| 4.2.4. Estudio de estabilidad | 109 |
| 4.2.5. Cálculo de la huella de carbono | 111 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.6. Comparación con otros métodos | 113 |
| 4.2.7. Conclusiones..... | 114 |
| 4.3. Determinación de meropenem en muestras biológicas (secreciones mucosas) mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida capilar (IT-SPME-CapLC-DAD) | 115 |
| 4.3.1. Estudio de la etapa de preconcentración..... | 117 |
| 4.3.2. Parámetros analíticos | 118 |
| 4.3.3. Análisis de los tubos endotraqueales | 119 |
| 4.3.4. Comparación con otros métodos | 122 |
| 4.3.5. Conclusiones..... | 122 |
| 4.4. Desarrollo de un sensor óptico basado en papel para la determinación <i>in situ</i> de sulfuro de hidrógeno en muestras ambientales..... | 123 |
| 4.4.1. Estudio de la inmovilización de los reactivos en el soporte de papel . | 126 |
| 4.4.2. Obtención de la señal analítica..... | 128 |
| 4.4.3. Aplicabilidad del sensor | 129 |
| 4.4.4. Parámetros analíticos | 132 |
| 4.4.5. Estudio de posibles interferentes..... | 134 |
| 4.4.6. Análisis de muestras de agua | 134 |
| 4.4.8. Comparación con otros métodos | 137 |
| 4.4. Conclusiones..... | 138 |
| 4.5. Biosensor colorimétrico para la determinación de peróxido de hidrógeno | 139 |
| 4.6. Desarrollo de un dispositivo colorimétrico adaptado a una microplaca dirigido a la determinación <i>in situ</i> de glucosa en diversas muestras de suero simultáneamente..... | 156 |
| 4.6.1. Estudio de las condiciones de reacción | 158 |

| | |
|--|-----|
| 4.6.2. Inmovilización de HRP y GOx en soportes de PDMS-TEOS-SiO ₂ NPs-TMB | 160 |
| 4.6.3. Detección colorimétrica de la glucosa en la placa de pocillos | 163 |
| 4.6.4. Parámetros analíticos | 165 |
| 4.6.5. Estudio de posibles interferentes..... | 166 |
| 4.6.6. Determinación de glucosa en muestras de suero | 166 |
| 4.6.7. Comparación con otros métodos | 168 |
| 4.6.8. Conclusiones..... | 169 |
| CAPÍTULO V - CONCLUSIONES | 171 |
| BIBLIOGRAFÍA | 177 |
| GLOSARIO DE ABREVIATURAS | 219 |
| LISTADO DE FIGURAS..... | 225 |
| LISTADO DE TABLAS..... | 229 |
| ANEXOS..... | 231 |

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

1.1. Situación actual de la Química Analítica

El progreso científico constituye una herramienta imprescindible para resolver los problemas de la humanidad. En este sentido, la Química ha desempeñado un papel central en el desarrollo y en la mejora de la calidad de vida de los seres humanos. Concretamente, la Química Analítica ha tenido una amplia repercusión en áreas como la medicina, la calidad ambiental o la alimentación, contribuyendo a la resolución de problemas sociales y económicos en los distintos ámbitos.

Una de las definiciones actuales más aceptadas de la Química Analítica es la propuesta por el Profesor Valcárcel, que define esta disciplina como *“una ciencia metrológica que desarrolla, optimiza y aplica procesos químicos de medida encaminados a obtener información analítica de calidad de sistemas materiales para resolver problemas analíticos”* [1]. Como todas las ramas de la ciencia y la tecnología, la Química Analítica se encuentra en continua evolución debido a las demandas y cambios sociales, así como a la influencia de los avances logrados en otros ámbitos o disciplinas.

Desde un punto de vista general, se podría decir que la evolución de los métodos analíticos en el siglo XX se ha visto marcada por tres grandes hitos [2]:

- 1) La sustitución de los métodos clásicos por los métodos instrumentales
- 2) Empleo de ordenadores
- 3) Simplificación

Inicialmente, las técnicas analíticas se basaban, en general, en gravimetrías, volumetrías o determinaciones cualitativas. Por otra parte, en el caso de que la muestra necesitara un tratamiento previo al análisis, se recurría a métodos de separación mediante extracción, precipitación o destilación [3]. Sin embargo, el progreso tecnológico iniciado el pasado siglo dotó a los químicos de una gran variedad de herramientas capaces de llevar a cabo análisis de diversa índole, amén de reducir el tiempo de análisis y alcanzar límites de detección cada vez más bajos.

En primer lugar, la aparición de los primeros instrumentos (fotómetros, potenciómetros o cromatógrafos) supuso un punto de inflexión para la Química

Analítica, puesto que ofreció nuevas y potentes alternativas al empleo de los métodos clásicos, usados durante años.

Posteriormente, la irrupción de la informática en los laboratorios tuvo una gran repercusión en el avance de áreas como la quimiometría. Además, facilitó el manejo y tratamiento de gran cantidad de datos, posibilitó el desarrollo de aplicaciones informáticas propias, permitió la automatización de los procesos y la miniaturización de la instrumentación [2] (**Figura 1**).



Figura 1. Evolución de los métodos de análisis.

Si bien es cierto que la informática marcó un antes y un después en el desarrollo de la instrumentación y el tratamiento de datos, la evolución tecnológica experimentada en los últimos años por parte de los sistemas de transferencia de información y por los dispositivos móviles ha contribuido de manera decisiva a la generación de nuevos campos de I+D, tanto en la instrumentación como en la transmisión de las señales.

En líneas generales, en lo que llevamos de siglo, la Química Analítica ha estado marcada por el avance de la tecnología y el empleo de nanomateriales (nanociencia y nanotecnología) con fines analíticos. No obstante, de acuerdo con el Profesor Valcárcel [4], resulta complicado predecir cuáles serán, en un futuro, las líneas genéricas de I+D+T en el campo de la Química Analítica. Sin embargo, establece un posible grupo de tendencias, entre las que se encuentran el bioanálisis; el análisis de imágenes; la instrumentación basada en nuevos

principios; los análisis *in situ*; la automatización, simplificación y miniaturización; la nanociencia y nanotecnología; la interdisciplinariedad y la responsabilidad social.

El contexto social actual requiere que las metodologías analíticas se adecuen tanto a criterios de calidad cuantitativos como a criterios cualitativos. Dicho de otra manera: se pretende que, además de las propiedades supremas (exactitud y representatividad) y básicas (sensibilidad, precisión y selectividad), se tengan en cuenta las propiedades complementarias (rapidez, coste, etc.). Por lo tanto, uno de los retos actuales de los Químicos Analíticos reside en el desarrollo de métodos analíticos simplificados que satisfagan ambos criterios, permitiendo el análisis de muestras en el menor tiempo y con el menor coste posible, sin que ello suponga un detrimento de las propiedades supremas y básicas. Este planteamiento se debe a que los laboratorios reciben (y recibirán) más cantidad y variedad de muestras para su análisis, haciendo necesario desarrollar nuevas técnicas capaces de lidiar con este volumen de trabajo [2].

Aunque las metodologías tradicionales proporcionan una información detallada acerca de los compuestos presentes en la muestra, pueden llegar a ser inviables e ineficientes cuando el número de muestras a tratar es muy elevado [2]. Además, estos métodos resultan costosos en términos de tiempo (en la mayoría de los casos requieren de una etapa de pretratamiento de la muestra) y recursos (consumo de productos químicos y energía), con la consiguiente generación de residuos. Por consiguiente, resulta necesario desarrollar nuevas técnicas y procedimientos analíticos dirigidos a proporcionar información útil de manera simple, rápida y de bajo coste [5].

En este sentido, los Profesores Valcárcel y Cárdenas [2] establecieron una interesante división entre lo que denominaron *métodos de vanguardia* y *métodos de retaguardia*, con el fin de optimizar el tiempo a la hora de llevar a cabo los análisis: en primer lugar, las muestras se someten a una metodología de análisis rápida y barata (método de vanguardia) con el fin de discriminar aquellas muestras en las que no se encuentre el compuesto de interés. Posteriormente, en las que han obtenido un resultado positivo en el primer análisis se analizan mediante métodos más sofisticados (métodos de retaguardia) para obtener resultados más precisos y fiables.

Los sistemas de vanguardia deben estar diseñados para ser capaces de realizar análisis *in situ*. Además, dichos métodos han de estar enfocados para poder determinar una gran cantidad de muestras, proporcionando información de una manera rápida y simple. Sin embargo, cabe decir que, aunque los métodos de vanguardia fueron inicialmente propuestos como métodos de cribado, actualmente, su planteamiento puede incluir nuevas metodologías que permitan el análisis de muestras en un menor tiempo y a un coste inferior, sin dejar de lado las propiedades supremas y básicas.

En cambio, los métodos de retaguardia son métodos convencionales de análisis que implican el uso de instrumentos sofisticados (cromatografía líquida, cromatografía de gases, espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, absorción atómica, etc.). En este tipo de procedimientos se prima la precisión, selectividad y sensibilidad, dejando en un segundo plano el tiempo o la rapidez. El uso de estas metodologías está restringido dentro de los límites del laboratorio. Los métodos de retaguardia pretenden confirmar la información proporcionada por los métodos de vanguardia, además de transformar los datos cualitativos obtenidos en un primer análisis en resultados cuantitativos. Además, los métodos de retaguardia también pueden usarse como control de calidad de las metodologías de vanguardia para comprobar la fiabilidad de sus resultados.

Paralelamente (y continuando con las temáticas que han marcado las líneas de investigación e innovación en el campo de la Química Analítica), en la década de los 90, la creciente preocupación por las cuestiones ambientales provocaron el nacimiento de la **Química Sostenible** o **Química Verde**, un nuevo enfoque dentro de la Química focalizado en promover el desarrollo de tecnologías innovadoras, dirigidas a reducir o eliminar la generación de sustancias dañinas durante el ciclo de vida de los productos químicos [6]. Esta corriente se basa en 12 principios formulados por Paul Anastas y John Warner [7]:

1. Evitar la generación de residuos
2. Economizar los materiales
3. Usar y generar sustancias que posean poca o ninguna toxicidad
4. Preservar la eficacia funcional, reduciendo la toxicidad
5. Minimizar el uso de sustancias auxiliares

6. Reducción del consumo energético
7. Usar materias primas renovables
8. Reducir o evitar derivaciones innecesarias
9. Priorizar el uso de catalizadores
10. Diseñar productos pensando en su descomposición natural tras su uso
11. Desarrollo de tecnologías analíticas para la monitorización en tiempo real
12. Minimizar el riesgo de accidentes químicos

A pesar de ser un concepto relativamente reciente, la Química Verde ha tenido un desarrollo notable. Tal y como puede observarse en la **Figura 2**, el número de publicaciones que hacen referencia a este concepto ha ido aumentando durante los últimos años, hecho que refleja la repercusión e influencia que está teniendo este concepto a la hora de llevar a cabo nuevos trabajos. (Resultados obtenidos en la *Web of Science* mediante la búsqueda de “Green Chemistry” en el campo de “Título” OR “Tema”).

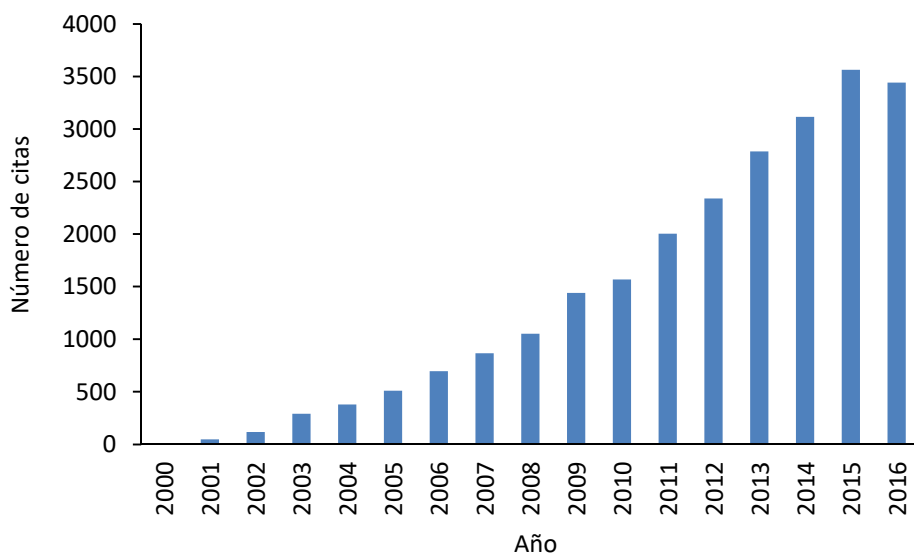


Figura 2. Evolución del número citas sobre la Química Verde en los últimos años. Fuente: *Web of Science*.

Sin embargo, algunos autores detectan una serie de limitaciones en los principios planteados por Anastas y Warner, llegando a cuestionar su validez o calificándolos de abstractos [8,9]. Así, en una reciente reflexión, Winterton plantea cuestiones acerca de cómo puede cuantificarse, de manera objetiva, el grado en que un proceso es verde [9]. La Huella de Carbono (CFP, del inglés *Carbon Footprint*) resulta una buena opción para llevar a cabo esta cuantificación, puesto que este parámetro representa las emisiones netas de gases de efecto invernadero (GHG, del inglés *GreenHouse Gases*) emitidos por un individuo, organización, evento o producto medidos como equivalentes de CO₂ [10]. Así, la CFP se puede entender como una herramienta de sensibilización acerca del coste ambiental asociado a un producto o proceso, de manera que influya en la toma de decisiones que contribuyan a la reducción de las emisiones de GHG.

Además, los principios anteriormente comentados están dirigidos hacia la optimización de procesos industriales, por lo que era prioritario realizar una adaptación de éstos a las características y necesidades de la Química Analítica [11]. En este contexto, Galuzka y col. [12] plantearon 12 principios alternativos con el fin de satisfacer esta carencia:

1. Aplicar técnicas de análisis directo para evitar el tratamiento de la muestra
2. Minimizar el volumen y número de muestras
3. Llevar a cabo determinaciones *in situ*
4. Integrar los procesos analíticos y las operaciones para reducir el consumo de reactivos y energía
5. Seleccionar métodos miniaturizados y automatizados
6. Evitar la derivatización
7. Reducir la generación de residuos e implantar medidas de gestión de los mismos
8. Los análisis multicomponente son preferibles a los individuales
9. Minimizar el consumo energético
10. Fomentar el uso de reactivos obtenidos a partir de fuentes renovables
11. Los reactivos tóxicos deben ser eliminados o sustituidos
12. Aumentar la seguridad del operador

Tal y como puede observarse, aunque los enunciados de la Química Verde coinciden, en algunos aspectos, con las reglas enunciadas por Galuzca y col. [12], estos últimos describen con mayor precisión las pautas que deben seguirse para que los avances en este campo no ocasionen un deterioro del entorno.

Por lo tanto, a la vista de las tendencias comentadas anteriormente, se pretende que los métodos analíticos del siglo XXI sean rápidos, económicos, sostenibles y, además, garanticen la calidad de los resultados.

Actualmente, los métodos de retaguardia han conseguido un elevado grado de automatización, análisis multielemental, reducción de residuos y miniaturización. Sin embargo, es en la etapa de tratamiento de la muestra donde todavía existen opciones de mejora para adaptarse a las exigencias actuales. En este sentido, la microextracción en fase sólida acoplada a un sistema de cromatografía capilar se erige como una opción interesante para cumplir con diversos de los principios propuestos por Galuzca y col. [12], como:

- ✓ La integración de procesos analíticos
- ✓ Evitar el tratamiento de la muestra
- ✓ Reducir el consumo de disolventes
- ✓ Métodos automatizados

Asimismo, en relación a los métodos de vanguardia, los dispositivos de análisis portátiles han permitido romper las barreras del laboratorio, cumpliendo con los siguientes enunciados de la Química Analítica Verde:

- ✓ Llevar a cabo determinaciones *in situ*
- ✓ Miniaturización de los sistemas
- ✓ Reducción de reactivos y consumo energético

Tanto las técnicas de microextracción como los dispositivos de análisis *in situ* permiten simplificar el proceso de análisis. Por una parte, la microextracción en fase sólida acoplada a un sistema de cromatografía capilar permite unificar la etapa de pretratamiento de la muestra y el análisis en una sola etapa, mientras que, por otra parte, los dispositivos de análisis *in situ* permiten llevar a cabo

determinaciones en el lugar donde se encuentra el analito, sin necesidad de desplazarse al laboratorio.

En los siguientes apartados se llevará a cabo una descripción detallada de estas dos metodologías de análisis, seleccionadas por compartir los principios de la Química Analítica Verde, así como las tendencias dirigidas a la simplificación/miniaturización. Asimismo, en el apartado del análisis *in situ* se han abordado aspectos relacionados con otras temáticas tales como el análisis de imágenes y el bioanálisis.

1.2. Microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida capilar

Durante los últimos años, gran parte de los avances llevados a cabo en el campo de la Química Analítica se han focalizado en el desarrollo de instrumentos cada vez más sofisticados. No obstante, a pesar de los grandes avances realizados en instrumentación, el tratamiento de la muestra no ha seguido la misma evolución, convirtiéndose en un cuello de botella de muchos procesos analíticos [13–15].

Muchos tratamientos, amén de un alto grado de manipulación, requieren diversas etapas, con el consiguiente riesgo de generar errores, contaminar la muestra o sufrir pérdidas de producto. Además, esta etapa requiere, habitualmente, el consumo de grandes cantidades de disolventes, reactivos, energía y tiempo. Por consiguiente, debido a estas razones, el pretratamiento de muestra está considerado como un cuello de botella en casi todos los métodos analíticos [16].

Los procesos de extracción (i.e., la separación de los compuestos de interés desde la matriz de la muestra) suelen incluirse dentro de la etapa de pretratamiento. El método tradicional de llevar a cabo esta separación es mediante la **extracción líquido-líquido** (LLE, del inglés *Liquid-Liquid Extraction*), técnica basada en la transferencia de uno o varios componentes presentes en un disolvente, generalmente acuoso, a otro inmiscible con el primero y por el cual los analitos sienten una mayor afinidad. Sin embargo, su uso ha ido disminuyendo con el paso

de los años, puesto que es una técnica relativamente tediosa y que requiere el consumo de elevadas cantidades de disolventes orgánicos.

Una alternativa bastante común a la LLE es la **extracción en fase sólida** (SPE, del inglés *Solid Phase Extraction*), consistente en el empleo de columnas rellenas con una fase adsorbente sólida capaz de retener los analitos cuando la muestra se hace circular a través de ellas. Sin embargo, la SPE requiere diversas etapas para llevar a cabo la extracción, lo que la convierte en una técnica relativamente tediosa.

No obstante, siguiendo los principios de la Química Verde, en las últimas décadas se han introducido nuevas técnicas de extracción miniaturizadas, donde la cantidad de fase extractante es muy inferior en relación al volumen de la muestra [17]. Estas técnicas permiten reducir el consumo de disolventes, además de mejorar la selectividad y la preconcentración. Sin embargo, contrariamente a lo que ocurre con las técnicas clásicas de LLE y SPE, las técnicas de microextracción no son procesos cuantitativos, por lo que la fracción de analito extraída depende del coeficiente de partición.

La **microextracción en fase líquida** (LPME, del inglés *Liquid-Phase Microextraction*) se introdujo para paliar las desventajas que ofrecía la LLE. Al igual que su predecesora, la extracción de los analitos desde la matriz se lleva a cabo mediante el uso de disolventes inmiscibles con el agua, aunque, en este caso, el volumen necesario es mucho menor.

Diversas técnicas han sido propuestas para llevar a cabo la LPME. Una de ellas es la **microextracción en gota** (SDME, del inglés *Single-Drop Microextraction*), donde una gota de disolvente extractante inmiscible con el agua se suspende desde una jeringa en un medio líquido o gaseoso. Después de la extracción, la gota se retrae a la microjeringa y es inyectada al sistema adecuado para su análisis [18,19].

Otra modalidad interesante es la **microextracción líquido-líquido dispersiva** (DLLME, del inglés *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*), basada en la mezcla entre un disolvente dispersante, un disolvente extractante (más denso que el agua) y la fase acuosa. La fase dispersiva asegura la miscibilidad entre las fases orgánica y acuosa, por lo que la fase extractante se dispersa en forma de pequeñas

gotitas en la fase acuosa, aumentando enormemente el área de contacto entre ambas. Posteriormente, la disolución se somete a un proceso de centrifugación, quedando la fase extractante depositada en el fondo del vial, donde es extraída con una microjeringa [20–22].

De la misma manera, Pedersen y Rasmussen [23] propusieron la **microextracción en fase líquida con fibra hueca** (HFLPME, del inglés *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*), una técnica en la que la extracción se lleva a cabo mediante un disolvente orgánico inmisible con el agua retenido en los poros de una fibra de polipropileno que se encuentra en contacto con la disolución [24]. La HFLPME puede realizarse en la modalidad de dos o tres fases.

Por otra parte, el concepto de **microextracción en fase sólida** (SPME, del inglés *Solid Phase Microextraction*) fue propuesto por Pawliszyn y col. en el año 1990 como alternativa a la SPE [25]. En dicho trabajo, los autores propusieron la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta de un polímero adsorbente (poliimida) para extraer compuestos clorados volátiles presentes en una muestra de agua. Para ello, la fibra se expuso a la muestra acuosa durante 2 minutos y, seguidamente, los analitos se desorbieron térmicamente mediante la inyección directa de la fibra en un sistema cromatográfico de gases (GC, del inglés *Gas Chromatography*). El método propuesto por Pawliszyn y col. cosechó muy buenos resultados, puesto que eliminó los inconvenientes de la SPE (reducción en la señal de los blancos, eliminación de disolventes y minimización de los tiempos de extracción), manteniendo sus ventajas. Sin embargo, la SPME estaba restringida al análisis de compuestos volátiles, haciéndose necesaria una etapa de derivatización en el caso de que los analitos no lo fueran.

Cinco años más tarde, Chen y Pawliszyn [26] solventaron el problema de la volatilidad acoplando la SPME a un sistema cromatográfico líquido de alto rendimiento (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*). En ese estudio, una fibra recubierta con polidimetilsiloxano (PDMS) se expuso durante 30 minutos a una muestra de agua fortificada con una mezcla de compuestos policíclicos aromáticos (PAHs, del inglés *Poly-Aromatic Hydrocarbons*) y, a continuación, se introdujo en la cámara de desorción. Seguidamente, cambiando la válvula a la posición de inyección, una mezcla $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ arrastró los analitos a

la columna cromatográfica. No obstante, a pesar de los buenos resultados obtenidos, este método todavía requería de dos etapas separadas: (i) extracción de los analitos y (ii) desorción de los compuestos.

Finalmente, Eisert y Pawliszyn [27] idearon un sistema automatizado de SPME-HPLC mediante el cual la extracción y posterior análisis de los compuestos se llevaba a cabo en una sola etapa. En este trabajo, un fragmento de columna capilar de GC (Omegawax 250) se usó para extraer y preconcentrar pesticidas en una muestra acuosa. Así, con la válvula en posición de inyección, se llevaron a cabo 20 ciclos de aspiración/expulsión de la muestra a través de la columna capilar. A continuación, girando la válvula a la posición de carga, los analitos fueron desorbidos con metanol y transferidos al bucle de inyección. Finalmente, volviendo a girar la válvula a la posición de inyección, se llevó a cabo la separación isocrática de los pesticidas mediante una mezcla 60:40 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (**Figura 3**). La SPME en tubo (IT, del inglés in-tube) no solamente redujo considerablemente el tiempo de análisis, sino que aumentó la precisión y exactitud del método al eliminar las etapas de manipulación manual de la muestra, permitiendo la automatización del proceso.

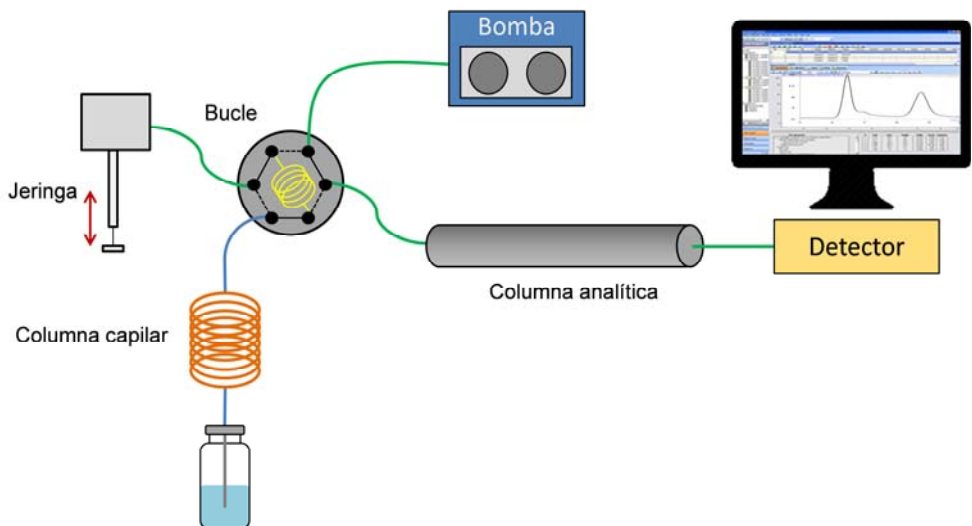


Figura 3. Representación esquemática del sistema IT-SPME ideado por Eisert y Pawliszyn.

Además de facilitar y simplificar enormemente la etapa relativa al pretratamiento de la muestra, la IT-SPME es una técnica respetuosa con el entorno, puesto que minimiza el uso de disolventes, reduciendo, por consiguiente, la generación de residuos. Tal y como se muestra en la **Figura 4**, el número de publicaciones en las que se cita la IT-SPME siguen creciendo año tras año, hecho que demuestra el interés generado por esta técnica (Resultados obtenidos al realizar una búsqueda en la *Web of Science* utilizando las palabras clave “IT-SPME” OR “In-tube SPME” OR “In-tube solid phase microextraction”).

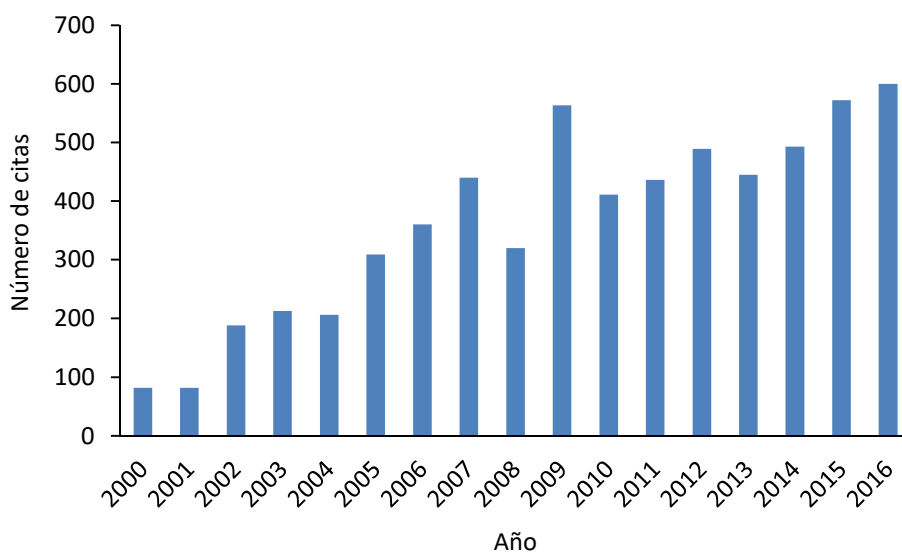


Figura 4. Evolución del número de citas sobre IT-SPME en los últimos años. Fuente: *Web of Science*.

No obstante, al igual que ocurre con la LPME, en los últimos años se han propuesto diversas variantes de SPME, tal y como se comenta en los siguientes párrafos.

En el año 2004, Abdel-Rehim propuso la **microextracción mediante adsorbentes empaquetados** (MEPS, del inglés *Microextraction by Packed Sorbents*) [28]. En esta técnica, la fase adsorbente se integra en el interior de una microjeringa. De esta manera, la muestra se hace pasar a través de la fase adsorbente por succión, produciéndose la retención de los analitos. Posteriormente, la desorción se lleva a cabo mediante un disolvente [14,29,30].

Otra modalidad de SPME es la conocida como **extracción por adsorción sobre barra agitadora** (SBSE, del inglés *Stir Bar Sorptive Extraction*) [31], en la que la retención de los analitos se produce en una barra agitadora recubierta con un material adsorbente. Dicha barra se sumerge en una disolución y se mantiene en agitación durante un periodo de tiempo determinado. Posteriormente, la barra agitadora se somete a un proceso de desorción térmica o mediante el uso de un disolvente adecuado [32].

Por otra parte, la **extracción en fase sólida dispersiva** (DSPE, del inglés *Dispersive Solid-Phase Extraction*) [33] es una variante de la DLLME que utiliza una dispersión de material adsorbente para realizar la extracción de los analitos. De esta manera se consigue que el área de contacto entre la fase adsorbente y los analitos sea muy elevada. Generalmente, el material utilizado para la dispersión es análogo al utilizado en SPE, aunque se han propuesto distintos materiales para ser utilizados como fase adsorbente, como son los MWCNT [34] o el grafeno [35].

Recientemente, Benedé y col. [36] combinaron los principios en los que se basan la SBSE y la DSPE para desarrollar la **microextracción dispersiva por adsorción sobre barra agitadora** (SBSDME, del inglés *Stir-Bar Sorptive-Dispersive Microextraction*). En este método, una barra agitadora se recubre con nanopartículas magnéticas (MNPs, del inglés *Magnetic Nanoparticles*) y se introduce en la disolución donde se encuentran los analitos a extraer. Cuando la agitación es suave, las MNPs quedan adheridas a la superficie de la barra agitadora mediante interacciones magnéticas, produciéndose la adsorción de los analitos mediante un mecanismo análogo a la SBSE. Sin embargo, cuando la velocidad de agitación se incrementa, las MNPs se dispersan en la disolución y la extracción se lleva a cabo mediante DSPE. Finalmente, cuando la extracción ha acabado, se disminuye la velocidad de agitación y las MNPs vuelven a depositarse sobre la barra agitadora [37].

Sin embargo, al contrario de la IT-SPME, hasta la fecha, estas técnicas no pueden ser acopladas a sistemas cromatográficos, por lo que la extracción y la inyección de las muestras deben realizarse en etapas separadas.

1.2.1. Modalidades de IT-SPME

Una de las principales fortalezas que ofrece la IT-SPME reside en su versatilidad a la hora de adaptarse a diferentes sistemas cromatográficos. En este sentido, pueden encontrarse ejemplos de publicaciones en las que la IT-SPME ha sido acoplada a sistemas de NanoLC [38], UHPLC [39,40] o CapLC [41–48]. Además, la extracción y preconcentración mediante IT-SPME puede llevarse a cabo mediante distintas modalidades, siendo las más comunes (i) *carga/expulsión* y (ii) *circulación* [49]. La principal diferencia entre estas dos modalidades radica en el hecho de que, en la primera, la muestra viaja en dos sentidos, mediante ciclos de aspiración y expulsión, mientras que en la segunda configuración, la muestra circula de manera continua y unidireccional a través de la columna capilar.

En la **modalidad de carga/expulsión**, la columna capilar se inserta entre la aguja y el bucle de un inyector automático programable. Seguidamente, una fracción de la muestra es aspirada y expulsada repetidamente a través de la columna capilar hasta alcanzar el equilibrio. Finalmente, se produce la desorción y transferencia de los analitos a la columna analítica mediante extracción estática, con el disolvente apropiado, o de manera dinámica, con el paso de la fase móvil a través de la columna (**Figura 5**).

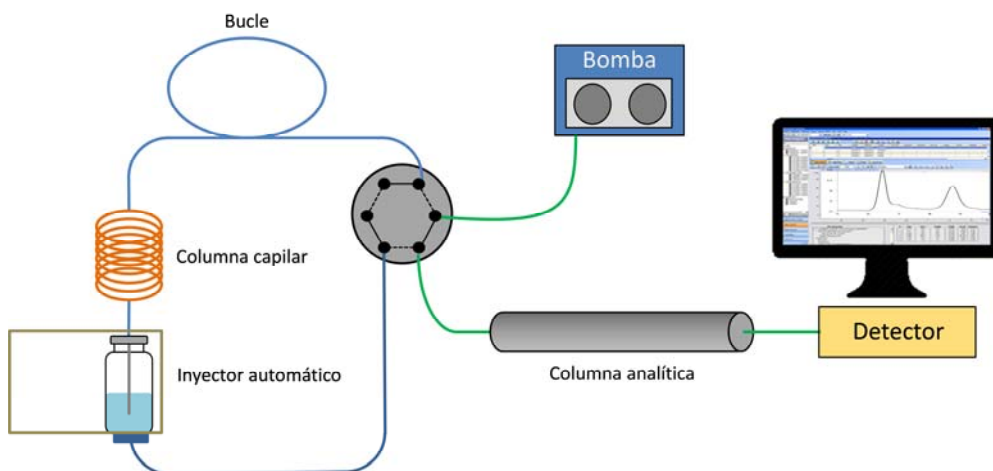


Figura 5. Representación esquemática del sistema IT-SPME en la modalidad de carga/expulsión.

Aunque la técnica no lleva a cabo una extracción cuantitativa, pueden alcanzarse recuperaciones altas aumentando el número de ciclos de carga/expulsión. Por otra parte, esta modalidad suele utilizarse para llevar a cabo análisis en matrices complejas, donde se dispone de poco volumen de muestra (e.g. muestras biológicas).

En la **modalidad de circulación**, la configuración más común consiste en emplear una columna capilar como bucle de inyección del sistema cromatográfico. En esta conformación, también conocida como *IT-SPME en válvula*, los analitos quedan retenidos en el capilar durante el proceso de carga de la muestra y, posteriormente, son transferidos a la columna analítica mediante un cambio de posición de la válvula (**Figura 6**).

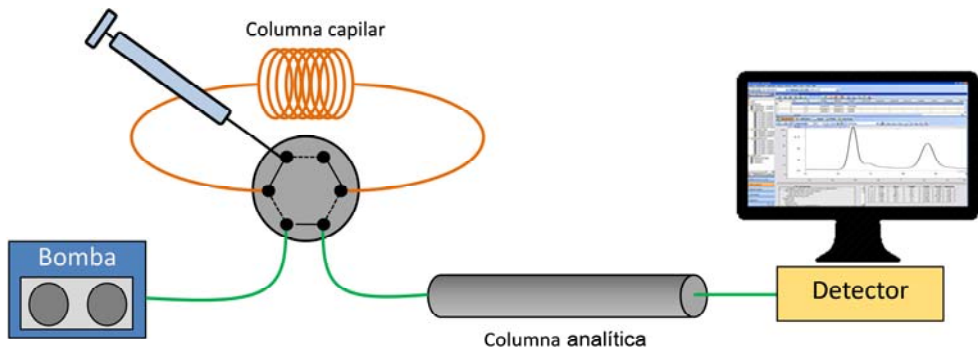


Figura 6. Representación esquemática del sistema IT-SPME en válvula.

Aunque la retención que se consigue mediante este método es menor que en la modalidad anterior, el paso de volúmenes elevados de muestra a través de la columna capilar permite alcanzar niveles de sensibilidad elevados. Por ello, esta configuración suele utilizarse en el análisis de muestras de agua, puesto que pueden inyectarse grandes volúmenes de muestra a través de la columna capilar.

Por otra parte, esta modalidad también puede llevarse a cabo mediante **dos válvulas**, siendo una automática y otra manual [50]. Este montaje se ha utilizado para poder acoplar la IT-SPME a un sistema de UHPLC, aprovechando, de esta manera, las ventajas que ofrecen ambas técnicas. Así, la columna capilar se usa como bucle de extracción en la primera válvula, mientras que la segunda evita que

las altas presiones necesarias para llevar a cabo la UHPLC afecten al capilar [39,40] (Figura 7).

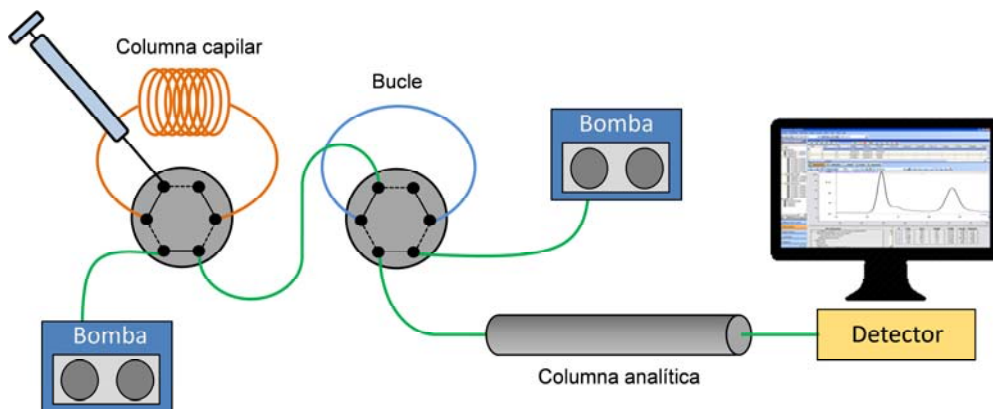


Figura 7. Representación esquemática de un sistema con dos válvulas en la modalidad de circulación.

Llegados a este punto, cabe destacar que el grupo de investigación MINTOTA, donde se han llevado a cabo el trabajo recopilado en esta Tesis, está especializado en el análisis de compuestos mediante IT-SPME acoplada a sistemas cromatográficos. Muestra de ello son los más de 30 trabajos publicados en revistas científicas de ámbito internacional en los que se hace referencia a esta técnica.

1.2.2. Parámetros a tener en cuenta en la IT-SPME-LC

Una vez descritas las principales modalidades de IT-SPME, resulta necesario comentar los parámetros que pueden influir de manera directa en el resultado del análisis.

Un aspecto crítico a tener en cuenta a la hora de diseñar el método recae en la correcta **selección de la fase adsorbente**, puesto que de ello dependerá el éxito de la extracción y preconcentración de los analitos.

Actualmente, existe un amplio catálogo de columnas capilares disponibles en el mercado. Por este motivo, muchos de los estudios llevados a cabo se sirven de columnas comerciales para realizar los análisis: divinilbenceno poroso (Supel-Q

Plot) para el análisis de aflatoxinas [51], esteroides [52], aminas heterocíclicas [53] o clorofila [48]; la determinación de compuestos carbonílicos mediante columnas de TRB-5 (95% dimetil 5% difenilpolisiloxano) [54]; el análisis de patulina llevado a cabo mediante el uso de tamices moleculares de carboxeno (Carboxen-1006 PLOT 5% difenil 95% polidimetilsiloxano) [55]; cuantificación de hidrocarburos policíclicos aromáticos [56] o antidepresivos [57] utilizando una columna polisiloxano (14% cianopropilfenil metilpolisiloxano); CP-Pora Plot amina para analizar nicotina, cotinina y alcaloides [58] o ácido perfluorooctanoico [59]; o columnas de polietilenglicol para determinar rifampicina [60].

Sin embargo, la eficiencia extractiva proporcionada por las columnas capilares convencionales, en algunos casos, puede llegar a ser limitada. Esto se debe principalmente a la baja capacidad de carga del recubrimiento y a la lenta difusión de los analitos hacia la fase adsorbente [49]. Por lo tanto, existe un gran interés en el desarrollo de recubrimientos capilares alternativos que mejoren la sensibilidad, selectividad, estabilidad y tiempo de extracción.

Liu y col. describieron el uso de recubrimientos basados en nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, del inglés *Multi Walled Carbon NanoTubes*) para el análisis de anilinas sustituidas [61]. También existen ejemplos de columnas modificadas con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs, del inglés *Single Walled Carbon NanoTubes*) [38] y grafeno [62] para el análisis de PAHs. Además, el uso de recubrimientos modificados con nanopartículas (NPs) de TiO₂ [63] o SiO₂ [64] ha sido empleado para determinar fosfopéptidos y disruptores endocrinos, respectivamente.

Otra alternativa interesante para mejorar la selectividad de las columnas capilares convencionales reside en el uso de polímeros sintéticos que presentan regiones específicas para el reconocimiento de determinados compuestos (MIPs, del inglés *Molecularly Imprinted Polymers*). Zarejousheghani y col. emplearon estos recubrimientos para determinar 4-nitrofenol en muestras ambientales [65], aunque también se ha aplicado para la monitorización de drogas [66] o en bioanálisis [67].

Finalmente, comentar el trabajo realizado por Moliner y col., en el que desarrollaron un recubrimiento basado NPs de Fe_3O_4 que se aplicó en la determinación de ácido acetil salicílico, acetaminofén, atenolol, diclofenaco e ibuprofeno [68]. La aplicación de un campo magnético externo se tradujo en una retención de los analitos prácticamente cuantitativa. La IT-SPME magnética también se ha aplicado de manera satisfactoria en la determinación de triazinas [41] y compuestos organofosforados [69].

En ambas modalidades del IT-SPME, el **caudal** al que se realiza el análisis es un parámetro que debe ajustarse teniendo en cuenta que debe ser lo suficientemente bajo para que permita una correcta extracción de los analitos, sin que ello provoque una excesiva ralentización del análisis. Así, en la bibliografía pueden encontrarse ejemplos de trabajos en los que los caudales utilizados son del orden de $\mu\text{L}/\text{min}$ [44,64,70], aunque también pueden usarse flujos mayores (mL/min) [60,71].

En la modalidad de circulación, el **volumen de muestra procesado** es un parámetro de especial interés, puesto que la inyección de volúmenes mayores implica una mayor cantidad de analito retenido (hasta la saturación de la fase adsorbente), aunque esto implique un mayor consumo de muestra [50]. No ocurre lo mismo en el caso de la configuración de carga/expulsión, donde la extracción y preconcentración de los analitos se consigue aumentando el número de ciclos de aspiración y expulsión de la muestra. Los volúmenes inyectados pueden variar de μL [42] a varios mL [43,44] según las necesidades de cada caso.

Un efecto similar tiene la **longitud de la columna capilar**, puesto que longitudes mayores implican que mayor superficie de material adsorbente disponible para extraer los analitos. En este sentido, se han publicado trabajos en los que utilizan columnas capilares de 20 cm [72], 30 cm [45], 60 cm [55], 70 cm [73] o 80 cm [60].

En aquellos casos en los que se analicen muestras complejas en cuanto a su composición, puede ser necesaria una etapa de **lavado de la columna capilar**, consistente en la circulación de un cierto volumen de disolvente a través de la fase adsorbente para que arrastre las posibles sustancias que puedan interferir en el

análisis. Así, en esta etapa, tanto el tipo como el volumen de disolvente son parámetros que deben ser optimizados para conseguir eliminar la suciedad sin que ello provoque la elución del analito. Generalmente, el lavado de la columna se realiza mediante la inyección volúmenes de H₂O del orden de μL [44,45].

Por último, una vez los analitos han sido retenidos en la fase adsorbente, es necesario desorberlos para ser transferidos a la columna analítica. La **desorción de los analitos** puede ser llevada a cabo de dos maneras diferentes: en modo estático (mediante el uso de un disolvente) o dinámico (mediante la fase móvil), siendo éste último el método más común. En el caso de una desorción estática, las variables que afectan al éxito de la desorción son el volumen de disolvente y el tiempo de extracción. Por otra parte, en la desorción dinámica, la eficacia de la desorción está determinada por caudal y la composición de la fase móvil.

1.3. Dispositivos de análisis *in situ*

Tradicionalmente, un análisis químico está compuesto por una secuencia de etapas que incluyen, entre otras, la recogida de muestras y su posterior transporte al laboratorio para ser analizadas.

No obstante, uno de los grandes retos a los que se enfrenta la Química Analítica reside en el hecho de desarrollar dispositivos que permitan llevar a cabo determinaciones *in situ*, es decir, en el lugar donde se encuentra el compuesto de interés [74]. En este tipo de determinación, tanto la adquisición de las muestras como el resultado del análisis ocurren en el mismo espacio. De esta manera, el riesgo de contaminación o degradación de la muestra se minimiza y, además, se suprime la etapa de transporte de la muestra al laboratorio, con la consiguiente reducción de tiempo, costes y recursos [75]. Para ello, estos equipos deben reunir una serie de características, como son la simplicidad, rapidez, portabilidad y bajo coste [76]. Actualmente, ya se encuentran disponibles en el mercado distintos equipos que reúnen dichas características, como glucómetros, test de embarazo o medidores de alcohol en aire exhalado. Además, el nivel de simplicidad adquirido

por estos instrumentos permite que los análisis puedan ser realizados por personal no especializado.

En la **Tabla 1** aparecen detalladas las principales características de los métodos de análisis *in situ* más habituales, clasificados como estaciones de monitorización, instrumentos portátiles, dispositivos electroquímicos y dispositivos ópticos [74]. La selección del método más apropiado dependerá de factores como el objetivo de la determinación, los recursos disponibles o la formación del personal que vaya a realizar el análisis.

Tabla 1. Principales características de los métodos de análisis *in situ* más habituales.

| Método de análisis in-situ | Tipos | Cualificación del operario | Tipo de análisis | Ventajas | Inconvenientes |
|--------------------------------|--|----------------------------|------------------|--|--|
| Estaciones de medición remotas | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Calidad del aire ❖ Calidad del agua | Alta | Continuo | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Exactitud ↑ ✓ Precisión ↑ ✓ Sensibilidad ↑ ✓ Análisis múltiple | <ul style="list-style-type: none"> ✗ Precio ↑ ✗ Consumo energético ↑ |
| Instrumentos portátiles | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Espectrofotométricos ❖ Fluorimétricos ❖ Cromatográficos ❖ Infrarrojos | Alta | Discontinuo | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Portabilidad ✓ Exactitud ↑ ✓ Portabilidad ✓ Bajo consumo energético | <ul style="list-style-type: none"> ✗ Precio ↑ |
| Dispositivos electroquímicos | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Potenciométricos ❖ Voltamperométricos ❖ Conductímetros | Baja | Discontinuo | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Sensibilidad ↑ ✓ Bajo consumo energético | <ul style="list-style-type: none"> ✗ Estabilidad ↓ ✗ Exactitud ↓ |
| Dispositivos ópticos | <ul style="list-style-type: none"> ❖ Colorimétricos ❖ Fluorescentes ❖ Quimioluminiscentes | Baja | Discontinuo | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Simplicidad ✓ Bajo coste ✓ Portabilidad ✓ Consumo energético ↓ | <ul style="list-style-type: none"> ✗ Exactitud ↓ ✗ Sensibilidad ↓ |

De entre las diferentes opciones expuestas en la **Tabla 1**, los dispositivos ópticos ofrecen una serie de propiedades interesantes (bajo coste, portabilidad, bajo consumo energético, simplicidad) que los hacen especialmente atractivos desde el punto de vista analítico [77]. La gran mayoría de los dispositivos ópticos son de tipo colorimétrico, debido a que los cambios de color que indican la presencia del analito pueden ser detectados visualmente, sin necesidad de instrumentación [78,79]. Entre estos dispositivos podemos encontrar kits, dispositivos de liberación de reactivos, sensores sólidos, tiras reactivas, plataformas microfluídicas, tubos colorimétricos, matrices colorimétricas y sensores plasmónicos.

Los **kits** constan de distintas disoluciones que, al añadirlas a la muestra, provocan un cambio de color cuya intensidad depende de la concentración de analito. Estos test son muy habituales para la determinación de parámetros como el pH o el cloro, entre otros. Otras aplicaciones importantes son los kits desarrollados para los análisis forenses o para la identificación de drogas ilícitas.

Las **tiras reactivas** se desarrollaron, inicialmente, con el propósito de llevar a cabo análisis clínicos [80]. Generalmente, en este tipo de dispositivos, distintos reactivos cromóforos se encuentran inmovilizados sobre un soporte de papel, permitiendo el análisis de diversos compuestos de manera simultánea. Las tiras reactivas ofrecen una serie de ventajas, como son la rapidez, robustez o el bajo coste. Sin embargo, no dejan de ser tests cualitativos, no pudiendo utilizarse para cuantificar [81]. Actualmente, existen gran cantidad de aplicaciones comerciales, tanto en el campo de la salud como en el medioambiental.

Los **tubos colorimétricos** son instrumentos de lectura directa, ampliamente utilizados en Higiene Industrial, para el análisis de gases y vapores tóxicos. Estos dispositivos constan de un tubo de vidrio calibrado, relleno de un material poroso impregnado con un reactivo cromóforo. Después de romper sus dos extremos, el aire es forzado a pasar a través del tubo mediante una bomba de muestreo manual, produciéndose un cambio de color cuya longitud indica la concentración de contaminante. Actualmente, hay disponible una amplia gama de tubos colorimétricos en el mercado, capaces de determinar una gran variedad de contaminantes a diferentes rangos de concentración. Sin embargo, aunque estos instrumentos proporcionan lecturas de manera rápida y simple, en algunos casos, el cambio de color resulta difícil interpretar [82].

Los **dispositivos liberadores de reactivos** han sido recientemente introducidos para el análisis *in situ*. Se basan en la inmovilización de todos los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de derivatización en un soporte sólido. La metodología consiste en sumergir los soportes en la disolución de la muestra, produciéndose la difusión de los reactivos inmovilizados hacia la disolución, y dando lugar a la reacción de derivatización. Un ejemplo es el propuesto por Prieto y col. para la determinación de amonio en aguas, en el que se inmovilizó timol y nitroprusiato en una matriz de PDMS [83].

En los **sensores sólidos**, como en el caso anterior, un reactivo cromóforo se encuentra inmovilizado en un soporte. Sin embargo, en este caso, el reactivo no difunde a la disolución, sino que el analito difunde hacia el interior del sensor, produciéndose la derivatización en el seno de la matriz. En este sentido, el grupo de investigación MINTOTA ha desarrollado distintos sensores basados en este principio para la determinación de aminas volátiles en muestras de aire [84], biocidas en formulaciones industriales [85] o caseína en muestras de efluentes de industrias lácteas [86], entre otros.

Las **plataformas microfluídicas** son dispositivos miniaturizados formados, generalmente, por sustratos de celulosa sobre los cuales se encuentran depositados los reactivos. La muestra circula por capilaridad a través de las conducciones hidrofílicas trazadas mediante barreras de tipo hidrofóbico, produciéndose un cambio de color cuando ésta alcanza la zona en la que se encuentra inmovilizado el reactivo. Estos dispositivos pueden diseñarse para analizar uno o múltiples compuestos, en cuyo caso el sistema dispone de varios reactivos [87]. Finalmente, dependiendo de la intensidad de color desarrollado, puede llevarse a cabo la cuantificación del analito [87,88].

Las **matrices colorimétricas** se basan en el uso de tintes químicamente sensibles adsorbidos sobre un soporte que, al ser expuestos a mezclas complejas de determinados compuestos, proporcionan un patrón característico que permite identificar su composición [89–94]. Tradicionalmente, este tipo de análisis implicaba técnicas de separación y posterior análisis de sus componentes mediante técnicas espectroscópicas [95]. Estos dispositivos constituyen un método de análisis versátil, puesto que permiten analizar líquidos, vapores y gases a diferentes niveles de concentración. En este sentido, en la bibliografía pueden encontrarse ejemplos de matrices colorimétricas desarrolladas para analizar explosivos [92], compuestos orgánicos volátiles [90,96], refrescos [97], aminas [98], productos de descomposición [99] o bacterias [91].

Otro tipo de dispositivo colorimétrico lo constituyen los denominados **sensores plasmónicos**, basados en el cambio de color producido por la agregación de NPs en presencia de determinadas especies. La banda de plasmón superficial se produce por la oscilación de los electrones de la superficie del metal cuando éstos

entran en resonancia con la radiación electromagnética [100–102]. En particular, las NPs de metales nobles presentan colores intensos en la región del visible debido a la banda de plasmón, mientras que sus agregados tienen colores diferentes [102]. Desde el descubrimiento del fenómeno de la banda de plasmón a principios de los años 80, el desarrollo de este tipo de sensores ha experimentado un incremento considerable [102,103], habiéndose desarrollado aplicaciones para la detección y análisis de compuestos en áreas como la alimentación [104,105], la medicina [106–109] o la contaminación medioambiental [110–112].

1.3.1. Sensores y biosensores

La IUPAC define a los **sensores químicos** como “*dispositivos integrados capaces de proporcionar información química específica cuantitativa o semicuantitativa, formados por un elemento de reconocimiento que está en contacto directo con un elemento de transducción*” [113]. En algunos casos, los sensores colorimétricos están basados en los cambios de color producidos en una disolución [114–116] aunque, en otras ocasiones, los reactivos se encuentran inmovilizados en un soporte, por lo que el cambio de color se produce en él.

En los últimos años, el uso del papel como soporte para desarrollar distintos tipos de dispositivos ha suscitado un gran interés debido a su versatilidad, abundancia, bajo coste y la posibilidad de ser impregnado con líquidos mediante acción capilar. Además, existe una gran variedad de tipos de papel, lo que permite elegir el soporte más adecuado en función de las características que se necesiten en cada caso. No obstante, tal y como comenta Liana y col. [117] en su revisión sobre los avances en dispositivos basados en papel, uno de los más utilizados para llevar a cabo aplicaciones analíticas es el papel Whatman®. Estos dispositivos han sido ampliamente utilizados para llevar a cabo análisis cualitativos y semicuantitativos, puesto que la simplicidad de la técnica permite detectar el cambio de color mediante simple inspección visual, aplicándose en campos tan diversos como la medicina [118], el medio ambiente [87,119–123] o la alimentación [124].

Sin embargo, otros soportes como el PDMS también han sido utilizados para inmovilizar reactivos mediante su atrapamiento en la matriz polimérica. El PDMS

es un polímero lineal formado por unidades $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ perteneciente a los compuestos de organosilicio (**Figura 8**). Este material resulta muy interesante debido a propiedades como un proceso de fabricación simple y barato, flexibilidad mecánica y estabilidad, alta constante dieléctrica, transparencia óptica en las regiones del espectro UV, Vis y NIR, alta biocompatibilidad y bioestabilidad [125,126].

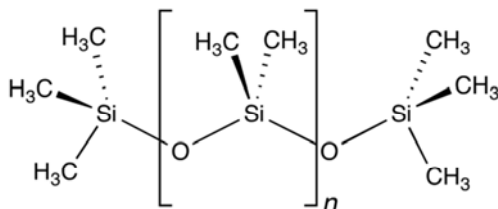


Figura 8. Estructura química del polidimetilsiloxano.

Por ello, distintos autores han empleado este material para desarrollar sensores colorimétricos basados en la inmovilización de reactivos cromóforos atrapados en la matriz polimérica. En este sentido, Prieto y col. [83] inmovilizaron timol y nitroprusiato en una matriz de PDMS con el fin de determinar amonio en aguas. De la misma manera, Argente y col. atraparon 1,2-naftoquinona-4-sulfonato en una matriz de PDMS:TEOS para detectar anfetaminas [127].

En algunas ocasiones, para poder desarrollar la reacción que da lugar a la señal analítica, es necesaria la acción de un elemento biológico, como puede ser un anticuerpo, bacterias, células, ADN o enzimas [128]. El resultado de esta combinación es lo que se conoce como **“biosensor”**, término acuñado por Leland C. Clark y Champ Lyons en el año 1962 [129]. Desde que estos autores utilizaron la glucosa oxidasa para determinar la concentración de glucosa, multitud de trabajos se han llevado a cabo para desarrollar sensores capaces de detectar gran variedad de compuestos.

Las enzimas son moléculas ampliamente utilizadas en la fabricación de biosensores, puesto que son capaces de catalizar reacciones con un elevado grado de especificidad y selectividad hacia el sustrato [130]. Sin embargo, la baja estabilidad o la dificultad de reutilizarlas son algunas de las limitaciones que, junto con su elevado precio, provocan que su utilización sea, en algunos casos,

restrictiva. No obstante, estos problemas pueden minimizarse mediante la aplicación de alguna técnica de inmovilización [131].

La **inmovilización de enzimas** hace referencia al confinamiento o localización de éstas en una cierta región del espacio sin perder sus propiedades catalíticas, además de poder ser usadas repetida y continuamente [131]. Este procedimiento ofrece una serie de ventajas interesantes respecto al uso de la enzima libre, como son [130]:

- (I) Mayor estabilidad frente a incrementos de temperatura
- (II) Mejora de la enantioselectividad
- (III) Posibilidad de reutilizar las enzimas
- (IV) Conservación de sus propiedades durante períodos más largos

Sin embargo, para que dicha inmovilización sea satisfactoria, hay que tener en cuenta diversas consideraciones, puesto que el éxito del proceso depende, en gran medida, de dos parámetros: (i) la elección del soporte y (ii) el método de inmovilización.

Las **características del soporte** tienen influencia directa en las propiedades finales que presentará el sistema enzima-sustrato [132]. Por consiguiente, hay diversos aspectos que deben valorarse a la hora de seleccionar la matriz en la que tendrá lugar la inmovilización de las biomoléculas [128,131,133]:

- ✓ Grupos funcionales susceptibles de ser derivatizados
- ✓ Estabilidad química y buenas propiedades mecánicas
- ✓ Inercia frente al analito
- ✓ Baja o nula toxicidad

Aunque no existe un soporte óptimo que permita llevar a cabo la inmovilización de las enzimas, hay disponible una gran variedad de materiales (orgánicos e inorgánicos) susceptibles de ser utilizados como medio de anclaje de este tipo de biomoléculas. Por lo tanto, la elección de una u otra matriz dependerá de las prestaciones que se necesiten en cada momento. En la **Tabla 2** se recogen los soportes más utilizados para realizar la inmovilización enzimática.

Tabla 2. Clasificación de los soportes utilizados para la inmovilización de enzimas.

| Orgánicos |
|--|
| Polímeros naturales <ul style="list-style-type: none"> • Polisacáridos: celulosa, dextranos, agarosa, quitosano, alginato, almidón, carragenano, pectina, algodón. • Proteínas: colágeno, albúmina, gelatina, zeína. |
| Polímeros sintéticos <ul style="list-style-type: none"> • Poliestireno, poliacrilato, polimetacrilato, poliacrilamida, poliamida, PDMS, vinilo. |
| Inorgánicos |
| Minerales naturales: <ul style="list-style-type: none"> • Bentonita, sílice, piedra pómez, tierra de diatomeas, grafeno. |
| Materiales sintéticos: <ul style="list-style-type: none"> • Vidrio, óxidos metálicos, cerámica, zeolitas. |

Distintos estudios han utilizado fibras o polímeros naturales como soportes para llevar a cabo la inmovilización de las enzimas. En este sentido, la agarosa ha sido propuesta en diversas publicaciones [134,135] debido a su alta porosidad, hidrofiliidad, facilidad de ser derivatizada y disponibilidad comercial [136]. No obstante, este soporte presenta el inconveniente de tener un precio elevado, por lo que aumenta el coste del análisis. Por ello, otras matrices de origen natural como el quitosano [137,138], la celulosa [139] o el algodón [140,141] se han propuesto para el desarrollo de biosensores. Además, recientemente, se ha inmovilizado la fosfatasa alcalina en un soporte de zeína (una proteína del maíz) con el fin de desarrollar un sensor biodegradable capaz de determinar fosfatos inorgánicos y compuestos organofosforados [142]. Por otro lado, Isgrove y col. propusieron el uso de fibras sintéticas como el nylon [143] para inmovilizar β -glucosidasa y tripsina. En esta línea, el PDMS también ha sido ampliamente utilizado para inmovilizar biomoléculas [144–147].

En referencia a los soportes inorgánicos, la sílice [148,149], las zeolitas [150,151] o el óxido de grafeno [152] han sido utilizados satisfactoriamente como soportes en distintos estudios.

Por otra parte, la unión de las enzimas al soporte puede llevarse a cabo mediante interacciones de diversa índole que pueden dividirse, principalmente, en métodos reversibles e irreversibles [153]. En el caso de la unión reversible, las enzimas pueden ser liberadas del soporte cuando se les somete a determinadas condiciones. La adsorción física y la unión por afinidad se enmarcan dentro de este tipo de técnica.

La **adsorción física** representa el método más simple de inmovilización. En este método, la enzima se une a la matriz mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals o interacciones hidrofóbicas. La inmovilización por adsorción es un método fácil de llevar a cabo, puesto que solamente implica la incubación del soporte en una disolución que contenga el enzima. Además, este método tiene la ventaja de ser económico debido a que no es necesario el uso de reactivos para funcionalizar la superficie del soporte. Sin embargo, este procedimiento tiene la desventaja que se pueden producir pérdidas de enzima, puesto que la interacción enzima-matriz es débil [136,154].

La **unión por afinidad** se basa en la creación de un enlace entre un soporte activado y un grupo específico. La selectividad de las interacciones que se producen es el mayor beneficio de este método. Sin embargo, el procedimiento requiere, frecuentemente, la formación de un enlace covalente de un ligando como un anticuerpo con el soporte [155,156].

Contrariamente a lo que ocurre con la inmovilización reversible, la unión irreversible entre la enzima y el soporte implica que, una vez la enzima se ha unido al soporte, ésta no puede liberarse sin que se produzca la destrucción del soporte o la pérdida de actividad de la enzima. En este grupo se encuentran la unión por enlace covalente, el atrapamiento y el entrecruzamiento.

La **unión covalente** implica la formación de un enlace entre la enzima y el soporte. Generalmente, este método de inmovilización es el que proporciona la interacción enzima-sustrato más fuerte, por lo que la pérdida de enzima es mínima. Sin embargo, cabe destacar que los grupos funcionales de la enzima involucrados en la actividad catalítica de la biomolécula no deben estar involucrados en el enlace con el soporte, puesto que esto conllevaría una pérdida de la actividad catalítica

[128,136]. En la bibliografía se han descrito diferentes reacciones para llevar a cabo el enlace entre la matriz y la enzima, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte. Sin embargo, en aquellos casos en los que el soporte no disponga de anclajes en los que llevar a cabo la formación del enlace, será necesaria una funcionalización previa [136].

El método del **atrapamiento** consiste en la retención de la enzima en las cavidades de una red polimérica tridimensional [157]. En este método, la enzima no está enlazada químicamente a la matriz, por lo que no hay modificación en la estructura de la biomolécula. Además, presenta una gran sencillez desde el punto de vista experimental, puesto que el proceso de inmovilización se lleva a cabo mediante la suspensión de la enzima en una disolución del monómero y, ya sea por un cambio de temperatura o por la adición de un reactivo químico, se produce la polimerización [158].

El **entrecruzamiento** es otro método irreversible de inmovilización en el cual las enzimas se unen a través de la formación de enlaces intermoleculares mediante el uso de un agente bifuncional como el glutaraldehído [154,159]. Este método ofrece las ventajas de la sencillez y un enlace fuerte entre las biomoléculas. Por el contrario, el mayor inconveniente que presenta este método es la posible pérdida de actividad debido a la distorsión que sufre el enzima, así como la alteración de su sitio activo durante el proceso de entrecruzamiento.

En la **Tabla 3** se recogen las principales características de los métodos de inmovilización de enzimas comentados en los párrafos anteriores.

Tabla 3. Características de los principales métodos de inmovilización de enzimas.

| Método | Ventajas | Inconvenientes | Esquema |
|---------------------------|--|--|---------|
| Enlace covalente | <ul style="list-style-type: none"> • Enlace enzima-soporte fuerte • Pérdidas de catalizador mínimas • Estabilización de la enzima | <ul style="list-style-type: none"> • Posibles modificaciones estéricas de la enzima • Posible disminución de la actividad enzimática • Se necesitan modificaciones químicas del soporte | |
| Entrecruzamiento | <ul style="list-style-type: none"> • No necesita soporte • Estabilización de la enzima • Pérdidas de catalizador mínimas | <ul style="list-style-type: none"> • Posibles modificaciones en la estructura de la enzima • Proceso experimental complicado | |
| Unión por afinidad | <ul style="list-style-type: none"> • Alta especificidad de la reacción | <ul style="list-style-type: none"> • Se requiere la presencia de grupos específicos en la enzima • Método económicamente costoso • Diseño complicado | |
| Atrapamiento | <ul style="list-style-type: none"> • La enzima sufre modificación química • Retención de la capacidad catalítica de la enzima | <ul style="list-style-type: none"> • Pérdidas de la enzima • Problemas de transferencia de masa | |
| Adsorción | <ul style="list-style-type: none"> • La enzima sufre modificación química • Método económico • Fácil y simple de llevar a cabo | <ul style="list-style-type: none"> • Pérdidas de enzima elevadas • Baja especificidad | |

1.3.2. Obtención de la señal analítica

La cuantificación de la respuesta analítica puede llevarse a cabo mediante distintas técnicas dependiendo del parámetro que se desee evaluar. La colorimetría, entendida como la medida del color de una disolución o de un soporte coloreado, es una técnica ampliamente utilizada en Química Analítica que proporciona información, tanto cualitativa como cuantitativa, sobre la concentración de un determinado componente. Sin embargo, aunque se trata de una técnica relativamente simple, un análisis cuantitativo requiere de equipos específicamente diseñados para cuantificar la señal analítica (e.g. espectrofotómetros UV-vis, equipos de reflectancia difusa) que pueden llegar a alcanzar cifras por el valor de varios miles de euros. Por lo tanto, debido al elevado coste de este tipo de instrumentos y a la necesidad de disponer de personal cualificado para realizar los análisis, en determinadas situaciones (países en desarrollo, zonas rurales...) su adquisición no es posible. Además, este equipamiento está pensado para ser utilizado en el laboratorio, por lo que no es adecuado para llevar a cabo análisis *in situ*.

No obstante, la actual evolución de la tecnología, especialmente la referente a los teléfonos móviles y tabletas, puede convertir a estos dispositivos en sustitutos de los instrumentos analíticos convencionales. Hoy en día, estos dispositivos cuentan con un sistema operativo, lo que los convierte en una especie de ordenadores portátiles. Además, están equipados con multitud de complementos (e.g. cámaras de alta resolución, conexión a internet, procesadores potentes y gran capacidad de almacenaje), además de ofrecer la posibilidad de disponer de una multitud de aplicaciones gratuitas a un precio relativamente bajo [87,160].

Una búsqueda realizada en la *Web of Science* mediante los filtros “*Smartphone sensor*” OR “*Smartphone reader*” OR “*Smartphone photometer*”, desvela el creciente interés que estos conceptos despiertan en la comunidad científica, puesto que el número de publicaciones sigue una tendencia alcista año tras año, tal y como se puede apreciar en la **Figura 9**. Además, puede observarse que los primeros trabajos datan de hace poco más de una década, puesto que la irrupción de estos equipos en el mercado es relativamente reciente. Por consiguiente, el uso

de dispositivos inteligentes como instrumentos de análisis es un campo de investigación con un enorme potencial de crecimiento.

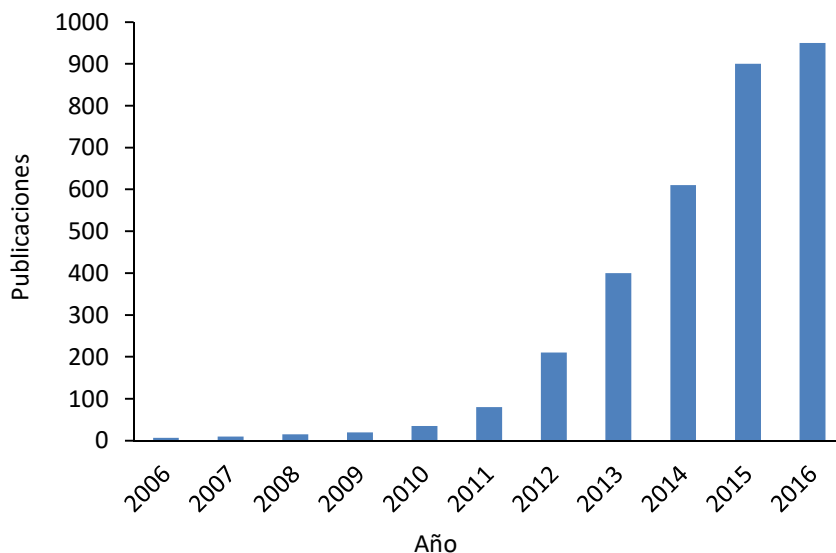


Figura 9. Evolución del número de publicaciones sobre teléfonos inteligentes usados con aplicaciones analíticas. Fuente: *Web of Science*.

Tanto los teléfonos inteligentes como las tabletas pueden equiparse con multitud de aplicaciones, dependiendo de las necesidades del usuario. Un ejemplo lo constituyen los editores de imagen que, aunque originalmente han sido diseñados para el retoque fotográfico, pueden actuar como “lectores de color”, abriendo la puerta al desarrollo de nuevas estrategias y oportunidades en el campo de la Química Analítica [161,162]. Así, programas informáticos como Adobe® Photoshop, GNU *Image Manipulation Program* (GIMP) o ImageJ, son capaces de traducir un determinado color en una combinación de diferentes parámetros numéricos, dependiendo del modelo de color que se esté utilizando.

Los modelos de color son herramientas matemáticas que definen una serie de parámetros a partir de los cuales se pueden obtener los diferentes colores del espectro visible. Dependiendo del método usado para representar los colores, se puede diferenciar entre distintos tipos de espacios [163].

En el modelo **RGB**, los colores se crean a partir de la combinación de sus tres colores primarios (rojo, verde y azul), cuyas intensidades pueden variar entre 0 y 255. El color negro se obtiene cuando el valor de los tres componentes es 0, mientras que el blanco se produce cuando los tres parámetros adquieren el valor de 255. Así, al RGB se le conoce como un modelo aditivo, debido a que el color blanco se crea por adición de color.




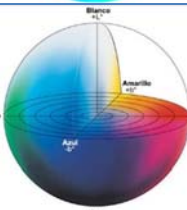
El modelo **CMYK** se utiliza en impresión de imágenes. En este modo, cada color está definido por un porcentaje de cian, magenta, amarillo y negro, dependiendo de la cantidad de tinta necesaria para fabricar el color. Al contrario de lo que ocurría en el modelo anterior (RGB), los colores claros tienen un porcentaje pequeño de tinta, mientras que en los más oscuros, los porcentajes son mayores. A este modelo de color se le conoce como sustractivo, puesto que la combinación de todos los colores “*sustrae luz*” (i.e., color negro).

El modelo **HSV** representa los colores combinando tres valores: el tono (H), la saturación (S) y el brillo (V). Así, este modelo aporta información tanto sobre el color en sí como sobre la cantidad y brillo del mismo. El valor de *H* está comprendido entre 0 y 360°, puesto que la gama cromática se representa en una rueda circular. *S* puede adquirir valores entre 0 y 100%, dependiendo de la cantidad de color. Finalmente, *V* puede tener valores de 0% (totalmente oscuro) a 100% (máxima luminosidad).

El modelo **CIE L*a*b*** está basado en el CIE 1931, creado por la *Comission Internationale de l'Éclairage* (CIE). Este modelo describe los colores mediante tres variables: la coordenada *L** representa la luminosidad (adquiriendo valores de 0 a 100), mientras que *a** y *b** representan el cambio de color de rojo a verde y de amarillo a azul, respectivamente (con valores comprendidos entre -120 y +120).

En la **Tabla 4** se resumen los parámetros de los modelos de color descritos anteriormente.

Tabla 4. Descripción de los parámetros de los principales modelos de color.

| Modelo de color | Parámetros | Valores | Esquema |
|-----------------|--|--|---|
| RGB | R (Rojo) G (Verde) B (Azul) | R (0-255) G (0-255) B (0-255) |  |
| CMYK | C (Cian) M (Magenta) Y (Amarillo) K (Negro) | C (0-100%) M (0-100%) Y (0-100%) K (0-100%) |  |
| HSV | H (Tono) S (Saturación) V (Brillo) | H (0-360°) S (0-100%) V (0-100%) |  |
| L*a*b* | L (Luminosidad) a* b* | L (0-100) a* (-120 - +120) b* (-120 - +120) |  |

Sin embargo, el uso de los modelos de color para llevar a cabo análisis colorimétricos implica que deban tenerse en cuenta una serie de consideraciones debido a que, en este tipo de determinaciones, la etapa de adquisición de imágenes desempeña un papel crítico, puesto que de ella dependen los resultados derivados de su posterior tratamiento.

Uno de los parámetros que más pueden influir en la calidad de la imagen obtenida es la iluminación. Chaplan y col. [164] realizaron un estudio en el que obtuvieron imágenes de un sensor colorimétrico mediante tres métodos distintos: (i) un escáner de superficie plana con iluminación LED, (ii) una cámara fotográfica en exterior (luz solar) y (iii) una cámara fotográfica en interior (luz fluorescente). El

posterior análisis de las imágenes mediante el modelo RGB reveló grandes diferencias entre los valores obtenidos.

Con el fin de solventar este inconveniente, algunos autores han propuesto el uso de una capucha oscura, dirigida a eliminar cualquier posible interferencia de luz externa que pueda influir en la adquisición de las imágenes [160,165–167]. En cambio, otras publicaciones han optado por insertar puntos de referencia (blancos y negros) dirigidos a corregir el valor de los colores obtenidos cuando se adquiere la fotografía en distintas condiciones de iluminación, evitando, de esta manera, el uso de la campana oscura [87,168]

Por otra parte, algunos trabajos proponen el uso del flash de la cámara como fuente de luz [169]. Sin embargo, en este caso es muy importante controlar los parámetros de la cámara para evitar variaciones que pueden afectar a la exactitud de las medidas [163]. En este sentido, Apyari y Dmitrienko [170], realizaron distintas experiencias en las que se modificaron parámetros como la intensidad del flash, el tiempo de exposición y la sensibilidad de la matriz del dispositivo de carga acoplada, concluyendo que los cambios en estas variables provocaban diferencias en la sensibilidad del sistema.

En la actualidad, diversos estudios hacen uso de placas de pocillos para llevar a cabo varios análisis de manera simultánea [171–175]. No obstante, la adquisición de imágenes de reactivos colorimétricos en disolución conlleva una serie de problemas, además de los comentados anteriormente. Por una parte, el menisco que se forma en el pocillo puede tener un efecto de lente que reduce la homogeneidad de la imagen y, por otra parte, una iluminación incorrecta puede provocar la aparición de reflejos [163]. Para solucionar este tipo de problemas, algunos autores han propuesto la obtención de imágenes mediante el uso de escáneres de superficie plana [161,176,177].

Finalmente, una vez obtenida la imagen digitalizada, la señal analítica se relaciona con la cantidad de analito. Para ello, tal y como se ha comentado anteriormente, existen aplicaciones o programas informáticos capaces de transformar los colores en variables numéricas [127,164,168,178]. Sin embargo, en otras ocasiones, se han

desarrollado aplicaciones diseñadas específicamente para realizar el análisis [169,171,179].

1.4. Muestras y sustancias estudiadas

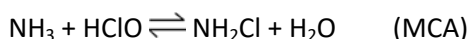
Las metodologías analíticas desarrolladas en el marco de esta Tesis han sido empleadas para la determinación de compuestos relacionados con campos tan diversos como la salud, la higiene industrial o el control de contaminación ambiental. Debido a esta variedad de analitos, a continuación se expondrán las principales características de cada uno de ellos, así como los motivos por los que resulta necesaria su determinación. Además, se incluye una revisión bibliográfica de los métodos de análisis más recientes para cada uno de ellos.

1.4.1. Monocloramina

La cloración es un proceso de desinfección ampliamente utilizado para el tratamiento de aguas debido a su bajo coste y su elevada eficacia a la hora de eliminar microorganismos patógenos [180–183]. No obstante, el cloro puede reaccionar con los compuestos nitrogenados presentes en el agua, generando subproductos de desinfección (DBPs, del inglés Disinfection by-Products) perjudiciales para la salud [181,184,185]. Entre la gran variedad de DPBs que se generan, se encuentran las cloraminas inorgánicas: compuestos nitrogenados con uno, dos o tres átomos de cloro enlazados al nitrógeno. Estas sustancias se forman mediante una reacción de sustitución en fase acuosa entre el cloro libre con un estado de oxidación de +1 y el amonio, mediante un proceso conocido como “cloraminación” [186].

La monocloramina (MCA) es un desinfectante débil y un oxidante estable, por lo que puede ser usado como un desinfectante secundario [186–188], mientras que la dicloramina (DCA) y la tricloramina (TCA) son considerados subproductos obtenidos después de un tratamiento con cloro [186–191].

En disolución acuosa, las cloraminas inorgánicas se forman de acuerdo a las reacciones [183,187,189,192]:



La proporción de cloraminas depende, principalmente, del pH y la relación entre el cloro y el nitrógeno [183,186,192,193]. El pH óptimo para la formación de la MCA se sitúa en el intervalo 7.5-9. La DCA presenta su máximo a un pH alrededor de 4.5, mientras que a valores de pH menores, la especie dominante es la TCA [186]. Por otra parte, al relación óptima Cl/N para la formación de MCA se sitúa entre 1.2:1-2:1, mientras que una relación entre 2:1-3:1 favorece la formación de DCA. La TCA se produce a relaciones mayores.

En la **Tabla 5** se han recopilado los distintos métodos utilizados para la determinación de cloraminas y cloro libre disponibles en la bibliografía.

Tabla 5: Métodos analíticos para la determinación de monocloramina.

| Analito | Método analítico | Reactivo | LD (mg Cl ₂ /L) | Intervalo lineal (mg Cl ₂ /L) | Ref. |
|----------------------------|--------------------------|--|-------------------------------|--|-------|
| Cloro total | Valoración indirecta | KI y Na ₂ S ₂ O ₃ | 0.04 | - | [194] |
| Cloro total | Valoración por retroceso | KI y Na ₂ S ₂ O ₃ | - | - | [194] |
| Cloro libre, MCA, DCA | Valoración amperométrica | KI | - | <2 | [194] |
| Cloro libre, MCA, DCA, TCA | Valoración | DePD y Fe ⁺² | 0.0 18 | - | [194] |
| Cloro libre, MCA, DCA, TCA | Colorimetría | DePD | 0. 010 | 0.05 - 4 | [194] |
| MCA | Colorimetría | Salicilato | --- | - | [183] |
| MCA, DCA, TCA | HPLC-ECD | - | 0.08-0.43 | - | [193] |
| MCA, DCA, TCA | HPLC-DAD | - | 0.33 | - | [195] |
| Cloro libre, MCA, DCA, TCA | HPLC-ECD | KI | - | - | [196] |
| TCA | HS-GC/MS | - | 0.01 | - | [197] |
| MCA | LC-ESI-MS/MS | - | 0.001 | 40·10-6-1·10-3 | [198] |
| Cloro libre, MCA, DCA, TCA | MIMS | - | 40·10-6 | - | [199] |
| MCA | Reacción de Berthelot | Timol y nitroprusiato | <1.5 | - | [83] |

Tal y como puede apreciarse en la **Tabla 5**, algunos métodos consisten en valoraciones de la disolución mediante Na₂S₂O₃ y KI, o N,N-dietil-p-fenilendiamina (DePD) y Fe⁺². Sin embargo, en algunas ocasiones, estos métodos solamente son capaces de determinar la cantidad de cloro total, sin diferenciar entre las especies de cloro combinado y cloro libre. Por contra, los métodos basados en el uso del reactivo DePD (colorimétrico y valoración) sí que permiten distinguir entre los

diferentes tipos de cloramina, aprovechando los distintos potenciales de oxidación que presentan estos compuestos. Finalmente, se ha propuesto el uso de sistemas de separación como HPLC capaces de distinguir entre las distintas especies de cloro combinado gracias a la diferencia de polaridad existente entre ellas.

1.4.2. Irgarol-1051 y diurón

El irgarol-1051 y el diurón son compuestos utilizados en la formulación de pinturas antiincrustantes dirigidas a prevenir el crecimiento de organismos en las superficies sumergidas en agua [200,201]. El primero es una triazina simétrica que actúa bloqueando una etapa en la cadena de transporte electrónico del fotosistema II [202–204], mientras que el segundo es un herbicida de la familia de las fenilureas que, al igual que el irgarol-1051, inhibe la fotosíntesis actuando sobre el fotosistema II [205].

Aunque el uso de estos productos está autorizado, el contacto prolongado con el agua puede producir la lixiviación de estos compuestos en el agua y su posterior entrada en la cadena trófica, con el consiguiente riesgo para la salud y el medio ambiente [206]. Además, estos biocidas son persistentes en el medio marino, estableciéndose el tiempo de vida media para el irgarol-1051 en un periodo comprendido entre 100 y 350 días [203,207,208], mientras que para el diurón este valor oscila entre 43 y 2180 días [209]. No obstante, a pesar de su elevada persistencia en el medio acuático, el irgarol-1051 puede degradarse a M1 (2-metiltio-4-tert-butilamino-s-triazina), mientras que el diurón puede dar lugar a la formación de 1-(3,4-diclorofenil)-3-metilurea (DCPMU), 1-(3,4-diclorofenil)urea (DCPU) y 3,4-dicloroanilina (DCAn). En la **Figura 10** se muestran las estructuras del irgarol-1051 y del diurón, así como la de sus principales productos de degradación.

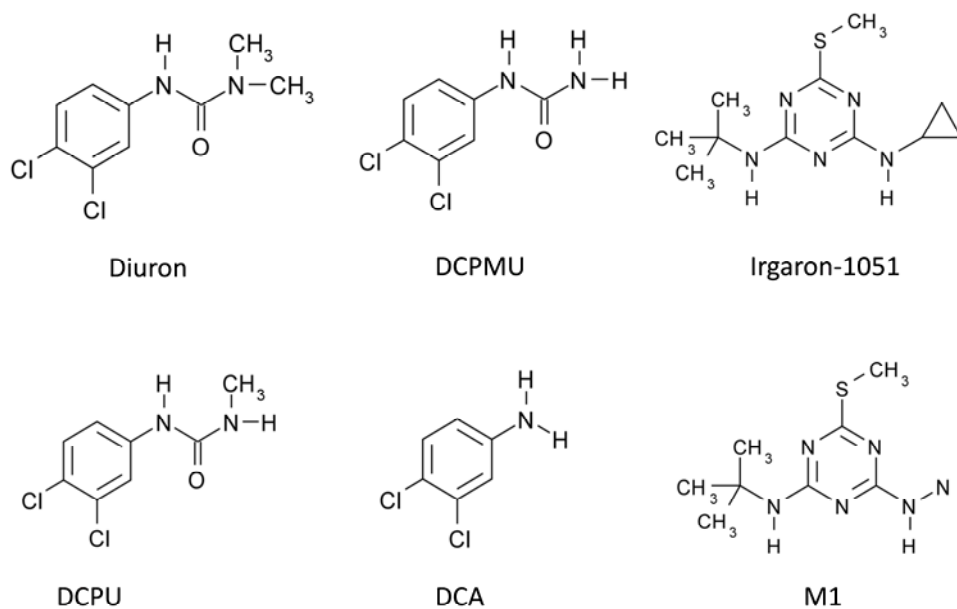


Figura 10. Estructura química del diurón, irgarol-1051 y sus principales productos de degradación.

En la bibliografía se han encontrado gran cantidad de estudios en los que se proponen distintos procedimientos para el análisis de biocidas. En la **Tabla 6** se recogen las características analíticas más relevantes de cada uno de ellos.

Tabla 6. Métodos analíticos para la determinación de biocidas.

| Analito | Extracción | Técnica | Matriz | %RSD | LD | Intervalo lineal | Ref. |
|---|--------------|----------------|----------------------------------|-------|-------------------|------------------|-------|
| Irgarol-1051 | BAµE | LD/LVI-GC-MS | Aguas superficiales | <12% | 16 ng/L | 0,2 - 16µg/L | [210] |
| Irgarol-1051, M1, Atrazina | LL | GC-MS | Aguas superficiales y sedimentos | - | - | 2,5 – 1000 pg/L | [208] |
| Irgarol-1051, diurón, TCMTB, clorotalonil | SPE en línea | LC-DAD | Aguas superficiales | - | 0.002 - 0.01 µg/L | 0.005 – 1 µg/L | [211] |
| M1 | SPE en línea | LC-APCI-MS | Aguas superficiales | - | 0.002 µg/L | - | [212] |
| Irgarol-1051, diurón, DCPMU, DCPU, DCA, M1 | SPE | LC-APCI-MS | Aguas superficiales | <14% | 5 – 26 ng/L | - | [202] |
| Irgarol-1051, diurón, folpet, diclofluaniida | SPE en línea | LC-DAD | Aguas superficiales | - | 0.005 - 0.2 µg/L | 0.01-5 µg/L | [200] |
| Irgarol-1051, diclofluaniida, TCMTB, SEA-NINETM 211 | SBSE | LC-APCI-MS | Aguas superficiales | <15% | 0.005-0.9 µg/L | 0.01-3 µg/L | [213] |
| Irgarol-1051, diurón, y otros biocidas | DLLME-SFO | TD-GC-MS | Aguas superficiales | <14% | 3.3-166.6 ng/L | 0.1-1000 µg/L | [214] |
| Irgarol-1051 diurón y otros biocidas | SPE en línea | LC-MS/MS | Aguas superficiales y residuales | <30% | 0.9 - 30 ng/L | - | [215] |
| Diurón, TCMTB, irgarol-1051, diclofluaniida | MAE-SPE | LC-ESI-MS/MS | Sedimentos | <7% | 0.1 - 0.3 ng/g | - | [216] |
| Diurón, TCMTB, irgarol-1051 y diclofluaniida | SPE en línea | LC-MS/MS | Aguas superficiales | <6.8% | 0.1 – 0.2 ng/L | 2.5 – 700 ng/L | [217] |
| Clorotalonila, diclofluaniida, SEA-NINETM 211, irgarol-1051 | SPME | LC-MS/MS | Sedimentos | <17% | 0.5 – 6 ng/g | 25-1000 ng/g | [218] |
| Diurón, irgarol-1051, DCPMU, DCPU, DCA, M1 | SPE | GC-MS | Sedimentos | <10% | 1.7 - 4 ng/g | - | [219] |
| Irgarol-1051 | LL | HPLC-DAD | Mejillones | <7% | 0.24-1.0 ng/g | - | [220] |
| Diurón, M1, SEA-NINETM 211 | LL | LC-MS/MS (MRM) | Sedimentos y mejillones | <4% | 10.3 pg/g | - | [221] |

Las técnicas propuestas en la bibliografía para la determinación de biocidas recogidas en la **Tabla 6**, en su mayoría utilizan la HPLC acoplada a detectores de DAD y MS/MS. Sin embargo, en la etapa relativa a la extracción de los analitos, se han descrito opciones como la BA μ E, LL, DLLME, SPE o SPME. En este caso, cabe destacar que mientras los análisis mediante BA μ E, LL, DLLME, SPME o DLLME están compuestos por distintas etapas, la SPE ha podido ser acoplada en línea al sistema cromatográfico, minimizando la manipulación de las muestras y el riesgo de contaminación. Por otra parte, en la gran mayoría de estudios, la determinación de los biocidas se ha llevado a cabo en muestras de aguas superficiales o residuales. No obstante, existen estudios en los que el análisis de estos compuestos se ha realizado en matrices como sedimentos o mejillones.

1.4.3. Sulfuro de hidrógeno

El sulfuro de hidrógeno es un gas tóxico, corrosivo, inflamable y miscible en agua, que posee un olor característico a huevos podridos [222]. La toxicidad de este compuesto se debe a que puede unirse al citocromo c oxidasa en la mitocondria, inhibiendo la respiración celular. Sin embargo, esta sustancia también ataca los nervios olfativos, los ojos y el cerebro [223]. Este gas puede ser producido de forma natural (a causa de la actividad volcánica o por determinados tipos de bacterias) o por actividades de carácter industrial (extracción de petróleo, industrias de gas natural, minas de carbón, producción de detergente o en la fabricación de papel) [77,78,224,225].

El sulfuro de hidrógeno es particularmente peligroso para los trabajadores de plantas extractivas de petróleo y refinerías, tratamiento de aguas residuales, vertederos, así como para los granjeros que trabajen cerca de pozos de estiércol [78]. Es importante resaltar que, puesto que es más pesado que el aire, puede acumularse en zonas poco ventiladas [223]. Como consecuencia de su toxicidad y de los riesgos relacionados con su exposición en determinados puestos de trabajo, la detección de este compuesto ha ganado importancia en el terreno analítico [226]. Además, aunque el límite de detección de esta sustancia para el olfato humano se sitúa en unos 10 $\mu\text{L}/\text{m}^3$ (dependiendo de la persona y el tiempo de

exposición), hay un valor máximo de sensibilidad de, aproximadamente, 100 mL/m³ por encima del cual, o a causa de una exposición prolongada, desaparece la percepción de este gas debido a unos efectos neurotóxicos que saturan los nervios olfativos [77,225,227]. En este sentido, la Directiva 2009/161/EU por la que se establece una lista de valores límite de exposición profesional indicativos, indica unos valores de referencia ponderado a una jornada de 8 horas o a un período de 15 minutos de 5 y 10 mL/m³, respectivamente, para el sulfuro de hidrógeno.

Debido a las razones comentadas en los párrafos anteriores, el desarrollo de dispositivos capaces de detectar el sulfuro de hidrógeno ha suscitado interés en la comunidad científica, por lo que diversos métodos basados en sensores han sido propuestos en la bibliografía para determinar este compuesto (**Tabla 7**).

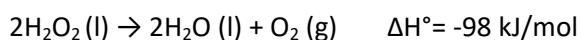
Tabla 7. Métodos analíticos para la determinación de sulfuro de hidrógeno.

| Tipo de sensor | SopORTE | Dispositivo de detección | Señal analítica | LD (mL/m ³) | Intervalo lineal (mL/m ³) | Ref. |
|----------------|------------------------|---|---------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------|
| Óptico | Celulosa | Bi(OH) ₃ | Colorimetría | 0.03 | - | [228] |
| Óptico | Celulosa | Bis(2-aminobenzoico)paladio(II) | Fluorescencia | 0.002 | 0.008-0.11 | [77] |
| Óptico | --- | Tubo detector de gases | Colorimetría | 0.019 | - | [229] |
| Óptico | PVC | TOAFMA | Fluorescencia | - | 0-25 | [78] |
| Óptico | --- | Tubo detector de gases | Colorimetría | 0.115 | - | [230] |
| Óptico | --- | Tintas de respuesta química | Colorimetría | - | 0.05-50 | [224] |
| Óptico | Nafion | Ag ⁺ para producir Ag ₂ S | Colorimetría | 212 | ≤ 2435 | [231] |
| Óptico | Disolución | AE-AuNPs | Colorimetría | 5 | 1778 - 5942 | [232] |
| Óptico | Disolución | AuNPs | Colorimetría | 0.08 | 0.1-1.5 | [222] |
| Óptico | Film polielectrolítico | Ag ⁺ para producir Ag ₂ S | Colorimetría | - | - | [233] |
| Óptico | Nylon | 1-(2-piridilazo)-2-naftol-Cu(II) | Colorimetría | 2.5 | ≤ 3531 | [234] |
| Eléctrico | Vidrio | CeO ₂ -SnO ₂ | Eléctrica | 5 | - | [235] |
| Eléctrico | Vidrio | Cu-SnO ₂ | Eléctrica | - | 20-1200 | [236] |
| Eléctrico | Vidrio | CuO-SnO ₂ | Eléctrica | - | 1-300 | [237] |
| Eléctrico | Silicona | CuO-SnO ₂ | Eléctrica | 0.5 | - | [238] |
| Eléctrico | Alúmina | Fe-SnO ₂ | Eléctrica | 10 | - | [239] |
| Óptico | Tubo de cuarzo | Fe ₂ O ₃ | Quimioluminiscencia | 3 | 8-2000 | [240] |

Muchos de los métodos propuestos en la **Tabla 7** para determinar sulfuro de hidrógeno son de tipo óptico (fluorescentes y colorimétricos). Como puede observarse, se han utilizado distintos reactivos orgánicos e inorgánicos capaces de producir una respuesta óptica en presencia de este compuesto. Por otra parte, los métodos eléctricos utilizan óxidos metálicos sensibles a la presencia de sulfuro de hidrógeno.

1.4.4. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno, comúnmente conocido como agua oxigenada, es una de las especies intermedias involucradas en más procesos medioambientales y biológicos, además de estar presente en varios procesos industriales y en medicina [241,242]. Biológicamente, el peróxido de hidrógeno es considerado un marcador de estrés oxidativo, parámetro asociado con diversas enfermedades, incluyendo cáncer, aterosclerosis, párkinson, alzhéimer o neurodegeneración [243]. Además, este compuesto se encuentra presente en muchos productos domésticos en bajas concentraciones, así como en productos farmacéuticos o en blanqueadores de cabello o ropa. Por otra parte, el peróxido de hidrógeno es muy inestable, descomponiéndose lentamente en oxígeno y agua mediante la siguiente reacción:



Dada su presencia en múltiples matrices y procesos, es necesario disponer de métodos analíticos rápidos capaces de llevar a cabo su análisis. En la **Tabla 8** se ha hecho una revisión de las propuestas más recientes para la determinación del peróxido de hidrógeno.

Tabla 8. Métodos analíticos para la determinación de peróxido de hidrógeno.

| Tipo de sensor | Catalizador/suporte | Reactivo | Señal analítica | LD (μM) | Intervalo lineal | Km (mM) | Ref. |
|----------------|--|----------|---------------------|----------------------|------------------------|--|-------|
| Eléctrico | MPS | Europio | Eléctrica | 0.5 | 1.0-1400 μM | --- | [244] |
| Óptico | HRP-quitosano | Luminol | Quimioluminiscencia | 0.04 | 0.1-10 μM | --- | [245] |
| Óptico | NPs-Fe ₃ O ₄ | DePD | Colorimetría | 0.25 | 10-200 μM | 0.627 (TMB) | [246] |
| Óptico | HRP-CNPs | TMB | Colorimetría | --- | 0.5-15 mM | 0.696 (H ₂ O ₂) | [247] |
| Óptico | CuS NPs | TMB | Colorimetría | --- | 0-1 mM | 0.682 (H ₂ O ₂) | [248] |
| Óptico | Microgel/AgNPs | --- | Colorimetría | --- | --- | 0.0072 (TMB) | [241] |
| Óptico | PtPdNDS/GNs | TMB | Colorimetría | 0.1 | 0.3-3 μM | 12 (H ₂ O ₂) | [249] |
| Óptico | HRP-Cu ₃ (PO ₄) ₂ ·3H ₂ O | TMB | Colorimetría | --- | 0.5-150 μM | --- | [250] |
| Óptico | CuInS ₂ | TMB | Colorimetría | 0.03 | --- | --- | [251] |
| Óptico | AgNPs | --- | Colorimetría | --- | 0.1-20 μM | --- | [252] |
| Óptico | CNPs | --- | Colorimetría | --- | 30 | --- | [243] |
| Óptico | UCNPs@PSIOAm + HRP | TMB | Luminiscencia | 0.045 | 10-400 μM | --- | [253] |
| Óptico | Fe ₃ O ₄ /GO | TMB | Colorimetría | 0.04 | 0.1-5 μM | --- | [254] |
| Óptico | HRP or PEG-HRP | TMB | Fluorescencia | 8/9.1 | 0.1-10 μM | --- | [242] |
| Óptico | HRP-sol gel-Gold NPs | Luminol | Quimioluminiscencia | --- | 30-300 μM | --- | [255] |

A la vista de las metodologías recogidas en la **Tabla 8**, los procedimientos descritos son, mayoritariamente, de tipo óptico. Muchos de ellos emplean la peroxidasa del rábano (HRP, del inglés *Horseradish Peroxidase*) para catalizar la oxidación del reactivo cromóforo por parte del peróxido de hidrógeno. Sin embargo, en algunos casos, se propone el uso de compuestos inorgánicos que sustituyen la función de las enzimas evitando, de esta manera, inconvenientes como la inestabilidad derivada de cambios de temperatura o humedad. Ambos métodos (enzimáticos y no enzimáticos) alcanzan LDs que se sitúan en el rango μM .

1.4.5. Glucosa

La glucosa es un carbohidrato presente en una gran cantidad de alimentos (frutas, verduras, cereales...) que constituye la mayor fuente de energía en el metabolismo celular [254,256]. No obstante, altos niveles de glucosa en sangre pueden aumentar el riesgo de padecer diabetes [256].

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por elevados niveles de glucosa en sangre, bien porque el páncreas no produce suficiente insulina (diabetes tipo 1) o debido a que el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce (diabetes tipo 2) [257,258]. Además, la diabetes puede desembocar en problemas oculares, renales y/o cardiovasculares [259]. Esta enfermedad supone un problema de alcance global, puesto que más de 380 millones de personas alrededor del mundo la sufren, llegando a ser declarada como epidemia global por la OMS [168,257,260]. Por otra parte, aunque no existe ninguna cura para esta enfermedad, un control estricto de los niveles de glucosa (varias veces al día), puede llegar a reducir la morbilidad y mortalidad de las personas afectadas [258].

El desarrollo de dispositivos capaces de cuantificar los niveles de glucosa en fluidos biológicos es un tema que genera un gran interés por parte de la comunidad científica, tal y como se deduce del elevado número de publicaciones al respecto. La **Tabla 9** recoge algunos de los métodos propuestos en la bibliografía para la determinación de la glucosa basados en sensores, así como los parámetros analíticos más relevantes.

Tabla 9. Métodos analíticos para la determinación de glucosa.

| Tipo de sensor | Catalizador | Reactivo | Señal analítica | LD | Intervalo lineal | Ref. |
|----------------|--|--|-----------------|----------|------------------|-------|
| Óptico | C ₆₀ [(COOH) ₂] ₂ /GOx | TMB | Colorimetría | 0.5 μM | 1.0-40 μM | [261] |
| Óptico | GOx | CdTe/CdS | Colorimetría | 0.2mM | 0-3.0 mM | [262] |
| Óptico | GOx | PtF20TPP | Colorimetría | --- | --- | [263] |
| Eléctrico | PVA/MnO ₂ @GO/CuO MIP | [Ru(NH ₃) ₅ (L ⁺) ²⁺] ^{β*} | Eléctrica | 0.053 mM | 0.5-4.4 mM | [264] |
| Eléctrico | GOx/SBA-15 | - | Eléctrica | - | 1.0-7.7 mM | [265] |
| Eléctrico | MWCNTs-COOH-P2AT-Au NPs | - | Eléctrica | 3.7μM | 0.1-30 mM | [266] |
| Eléctrico | Mn ₃ O ₄ NPs/N-GR/CPE | - | Eléctrica | 1.0 μM | 2.5-529.5 μM | [267] |
| Eléctrico | Cu ₂ O-CLAuNTs | - | Eléctrica | 1.83 μM | 0.1-5 mM | [268] |
| Eléctrico | NiO-MWCNT/CPE | - | Eléctrica | 11.04 nM | 1-200 μM | [269] |
| Eléctrico | GOx/Au | - | Eléctrica | 0.02 mM | 0.06-18.5 mM | [182] |
| Óptico | GOx | - | Colorimetría | --- | --- | [259] |
| Óptico | GOx | PVP-AuAg | Fluorescencia | 0.3 μM | 0-120 μM | [270] |
| Óptico | GOx | Naftalimida | Fluorescencia | 3 μM | 50-250 μM | [271] |
| Óptico | GOx | Tetrafeniletieno | Fluorescencia | 0.68 μM | 5-650 μM | [272] |
| Óptico | GOx | Si QDs | Fluorescencia | 11 μM | 80-420 μM | [273] |
| Óptico | GOx | HAQB | Fluorescencia | 0.7 μM | 2.0-140 μM | [274] |
| Óptico | GOx | Au nanoclusters | Fluorescencia | 0.32 μM | 0-5 μM | [275] |
| Óptico | GOx/H ₂ TCPP-CeO ₂ | HZTEHPPS | Colorimetría | 33 μM | 50-100 μM | [276] |
| Óptico | GOx/γ-Fe ₂ O ₃ NPs | TMB | Colorimetría | 0.21 μM | 1-80 μM | [277] |
| Óptico | GOx | TMB | Colorimetría | 0.5 mM | ≤ 100 mM | [278] |

Tal y como puede observarse, los métodos propuestos son, principalmente, eléctricos y ópticos. En ambos casos se han obtenido LDs similares. Además, una gran mayoría de los dispositivos propuestos utilizan la glucosa oxidasa (GOx) para llevar a cabo la detección de la glucosa, mientras que otros proponen el uso de compuestos inorgánicos que imitan la función de las enzimas, como es el caso de NPs de metales [266] u óxidos metálicos [264]. Por otra parte, los métodos ópticos requieren de un reactivo cromóforo o fluorescente que produzca la señal analítica, mientras que dichas sustancias pueden omitirse en el caso de utilizar un dispositivo eléctrico.

1.4.6. Meropenem

El meropenem, químicamente ácido (4R,5S,6S)-3-[(3S,5S)-5-(dimetilcarbamoil)pirrolidin-3-il]sulfanil-6-[(1R)-1-hidroxietil]-4-metil-7-oxo-1-azabicyclo[3,2,0]hept-2-eno-2-carboxílico (**Figura 11**), es un antibiótico tipo β -lactámico de gran espectro, eficaz contra bacterias anaerobias gram positivas y gram negativas [279]. Este tipo de antibióticos se usan frecuentemente como último recurso, cuando los pacientes con infecciones se encuentran gravemente enfermos o cuando se supone que albergan bacterias resistentes [280]. Los carbapenemas, como los antibióticos β -lactámicos, inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana por medio de la inhibición de las proteínas de unión a la penicilina [279,281,282]. La eficacia de estos antibióticos está influida por el tiempo, lo que implica que, para asegurar un efecto antibiótico, la concentración de compuesto libre debe mantenerse por encima de la concentración inhibitoria mínima (CIM) entre dos dosis consecutivas [283–286].

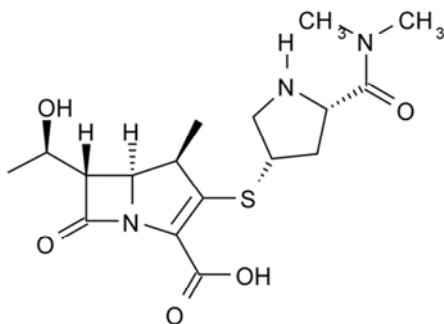


Figura 11. Estructura química del meropenem.

El meropenem ha mostrado una eficacia clínica en el tratamiento de un gran número de infecciones, como del tracto respiratorio, región intraabdominal, ginecológica, urinaria, meningitis o fibrosis quística [287,288].

Tradicionalmente, la determinación de antibióticos en fluidos biológicos se ha llevado a cabo mediante procedimientos microbiológicos [6]. Sin embargo, la revisión de la bibliografía realizada ha revelado la existencia de diferentes metodologías analíticas para la cuantificación de compuestos antimicrobianos en diversas matrices (**Tabla 10**).

Tabla 10. Métodos analíticos para la determinación de meropenem.

| Analito | Matriz | Método | LD ($\mu\text{g/L}$) | LQ (mg/L) | Intervalo lineal | Ref. | |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|---------------------------|-------|-----------------------|
| Meropenem | Dosis farmacéutica | HPLC-UV | 4.24 | 0.013 | 10-70 $\mu\text{g/L}$ | [289] | |
| | | UV-vis | 19.41 | 0.059 | 5-35 $\mu\text{g/L}$ | | |
| Meropenem | Dosis farmacéutica | Ensayo microbiológico | | | 1.5-6 mg/L | [279] | |
| Amikacina | | | 0.7 | | 2.5-50 $\mu\text{g/L}$ | | |
| Streptomycina | | | 7.5 | | 25-500 $\mu\text{g/L}$ | | |
| Kanamicina B | Agua | SCX- HPLC-CL | 10 | | 30-750 $\mu\text{g/L}$ | [290] | |
| Paromomicina | | | 1 | | 3.5-75 $\mu\text{g/L}$ | | |
| Neomicina B | | | 1.5 | | 5.0-100 $\mu\text{g/L}$ | | |
| Meropenem | Plasma | HPLC-UV | $0.1 \cdot 10^6$ | 0.05 | 0.05-100 mg/L | [291] | |
| Meropenem | Plasma | | $0.2 \cdot 10^6$ | | | | |
| | Fluido cerebroespinal | MEKC | $0.3 \cdot 10^6$ | | 0.5-50 mg/L | [292] | |
| Linezolida | Medio de crecimiento | HPLC-DAD | | 0.5 | | | |
| Meropenem | bacteriano | | | 2 | | [293] | |
| Vancomicina | | | | 0.5 | | | |
| Amoxicilina | | | | 1.05 | 1-100 mg/L | | |
| Cefuroxima | Plasma | | | 0.62 | 1-100 mg/L | | |
| Ceftazidima | Humano | UPLC-MS/MS | - | 0.81 | 0.5-80 mg/L | [294] | |
| Meropenem | Suero bovino | | | 0.52 | 0.5-80 mg/L | | |
| Piperacilina | | | | 1.09 | 1-150 mg/L | | |
| Meropenem | Medio bacteriano | LC-MS/MS | | | 50-25,000 $\mu\text{g/L}$ | [281] | |
| Ertapenem | | | $2.362 \cdot 10^6$ | 7.156 | 15-50 mg/L | | |
| Meropenem | Orina | LC-UV | $0.943 \cdot 10^6$ | 2.858 | 20-50 mg/L | [295] | |
| Doripenem | | | $1.137 \cdot 10^6$ | 3.445 | 20-50 mg/L | | |
| Meropenem + 10 β -lactams | Plasma humano | HPLC-UV | | 0.1 | 0.1-50 mg/L | [296] | |
| Doripenem | | | | 0.50 | | | |
| Ertapenem | Plasma humano | UPLC-UV | | 0.50 | | [297] | |
| Imipenem | | | | | 0.50 | | |
| Meropenem | | | | | 0.50 | | |
| Ampicilina | | | | | 0.3 | | 0.3-150 mg/L |
| Piperacilina | Plasma humano | LC-MS/MS | | 0.3 | 0.3-150 mg/L | [298] | |
| Tazobactam | | | | 0.15 | 0.15-75 mg/L | | |
| Meropenem | | | | 0.05 | 0.1-50 mg/L | | |
| Acyclovir | | | | 0.1 | 0.1-50 mg/L | | |
| Metronidazole | | | | 0.1 | 0.05-25 mg/L | | |
| Cefepim | Plasma humano | HPLC-UV | | 0.5 | 2.5-60 mg/L | [285] | |
| Ceftazidim | | | | | 0.5 | | 2.5-60 mg/L |
| Cefuroxim | | | | | 0.5 | | 2.5-60 mg/L |
| Meropenem | | | | | 0.5 | | 2.5-60 mg/L |
| Piperacillin | | | | | 0.5 | | 2.5-60 mg/L |
| Meropenem + 11 β -lactams | | | Plasma humano | HPLC-UV | | | 5 |
| Meropenem + 8 β -lactams | Suero humano | HPLC-MS/MS | 50 | 0.10 | 0.1-50 mg/L | [300] | |
| Meropenem | Fluido peritoneal Bilis | HPLC-UV | $10 \cdot 10^3$ | 0.05 | 0.05-100 mg/L | [301] | |
| Biapenem | | | $20 \cdot 10^3$ | 0.1 | 0.1-100 mg/L | | |

Como puede apreciarse, la inmensa mayoría de los métodos descritos en la bibliografía para la determinación de antibióticos están basados en el uso de HPLC, aunque también se han propuesto ensayos microbiológicos [279] o determinaciones espectrofotométricas [289]. Estas técnicas se han aplicado para la determinación de distintos antibióticos tanto en matrices biológicas (suero, plasma, orina, secreciones) como en preparados farmacéuticos, alcanzando LDs que oscilan entre los $\mu\text{g/L}$ y los mg/L . Aunque los LDs pueden resultar adecuados para la determinación de este compuesto, los procedimientos empleados requieren de tediosos tratamientos de muestra, especialmente en el caso de fluidos biológicos (e.g. SPE seguida de evaporación del disolvente [292]).

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

En las últimas décadas, la necesidad de simplificar las metodologías analíticas ha provocado una revisión de los conceptos fundamentales en los que se cimientan las técnicas de análisis convencionales. En este sentido, tras una revisión bibliográfica de los trabajos publicados en el campo de la Química Analítica, se han observado, en primer lugar, tendencias dirigidas a desarrollar técnicas que automaticen la etapa relativa al pretratamiento de la muestra, disminuyendo significativamente el tiempo de análisis y la manipulación de la muestra. En segundo lugar, existe un interés creciente por desarrollar dispositivos (químicos y bioquímicos) basados en el análisis de imágenes capaces de realizar determinaciones *in situ*, además de disminuir de manera significativa el coste global de la aplicación del procedimiento para llevar a cabo los análisis.

Estas tendencias van asociadas al surgimiento de la Química Analítica Verde ha puesto de manifiesto la necesidad de desarrollar metodologías respetuosas con el entorno, de manera que su impacto sobre éste sea mínimo.

Así, teniendo en cuenta las tendencias anteriores, el objetivo principal en el que se enmarca la presente Tesis consiste en **desarrollar metodologías de análisis sostenibles, que respeten los principios en los que se basa la Química Verde y se enmarquen en las tendencias actuales de la Química Analítica**. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Desarrollar metodologías analíticas basadas en el acoplamiento de la microextracción en fase sólida en tubo a sistemas de cromatografía líquida capilar que, además de cumplir las características de miniaturización y automatización, reducen considerablemente el consumo de disolventes, tiempo, coste energético, etc. Desde esta perspectiva, la preparación de estas metodologías implica:
 - a. Seleccionar las fases adsorbentes y estudiar las variables que influyen en el proceso de extracción y preconcentración (recubrimientos de los capilares, volumen de inyección, longitud del capilar, etc.)
 - b. Evaluar de la influencia de la matriz
 - c. Determinar las prestaciones analíticas del método con el objetivo de ajustarse a los requerimientos establecidos por la legislación
 - d. Validar el método en muestras reales

En este escenario, se establecieron como objetivos específicos el desarrollo de métodos basados en el acoplamiento de IT-SPME con CapLC para su aplicación en la determinación de compuestos de interés tanto social como económico en distintos tipos de matrices, como son:

- ✓ Cloraminas en aguas recreativas y de consumo
- ✓ Biocidas (irgarol-1051 y diurón) en aguas de marinas
- ✓ Meropenem en matrices biológicas (secreciones mucosas)

II. Elaborar dispositivos colorimétricos basados en la inmovilización de los reactivos en soportes sólidos dirigidos al análisis *in situ* para el control y monitorización de compuestos de interés en distintas matrices (medioambientales, industriales y clínicas). Tanto la fabricación como el empleo de los mismos se realizaron teniendo en cuenta los principios de sostenibilidad. El desarrollo de estos dispositivos implica:

- a. Seleccionar los materiales más adecuados para inmovilizar los reactivos, así como estudiar tanto las variables que influyen en la reacción colorimétrica como en la respuesta analítica y las posibilidades de adaptación de la misma a estrategias sostenibles
- b. Estudiar las prestaciones de las biomoléculas (enzimas) como reactivos empleados en dispositivos
- c. Evaluar las prestaciones del análisis mediante el tratamiento de imágenes

En base a este planteamiento, se han propuesto distintos dispositivos de análisis *in situ* para la determinación de los siguientes compuestos:

- ✓ Sulfuro de hidrógeno en aire i agua
- ✓ Peróxido de hidrógeno en productos comerciales
- ✓ Glucosa en muestras biológicas (suero sanguíneo)

Estos objetivos han podido llevarse a cabo gracias a los proyectos concedidos al grupo de investigación MINTOTA:

- Proyecto CTQ2011-26760 *“Nuevas estrategias de análisis en técnicas cromatográficas miniaturizadas que incorporan la microextracción en fase*

sólida en tubo con nuevos (nano)materiales”, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

- Proyecto ACOMP/2013/155 “Evaluación del efecto de los subproductos debidos a la desinfección (DBPs), presentes en las piscinas cloradas, sobre la salud de los bañistas”.
- Proyecto CTQ2014-53916P “*Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de técnicas de cromatografía líquida miniaturizada en línea: nanopartículas, contaminación secundaria*”, concedido por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) en el marco del Programa Estatal de Fomento de la Investigación Científica y Técnica de Excelencia (Subprograma Estatal de Generación de Conocimiento).
- Proyecto PROMETEO 2012/045 “*Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ*”, concedido por la Generalitat Valenciana a grupos de investigación de excelencia de la Comunidad Valenciana.
- Proyecto “*Bases de la aplicación de la directiva marco del agua a las aguas costeras de la Comunitat Valenciana, en relación a las sustancias prioritarias*”. CPI-13-426.
- Programa Gerónimo Forteza “*Ayudas para la contratación de personal de apoyo en organismos de investigación de la Comunidad Valenciana*”. CPI-14-173.
- Proyecto “*Estudio in vivo de la penetración de los antimicrobianos en la biopelícula bacteriana-BIOFILM*”. BIOMED 2014 (UV-La Fe).
- Proyecto PROMETEO 2016/109 “*Desarrollo de nuevas estrategias para el diseño de dispositivos de análisis in situ: nano y biomateriales*”, concedido por la Generalitat Valenciana a grupos de investigación de excelencia de la Comunidad Valenciana.

Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos realizados durante el transcurso de la Tesis han sido recogidos en las siguientes publicaciones:

- **J. Pla Tolós**, Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua, R. Herráez Hernández, J. Verdú Andrés, P. Campins Falcó, *Selective and sensitive method based on capillary liquid chromatography with in-tube solid phase microextraction*

for determination of monochloramine in water, J. Chromatogr. A. 1388 (2015) 17–23. doi:10.1016/j.chroma.2015.02.024.

- **J. Pla Tolós**, Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, *Colorimetric biosensing dispositive based on reagentless hybrid biocomposite: Application to hydrogen peroxide determination*, Sensors Actuators B Chem. 231 (2016) 837–846. doi:10.1016/j.snb.2016.03.094.
- **J. Pla Tolós**, Y. Moliner Martínez, J. Verdú Andrés, J. Casanova Chafer, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, *New optical paper sensor for in situ measurement of hydrogen sulphide in waters and atmospheres*, Talanta. 156–157 (2016) 79–86. doi:10.1016/j.talanta.2016.05.013.
- **J. Pla Tolós**, P. Serra Mora, L. Hakobyan, C. Molins Legua, Y. Moliner Martínez, P. Campins Falcó, *A sustainable on-line CapLC method for quantifying antifouling agents like irgarol-1051 and diurón in water samples: Estimation of the carbon footprint*, Sci. Total Environ. 569–570 (2016) 611–618. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.181.
- **J. Pla Tolós**, Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, *Smartphone-based photometer coupled to a colorimetric biosensor integrated in a multi-well microplate: Application to the multiple analysis of glucose in human serum samples* (enviado a Biosensors & Bioelectronics).
- **J. Pla Tolós**, L. Hakobyan, Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, *In-tube solid phase microextraction as preconcentration tool to determine antimicrobials in invasive medical devices: application to endotracheal tubes* (enviado a Journal of Chromatography).

Por otra parte, también se presentaron las siguientes comunicaciones congresos de ámbito nacional e internacional:

- C. Garrido Palanca, Y. Moliner Martínez, **J. Pla Tolós**, J. Verdú Andrés, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, *Estimation of Chloramines in Environmental Samples*. 3rd SCARCE International Conference: Bridging Toxicants, Stressors and Risk-Based Management Under Water Scarcity. Valencia (España), 2012.

- **J. Pla Tolós**, C. Molins Legua, J. Verdú Andrés, Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández, P. Campins Falcó, S. Llana, *Levels of Free and Combined Chlorine Found in Indoor Swimming Pools, Both in Bathing Water and Air*. 4th SCARCE International Conference: Towards a Better Understanding of the Links Between Stressors, Hazard Assessment and Ecosystem services Under Water Scarcity. Cádiz (España), 2013.
- M. Muñoz Ortuño, Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández, J. Verdú Andrés, **J. Pla Tolós**, P. Campins Falcó, *Miniaturized Procedure for Estimating DEHP in Sediments*. 39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. Ámsterdam (Holanda), 2013.
- **J. Pla Tolós**, P. Serra Mora, Y. Moliner Martínez, J. Verdú Andrés, R. Herráez Hernández, P. Campins Falcó, *Analysis of Polar Triazines and Degradation Products in Waters by In-Tube Solid-Phase Microextraction and Capillary Chromatography: An Environmentally Friendly Method*. 5th SCARCE International Conference: River Conservation Under Water Scarcity: Integration of Water Quantity and Quality in Iberian Rivers Under Global Change. Tarragona (España), 2014.
- **J. Pla Tolós**, C. Molins Legua, Y. Moliner Martínez, J. Verdú Andrés, R. Herráez Hernández, P. Campins Falcó, *In situ Determination of Chlorine in Air Using Polydimethylsyloxane-Attached-Diethyl-p-Phenylenediamine*. 16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies. Creta (Grecia), 2014.
- C. Molins Legua, Y. Moliner Martínez, N. Jornet Martínez, A.I. Argente García, **J. Pla Tolós**, P. Campins Falcó, *NQS Doped PDMS Composite as an Alternative Environmental Observation Technology: Application to Estimate NH₃ Emissions from Animal Production Industries*. XX Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica. Santiago de Compostela (España), 2015.
- C. Molins Legua, P. Campins Falcó, Y. Moliner Martínez, **J. Pla Tolós**, N. Jornet Martínez, L. Hakobyan, *Solid Biodevice for Sensing in Microplate Supports: Application to Glucose Determination*. 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on separation Sciences. Torun (Polonia), 2016.

- C. Molins Legua, P. Campins Falcó, Y. Moliner Martínez, J. Verdú Andrés, **J. Pla Tolós**, M. Muñoz Ortuño, *New Optical Paper Sensor for In situ Measurement of Hydrogen Sulphide in Waters and Atmospheres*. 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on separation Sciences. Torun (Polonia), 2016. Poster galardonado. 
- Y. Moliner Martínez, **J. Pla Tolós**, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, J. Ruiz Ramos, P. Ramirez Gallego, *In-Tube Solid Phase Microextraction as Sample Pretreatment Technique to Determine Antimicrobials in Invasive Medical Devices*. 18th International Symposium on Advances in Extraction Technologies & 22nd International Symposium on separation Sciences. Torun (Polonia), 2016.
- A. Argente García, N. Jornet Martínez, **J. Pla Tolós**, C. Molins Legua, P. Campins Falcó, *Sensitive colorimetric sensor based on silver nanoparticles for sulphur compounds detection in water*. NET-SCARCE International Conference. Rivers Under Water Scarcity: Threats and Challenges. Barcelona (España), 2016.
- Y. Moliner Martínez, A. Argente García, **J. Pla Tolós**, P. Serra Mora, L. Hakobyan, P. Campins Falcó, *Evaluation of in-tube solid phase microextraction coupled to capillary LC with mass spectrometry for the estimation of irgarol-1051 and its polar transformation products in water samples*. NET-SCARCE International Conference. Rivers Under Water Scarcity: Threats and Challenges. Barcelona (España), 2016.

CAPÍTULO III - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Con la entrada en vigor del “Reglamento (CE) 1272/2008 de 16 de diciembre de 2008, sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas”, se incorporaron a la legislación comunitaria los criterios del Sistema Globalmente Armonizado de las Naciones Unidas (SGA) con el fin de lograr una armonización a nivel internacional [302]. En la **Figura 12** aparecen representados los nuevos pictogramas de peligro introducidos por el Reglamento CLP conforme al SGA.










Figura 12. Pictogramas de peligro introducidos por el “Reglamento (CE) 1272/2008 de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas” conforme al SGA.

En la **Tabla 11** se enumeran los reactivos utilizados durante los distintos trabajos desarrollados en la parte experimental de la Tesis, junto con sus respectivos pictogramas de peligro:

Tabla 11. Listado de reactivos utilizados durante la Tesis y sus pictogramas de peligro (Los pictogramas GHR1 y GHR2 se han omitido debido a que ningún reactivo los incluía en su etiqueta).

| Reactivo |  |  |  |  |  |  |  |
|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| N,N-Dimetil-p-fenilendiamina | | | | ✓ | | | |
| Cloruro de Hierro (III) | | | ✓ | | ✓ | | |
| Ácido clorhídrico (37%) | | | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | |
| Sulfuro de Sodio | | | ✓ | ✓ | | | ✓ |
| Glicerol | | | | | | | |
| Irgarol-1051 | | | | | ✓ | | ✓ |
| Diurón | | | | | ✓ | ✓ | ✓ |
| Acetonitrilo | ✓ | | | | ✓ | | |
| Metanol | ✓ | | | ✓ | | ✓ | |
| Polidimetilsiloxano | | | | | | | |
| Dióxido de Silicio | | | | | | | |
| Tetraetil Ortosilicato | ✓ | | | | ✓ | | |
| 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina | | | | | ✓ | ✓ | |
| Peróxido de Hidrógeno (30%) | | ✓ | ✓ | | ✓ | | |
| Acetato de Sodio | | | | | | | |
| Ácido Acético Glacial | ✓ | | ✓ | | | | |
| Peroxidasa del Rábano | | | | | ✓ | ✓ | |
| Cloruro de Amonio | | | | | ✓ | | |
| Hipoclorito de Sodio | | | ✓ | | ✓ | | ✓ |
| Yoduro Potásico | | | | | | ✓ | |
| Ácido Ortofosfórico | | | ✓ | | | | |
| Permanganato Potásico | | ✓ | ✓ | | ✓ | ✓ | ✓ |
| Nitroprusiato de sodio | | | | ✓ | | | |
| Hidrogenocarbonato de Sodio | | | | | | | |
| Ácido Sulfúrico | | | ✓ | | | | |
| Tímol | | | ✓ | | ✓ | | ✓ |

Tabla 11: Listado de reactivos utilizados durante la Tesis y sus pictogramas de peligro (Continuación).

| Reactivo |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| Hidróxido de sodio | | | ✓ | | ✓ | | |
| Glucosa oxidasa | | | | | | | ✓ |
| N,N-Dietil-p-fenilendiamina | | | ✓ | ✓ | | | |
| Hidrogenofosfato de Potasio | | | | | ✓ | | |
| Glucosa | | | | | | | |
| Meropenem | | | | | ✓ | | |
| Ácido bórico | | | | | | | ✓ |

3.2. Instrumentación

A lo largo de los trabajos llevados a cabo en el marco de la Tesis, se han utilizado distintos equipos dependiendo de las necesidades de cada caso. Dichos equipos pueden dividirse, en función de su fundamento, en: (I) técnicas cromatográficas y (II) técnicas espectrofotométricas. A continuación se ofrece una descripción de cada uno de ellos.

3.2.1. Técnicas cromatográficas

Para el análisis cromatográfico capilar se utilizaron dos sistemas diferentes, el primero de los cuales consistió en una válvula de inyección de seis puertos Rheodyne 7725, una bomba capilar isocrática (Jasco Corporation, Japón) y un detector UV-Vis de fila de diodos (Agilent 1200 series, Alemania) equipado con una celda de flujo de 80 nL. Las señales se registraron entre 190 y 400 nm. Este sistema fue utilizado para la determinación de cloraminas en muestras de agua.

Por otra parte, en el segundo caso, se utilizó, al igual que en el caso anterior, una válvula de seis puertos Rheodyne 7725 y un detector UV-Vis de fila de diodos (Agilent 1200 Series, Alemania) equipado con una celda de flujo de 80 nL. Sin embargo, en esta ocasión, se empleó una bomba capilar binaria (Agilent 1100 Series, Alemania). Las señales analíticas se registraron entre 190 y 400 nm. Tanto

el meropenem como el irgarol-1051 y el diurón fueron analizados mediante este montaje.

Finalmente, el tratamiento y adquisición de datos se realizó, en ambos casos, a través del programa informático Agilent HPLC Chemstation.

3.2.2. Técnicas espectrofotométricas

El análisis colorimétrico mediante espectroscopia UV-vis se realizó mediante un espectrofotómetro UV-Vis HP-8453 (Hewlett Packard, USA) equipado con una celda de 1 cm de camino óptico. Los espectros de absorción se registraron entre 190 y 900 nm. Además, también se empleó un espectrofotómetro Cary 630 (Agilent Technologies, USA) equipado con un accesorio de fibra óptica. En este caso, los espectros se registraron entre 190 y 1100 nm, utilizándose el software CaryWinUV para el análisis de los datos.

Por otra parte, para las medidas de reflectancia difusa se utilizó un espectrofotómetro Cary 630 (Agilent Technologies, USA) equipado con un accesorio de reflectancia difusa Harrick Scientific Products (Pleasantville, NY), dotado de una cámara de video y una fuente de luz. Los espectros se registraron entre 200 y 800 nm. La visualización de video en tiempo real se consiguió utilizando el software GrabBee, mientras que la adquisición tratamiento de datos se realizó a través del programa informático CaryWinUV.

Finalmente, el análisis mediante el modelo de color RGB y CMYK se llevó a cabo mediante los editores de imágenes ImageJ y GIMP. Estos programas informáticos se encuentran disponibles de manera gratuita en internet y pueden ser instalados en distintos sistemas operativos (Windows, Linux y Mac OS X). Para obtener las imágenes digitales se empleó una impresora multifuncional RICOH Aficio (RICOH, Japón) en modo escáner o un teléfono inteligente LG Optimus L5 (LG, Corea del Sur).

3.3. Procedimiento experimental

En los siguientes apartados se describen las condiciones utilizadas para llevar a cabo los métodos de análisis propuestos en los distintos trabajos realizados.

3.3.1. Preparación de las disoluciones patrón

Las disoluciones patrón se prepararon por disolución o dilución de los reactivos comerciales con agua ultrapura, obtenida mediante el sistema Nanopure II (Barnstead, Estados Unidos). Sin embargo, en el caso de las cloraminas, debido a la ausencia de patrones comerciales, se prepararon diariamente utilizando las condiciones descritas a continuación:

Las monocloramina se obtuvo mezclando hipoclorito de sodio con cloruro de amonio en una relación N/Cl 1.25:1. El pH de la mezcla se ajustó a 8 con tampón fosfato 1 M. Después, las disoluciones se guardaron en viales cubiertos de aluminio para protegerlos de la luz solar.

La síntesis de tricloramina se realizó mezclando hipoclorito de sodio y cloruro de amonio en una relación Cl/N de 3:1 a un pH de 3.5. Posteriormente, las disoluciones se guardaron en viales cubiertos de aluminio llenados por completo para evitar la acumulación de la TCA en el espacio de cabeza.

3.3.2. IT-SPME acoplada a CapLC

La técnica de IT-SPME se ha utilizado para la determinación de diferentes tipos de compuestos. Tal y como se ha explicado en la introducción, uno de los puntos fuertes que ofrece esta técnica reside en su versatilidad, dado que puede acoplarse a diferentes tipos de sistemas y mediante distintas modalidades. En este caso, los trabajos se realizaron utilizando la modalidad de IT-SPME en válvula debido a los buenos resultados que ofrece, con una modificación del sistema mínimo. Así, el bucle de inyección convencional de la válvula de inyección se sustituyó por una columna capilar de GC capaz de extraer y preconcentrar los

analitos en su interior. Las conexiones con la válvula se llevaron a cabo mediante el uso de manguitos (2.5 cm x 1/16) de polietil éter cetona (PEEK) colocados en el extremo de la columna capilar. Finalmente, las conexiones se completaron mediante férrulas y conteras.

La inyección de las muestras y los patrones en el sistema cromatográfico se llevó a cabo de manera manual, utilizando una jeringa de precisión de 1 mL, con la válvula en posición de carga. Posteriormente, mediante un cambio de posición de la válvula, los analitos fueron desorbidos y transferidos a la columna analítica mediante la fase móvil, produciéndose su separación y detección (**Figura 13**).

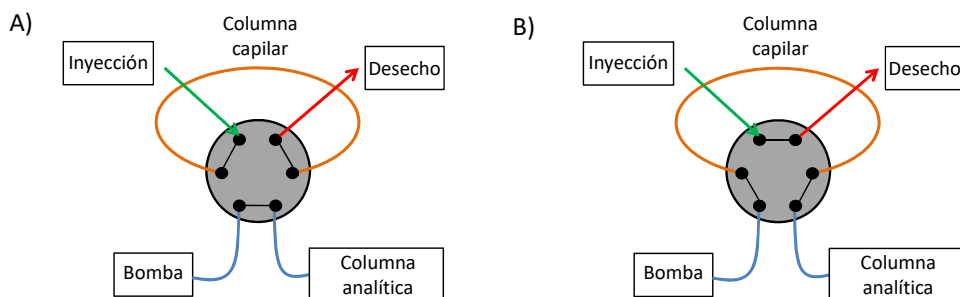


Figura 13. Esquema de IT-SPME en válvula acoplado a un sistema de cromatografía líquida capilar. A) Posición de "carga", B) Posición de "inyección".

En la **Tabla 12** aparecen detalladas las condiciones experimentales empleadas para la determinación de los diferentes analitos mediante cromatografía.

Tabla 12. Condiciones experimentales utilizadas en los análisis de compuestos mediante IT-SPME-Cap-DAD.

| Analito | Método | Columna capilar | Columna analítica | Volumen inyección (µL) | Fase móvil | Elución | Flujo (µL/min) | λ (nm) |
|---------------|------------|-----------------|---|------------------------|-------------------------------------|---|----------------|--------|
| Monocloramina | Cap-LC-DAD | TRB-5 | Zorbax SB C ₁₈ (150mm x0.5 mm, i.d. 5 µm) | 100 | CH ₃ OH:Tampón pH 7 | Isocrática | 3 | 240 |
| Irgarol-1051 | Cap-LC-DAD | TRB-35 | Zorbax SB C ₁₈ (150mm x0.5 mm, i.d. 5 µm) | 4000 | CH ₃ CN:H ₂ O | Isocrática | 20 | 226 |
| Diuron | Cap-LC-DAD | TRB-35 | Zorbax SB C ₁₈ (150mm x0.5 mm, i.d. 5 µm) | 4000 | CH ₃ CN:H ₂ O | Isocrática | 20 | 254 |
| Meroperem | Cap-LC-DAD | TRB-35 | Zorbax SB C ₁₈ (150mm x0.5 mm, i.d. 5 µm) | 500 | CH ₃ CN:H ₂ O | Gradiente: 10% ACN 10 min 15% ACN 2 min 10% ACN 1min | 8 | 300 |

3.3.3. Dispositivos de análisis *in situ*

Los métodos de análisis *in situ* son aquellos en los que el análisis se realiza en el lugar donde se encuentra la muestra, sin necesidad de ser transportada al laboratorio. De los distintos tipos de dispositivos existentes que reúnen estas características, en los trabajos llevados a cabo en esta Tesis se optó por el desarrollo de sensores colorimétricos, puesto que, además de su sencillez, la respuesta analítica es fácilmente interpretable, incluso a simple vista.

En los siguientes apartados se explica detalladamente el procedimiento de fabricación de cada uno de los tipos de dispositivos desarrollados, así como las condiciones experimentales necesarias para que se produzca la aparición de la señal analítica.

3.3.3.1. Preparación de sensores

Durante el transcurso de esta Tesis, se han desarrollado distintos tipos de dispositivos capaces de determinar diferentes compuestos *in situ*. A continuación se detallan los protocolos seguidos para preparar cada uno de los sensores.

Sensor para la determinación de H₂S

Sensores de celulosa-glicerol-DmPD-Fe(III): En primer lugar, se prepararon unas disoluciones de 0.25 M de FeCl₃ y 0.28 M de N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DmPD) en las que se utilizó HCl 6 M como disolvente. A continuación, los dos reactivos, junto con glicerol, se mezclaron en una relación de 1:1:0.1. Seguidamente, un papel de filtro Whatman® 41, con un diámetro de 1.3 cm, se impregnó con 50 µL de la mezcla anterior y, finalmente, se secó al vacío durante 15 minutos.

Sensores para la determinación de H₂O₂

Sensores de PDMS-TMB-TEOS-SiO₂NPs: Estos sensores se obtuvieron mezclando 8 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 5 mg de óxido de silicio y 2 g de TEOS en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Después, se añadieron 2 g de PDMS y la mezcla se agitó durante 15 minutos más. A continuación, se introdujo el agente de curado en una relación 1:10 con el PDMS y se mantuvo la agitación durante otros 15 minutos. Finalmente, se pesaron 0.2 g de la mezcla en cada uno de los pocillos de una placa de poliestireno (d=1 cm) y se guardó durante 12 h en estufa a una temperatura de 30 °C.

Soportes PDMS-TEOS-TMB-HRP-SiO₂-NPs: En este caso, se fabricaron dispositivos siguiendo dos modalidades distintas, diferenciándose, básicamente, en la forma de inmovilización de la enzima.

HRP atrapado → Primeramente, se mezclaron 8 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 5 mg de óxido de silicio, 20 µL de una dispersión de HRP en TEOS (1 mg/mL) y 2 g de TEOS en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 2 g de PDMS, manteniendo una agitación vigorosa durante 15 minutos. Seguidamente, se introdujeron 0.2 g de agente de curado y se agitó la mezcla durante otros 15 minutos. Para terminar, se introdujeron 0.2 g de la mezcla en cada pocillo de una placa de poliestireno (d=1 cm) y se guardó en estufa a una temperatura de 30 °C durante 12 horas.

HRP adsorbido → Para la preparación de estos dispositivos, se mezclaron 8 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 5 mg de óxido de silicio y 2 g de TEOS, en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Después, se añadieron 2 g de PDMS, agitando la mezcla durante 15 minutos. A continuación, se introdujeron 0.2 g de agente de curado y se mantuvo la agitación durante 15 minutos más. Seguidamente, se pesaron 0.2 g de la mezcla en cada pocillo de una placa poliestireno (d=1 cm) y se guardó en estufa a una temperatura de 30 °C durante 12 horas. Posteriormente, cada film fue depositado encima de 200 µL de una disolución 0.03 mg/mL de HRP en tampón carbonato (pH 0.05M), dejándolo reaccionar durante 1 hora (cada cara) a temperatura ambiente. Finalmente, los films se lavaron con tampón fosfato a pH 7.

Sensores para la determinación de glucosa

Sensores PDMS-TEOS-TMB-HRP-GOx-SiO₂-NPs: Estos dispositivos se fabricaron siguiendo dos procedimientos diferentes, en los que se modificó tanto el formato como el método de inmovilización de los reactivos.

Análisis individual → 8 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 5 mg de óxido de silicio, 1 mg de GOx, 50 µL de una dispersión de HRP en TEOS (1 mg/mL) y 2 g de TEOS se mezclaron en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Seguidamente, se introdujeron 2 g de PDMS y la mezcla se agitó de manera vigorosa durante 15 minutos. A continuación, se añadió el agente de curado en una relación 1:10 con el PDMS, manteniendo la agitación durante otros 15 minutos. Posteriormente, se pesaron 0.2 g de la mezcla en cada uno de los pocillos de una placa poliestireno (d=1 cm) y se guardó en estufa a una temperatura de 30 °C durante 12 horas.

Análisis múltiple → En primer lugar, se mezclaron 4 mg de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, 2.5 mg de óxido de silicio y 1 g de TEOS en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Después, se añadió 1 g de PDMS, agitando la mezcla durante 15 minutos. Seguidamente, se introdujeron 0.1 g de agente de curado, siguiendo la agitación durante 15 minutos más. A

continuación, se pusieron 25 μL de la mezcla resultante en cada uno de los 96 pocillos de la placa y, al finalizar, ésta se guardó en estufa a una temperatura de 30 °C durante 12 horas. Posteriormente, se introdujeron 20 μL de una disolución de HRP (1 $\mu\text{L}/\text{mL}$) y 20 μL de otra disolución de GOx (0.1 mg/mL) en cada pocillo y se dejaron secar a vacío.

3.3.3.2. Procedimientos y condiciones experimentales

Obtención de la respuesta del sensor de H_2S

Sensores de celulosa-glicerol-DmPD-Fe(III): La determinación de sulfuro se realizó tanto en agua como aire. En el primer caso, el sensor se sumergió en 1 mL de una disolución de sulfuro de sodio, dejándose reaccionar durante 30 segundos. Finalmente, el dispositivo se lavó con 5 mL de agua para eliminar el exceso de reactivo.

Para el análisis de sulfuro de hidrógeno en aire, fue necesario generar patrones gaseosos de esta sustancia. El sulfuro de hidrógeno es un ácido débil, con unos valores de pKa para la primera y segunda protonación de 6.88 y 14.15, respectivamente [226]. A un pH de 5 o menor, puede considerarse que la totalidad del sulfuro se encuentra en la forma de H_2S [223]. Por lo tanto, la generación de las atmósferas de esta sustancia se consiguió acidificando disoluciones de sulfuro de sodio (100 μL) con HCl 6 M (100 μL) en el interior de botellas de dilución estática (2 L) (Supelco, Estados Unidos).

Una vez obtenida la atmósfera de H_2S , se realizaron mediciones siguiendo dos procedimientos distintos: *muestreo activo* y *muestreo pasivo*.

Análisis de aire mediante muestreo pasivo → El sensor se suspendió con un hilo en el interior de una botella de dilución estática (2 L), en la que se generó una atmósfera de sulfuro de hidrógeno (**Figura 14**) y se dejó reaccionar durante 30 minutos. Después, el sensor se lavó con 5 mL de agua para eliminar el exceso de reactivo.

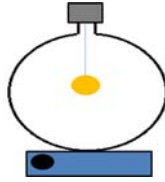


Figura 14: Montaje utilizado para el muestreo pasivo de patrones gaseosos.

Análisis de aire mediante muestreo activo → En este caso, se conectaron en serie tres botellas de dilución estática, en las cuales se generó la misma concentración de sulfuro de hidrógeno. Dentro de cada botella se introdujo un agitador magnético para remover la mezcla. Seguidamente, el portafiltras, con el sensor en su interior, se conectó con la tercera botella. Al mismo tiempo, el portafiltras se conectó con un borboteador que contenía una disolución de DmPD (0.28 M) y FeCl_3 disueltos en HCl 6M para comprobar si la retención del sulfuro de hidrógeno en el sensor era cuantitativa. Finalmente, el borboteador se conectó con una bomba de muestreo personal APEX (Casella, España). Además, se conectó un calibrador de flujo al principio del montaje para controlar el flujo de aire, que se ajustó a 100 mL/min (**Figura 15**). Después de 30 minutos de muestreo, el sensor se lavó con 5 mL de agua para eliminar el exceso de reactivo.

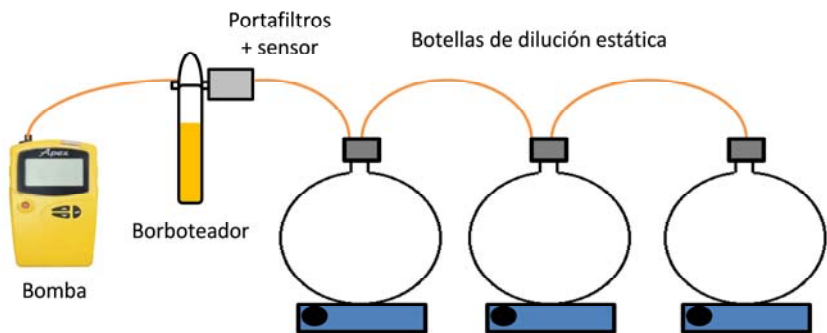


Figura 15: Montaje utilizado para el muestreo activo de patrones gaseosos.

Una vez finalizada la reacción colorimétrica, se procedió a cuantificar la intensidad de la señal analítica. Para ello se hizo uso de dos métodos diferentes: *reflectancia difusa* y *espacio de color*.

Reflectancia difusa → El espectro de absorción del azul de metileno tiene un máximo de absorción a 670 nm, por lo que se escogió esta longitud de onda para llevar a cabo los análisis mediante reflectancia difusa.

Modelo de color → Por otra parte, se obtuvo una imagen digital de los sensores usando una impresora multifuncional y, seguidamente, se analizaron con el editor de imágenes gratuito GIMP, utilizando la herramienta de cuentagotas. De este modo, las imágenes digitalizadas se tradujeron en variables numéricas de color mediante el modelo de color CMYK, escogiéndose el valor de la coordenada cian para la cuantificación del sulfuro de hidrógeno debido a que ofrecía los mejores resultados.

Obtención de la respuesta del biosensor de H₂O₂

Sensores PDMS-TEOS-TMB-HRP-SiO₂-NPs: Un sensor, con el enzima HRP (adsorbido o atrapado) y el TMB inmovilizado en la matriz, fue depositado en un vial junto con 1 mL de tampón NaAc/HAc (0.1 M pH 5). A continuación, se añadió el peróxido de hidrógeno, iniciando la reacción de oxidación del TMB. La mezcla se dejó reaccionar durante 15 minutos y se midió la absorbancia a la longitud de onda de 653 nm. Posteriormente, la reacción se detuvo añadiendo 30 µL de una disolución 2M de ácido sulfúrico. En este caso, la absorbancia se registró a 450 nm.

Obtención de la respuesta del biosensor de glucosa

Sensores PDMS-TEOS-TMB-HRP-GOx-SiO₂-NPs: La determinación de glucosa se realizó mediante dos procedimientos diferentes, tal y como se describe a continuación.

Análisis individual → Un sensor (con la GOx, HRP y TMB atrapados en la matriz) se dispuso en un vial al que se añadió 1 mL de tampón NaAc/HAc (0.1 M pH 5) y 100 μ L de glucosa. La mezcla se dejó reaccionar durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 653 nm.

Análisis múltiple → En cada pocillo se introdujeron 100 μ L de disolución tampón NaAc/HAc (0.1 M pH 5) junto con 10 μ L de glucosa para iniciar la reacción. La mezcla se dejó reaccionar durante 15 minutos y se acidificó con 10 μ L de HCl (6 M). A continuación, la placa de pocillos se situó en la parte superior de una capucha oscura, usando un iPad mini para proporcionar luz de fondo a través de la aplicación gratuita MyLight. Posteriormente, el teléfono se colocó en la base de la campana para obtener las imágenes. La capucha disponía de una abertura en su parte superior (12.5 cm x 8.5 cm) alineada con la cámara del teléfono móvil (**Figura 16**).

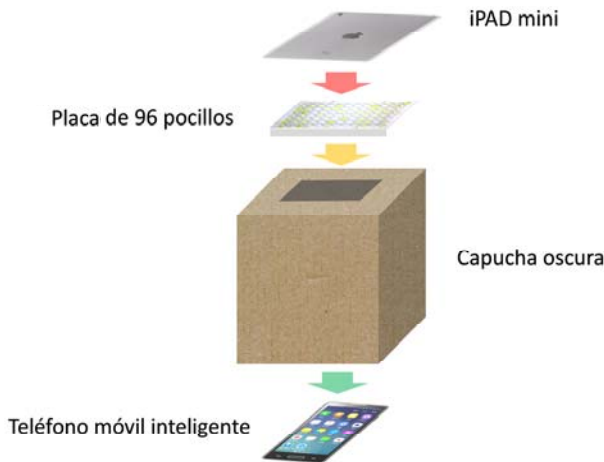


Figura 16. Representación esquemática del montaje utilizado para obtener las imágenes de la placa de 96 pocillos.

La evaluación de la intensidad del color de la fotografía se realizó mediante el programa informático de tratamiento de imágenes ImageJ. Para ello, se descargó e instaló el complemento *Readplate* (disponible de manera gratuita en la página web del programa) para convertir las imágenes obtenidas mediante el teléfono

móvil en valores numéricos de RGB. Para la cuantificación del color amarillo de la disolución, se seleccionó la variación del valor correspondiente al canal azul, puesto que ofrecía los mejores resultados. Una vez la imagen estuvo correctamente ajustada a la cuadrícula proporcionada por el programa, se llevaron a cabo las medidas. Finalmente, la intensidad del color se convirtió en un valor de absorbancia mediante la expresión $A = -\log B/255$, donde B es el valor de la coordenada azul y 255 representa el valor máximo de luz transmitida.

Las imágenes se obtuvieron a una distancia de 20 cm, desde la cámara del teléfono a la base de la placa.

3.4. Muestras analizadas

En los diferentes trabajos que componen esta Tesis se han analizado distintas muestras reales con el objetivo de resolver problemas analíticos reales mediante el uso de nuevas metodologías. Así, en cada uno de los estudios realizados, se determinaron compuestos implicados en problemas reales, por lo que se seleccionaron aquellas muestras reales en las que se sospechaba (o sabía) que el analito podía estar presente.

3.4.1. Muestras medioambientales

La determinación de contaminantes ambientales permite establecer si las matrices en las que se encuentran (aire, agua, sedimentos...) pueden resultar dañinas tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Por lo tanto, se seleccionaron las siguientes muestras ambientales con el fin de comprobar si cumplían con los valores límite establecidos en relación a las sustancias analizadas.

La determinación de monoclaramina se realizó en aguas de diferentes piscinas de la Comunidad Valenciana, así como en el agua de la red de abastecimiento. En ambos casos, las muestras de aguas se recogieron con botellas de vidrio topacio (250 mL), previamente lavadas, y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Con el fin de cuantificar los biocidas irgarol-1051 y diurón en aguas superficiales, se llevó a cabo un muestreo mensual durante el periodo comprendido entre marzo y junio de 2014 en los siguientes puertos de Valencia: Puerto de Valencia (Valencia, 39° 39.6' N; 18.1' O), Port Saplaya (Alboraya, 39° 30' 0.5'' N; 0° 16' 0.5'' O) y Siles (Canet d'En Berenguer, 39° 40' 0.8'' N; 0° 11' 54'' O). Las muestras de aguas se recogieron a 1 m de profundidad con botellas de vidrio topacio (250 mL), previamente lavadas, y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

La determinación de sulfuro de hidrógeno se realizó en una Estación Depuradora de Aguas Residuales (EDAR) localizada en la Comunidad Valenciana. Aquí, la determinación se llevó a cabo en dos matrices diferentes: agua y aire. Con el fin de cuantificar la concentración en las aguas residuales, se seleccionaron tres zonas diferentes de la planta (entrada, decantación y salida) y se recogieron muestras con botellas de vidrio topacio (250 mL) previamente lavadas, que se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Por otra parte, para evaluar la concentración de sulfuro de hidrógeno en aire, se seleccionaron cinco áreas diferentes de la planta (decantador, tanque de homogeneización, desbaste, digester y rebosador), realizándose el análisis *in situ*.

3.4.2. Muestras industriales

El análisis de productos industriales permite conocer si éstos han sido fabricado siguiendo los estándares requeridos. En este caso, se determinó la concentración de H₂O₂ en diferentes muestras de productos comerciales: agua oxigenada comercial 3% (Kern Pharma, España), emulsión oxidante estabilizada 6% (Farmavita, Italia), emulsión oxidante estabilizada 9% (Deliplus, España), emulsión oxidante estabilizada 1.5% (Deliplus, España).

3.4.3. Muestras biológicas

El análisis de parámetros biológicos permite obtener información acerca del estado de salud de las personas. Generalmente, se han estipulado intervalos en los

que se considera que una persona está sana, por lo que es necesario disponer de métodos que permitan establecer si dicho compuesto se encuentra entre los valores considerados normales. Por otra parte, en el caso de enfermedad o deficiencia, es necesario el uso de medicamentos con el fin de retornar al paciente al estado saludable. En estos casos, también es necesario conocer su concentración en fluidos biológicos para determinar si la concentración es la adecuada. Así, las muestras para el análisis de glucosa y meropenem, se obtuvieron tal y como se describe a continuación.

La determinación de los niveles de glucosa se llevó a cabo en el suero obtenido de distintos voluntarios, a los que se les extrajo sangre en ayunas en tubos sin anticoagulante (tapón rojo). Los tubos se dejaron reposar durante 2 horas y, seguidamente, se refrigeraron a 4 °C durante 30 minutos. A continuación, se centrifugaron a 2000 r.p.m. durante 10 minutos con el fin de separar el suero del resto de componentes celulares (eritrocitos, plaquetas, leucocitos) y del fibrinógeno. Finalmente, el suero se guardó en tubos eppendorf a -18 °C hasta su análisis.

Las muestras seleccionadas para determinar la presencia de meropenem fueron las secreciones mucosas formadas en tubos endotraqueales (TEs) usados en pacientes de la unidad de cuidados intensivos, a los que se les había aplicado este antibiótico para tratar algún tipo de infección. Las muestras de TEs fueron suministrados por el Hospital Universitario y Politécnico de La Fe.

La **Tabla 13** recoge, de manera resumida, las muestras analizadas en los diferentes trabajos, así como los analitos determinados en cada una de ellas.

Tabla 13. Muestras analizadas con sus respectivos analitos.

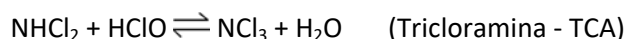
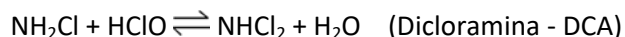
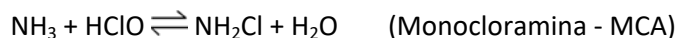
| Tipo de muestra | Muestra | Analito |
|------------------|--|-------------------------|
| Medioambientales | <ul style="list-style-type: none"> • Agua de distintas piscina • Agua de la red de abastecimiento | ✓ Monocloramina |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Aguas superficiales de distintos puertos de la Comunidad Valenciana | ✓ Irgarol-1050 y Diurón |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Aguas residuales • Atmósferas de una EDAR | ✓ Sulfuro |
| Industriales | <ul style="list-style-type: none"> • Disolución comercial de H₂O₂ (10 Vol.) • Emulsiones oxidantes estabilizadas | ✓ Peróxido de hidrógeno |
| Biológicas | <ul style="list-style-type: none"> • Suero sanguíneo | ✓ Glucosa |
| | <ul style="list-style-type: none"> • Secreciones mucosas formadas en tubos endotraqueales de pacientes tratados con este antibiótico | ✓ Meropenem |

CAPÍTULO IV - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de cloraminas en agua mediante el acoplamiento de la microextracción en fase sólida en tubo a un sistema de cromatografía líquida capilar (IT-SPME-CapLC-DAD).

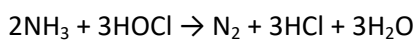
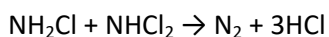
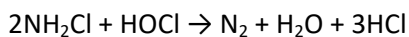
El saneamiento del agua mediante cloración ha sido uno de los avances más importantes en la salud pública gracias a que ha conseguido reducir drásticamente la transmisión enfermedades infecciosas producidas por beber agua en mal estado. Pese a que actualmente existen diversos métodos de desinfección, la cloración sigue siendo el método más utilizado por su bajo coste y elevada eficacia, desde su implantación a mediados del siglo XIX [180–183,303].

En el proceso de desinfección del agua mediante cloración, pueden diferenciarse distintas etapas a medida que se incrementa la cantidad de este desinfectante. En primer lugar, el cloro agregado reacciona con las sustancias inorgánicas reductoras presentes en el agua, por lo no se observa un aumento en la concentración de cloro residual. A continuación, la adición de más cloro provoca la reacción de éste con los compuestos orgánicos de nitrógeno presente en el agua, dando lugar a la formación de cloro residual combinado. Es en esta etapa donde tiene lugar la formación de las cloraminas:



La MCA es un desinfectante débil y un oxidante estable, por lo que puede ser usado como un desinfectante secundario [186–188], mientras que la DCA y la TCA son considerados subproductos de desinfección [186–191]. La proporción de estos compuestos depende del pH, la temperatura y la relación entre el cloro y el nitrógeno, por lo que bajo condiciones ambientales normales, la MCA es la especie dominante.

Posteriormente, a medida que se va aumentando el aporte de cloro, se produce la oxidación de los compuestos organoclorados, liberándose nitrógeno y reduciéndose el cloro a cloruro. Esto provoca una disminución en la concentración de cloro hasta un mínimo denominado punto de ruptura. La cantidad de cloro necesaria para alcanzar este punto se conoce como demanda de cloro.



No obstante, el punto de ruptura no llega a alcanzar el valor de cero debido a que una parte de la materia orgánica no se oxida totalmente.

Finalmente, la adición de más cloro produce un aumento en la concentración de cloro residual libre, puesto que se han completado todas las reacciones de oxidación de las sustancias orgánicas. En la **Figura 17** se representa el perfil típico de la curva de demanda de cloro.

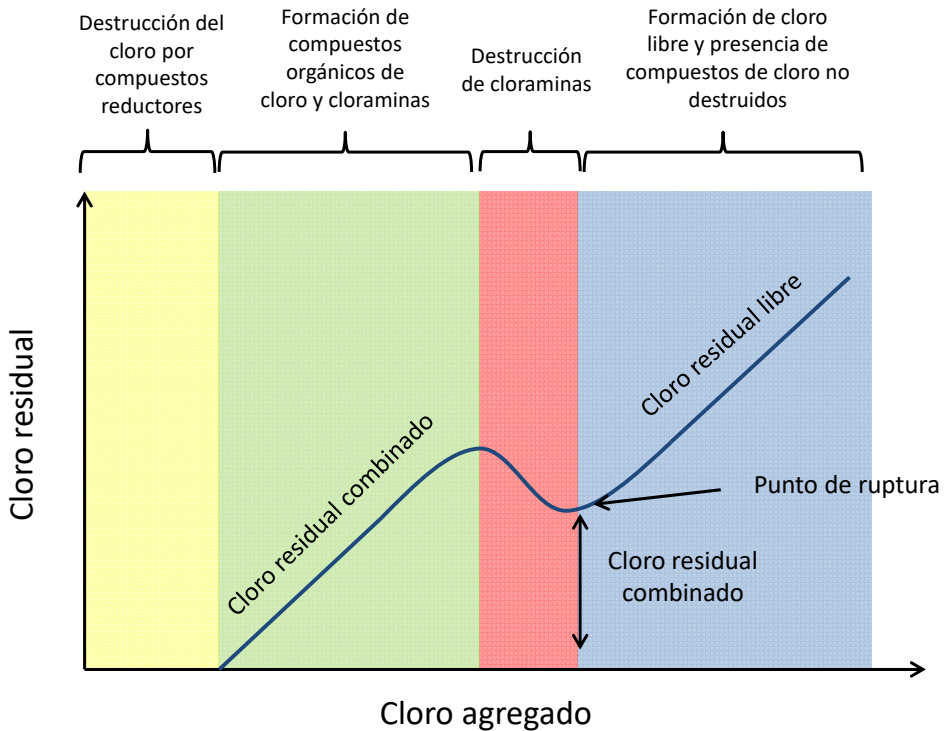


Figura 17. Etapas involucradas en la cloración de las aguas.

Considerando estos aspectos, los principales retos de este trabajo son (i) revisar y establecer las condiciones más favorables para la formación de la MCA y (ii) proponer un método rápido, simple, sensible y selectivo para el análisis de la MCA. Con el fin de conseguir estos objetivos, se ha desarrollado un método basado en IT-SPME-CapLC acoplado con un sistema cromatográfico capilar. Esta técnica permite inyectar las muestras directamente en el equipo debido a que los analitos no necesitan una etapa de derivatización u otro tratamiento previo al análisis.

Finalmente, el procedimiento propuesto ha sido aplicado para determinar MCA en muestras de agua reales. Esta metodología aporta una mejora en el tiempo de análisis con una disminución en el consumo de reactivos y en la generación de residuos.

4.1.1. Preparación de las disoluciones estándar

El estudio de las cloraminas es problemático debido a la ausencia de patrones comerciales de estos compuestos, por lo que deben ser preparadas en disolución acuosa y estandarizadas utilizando métodos analíticos apropiados (Ver Capítulo III, sección 3.3.1.) [186]. Tal y como se ha comentado, la síntesis de las cloraminas tiene una fuerte dependencia de las condiciones experimentales (pH, temperatura y relación Cl:N), por lo que las concentraciones obtenidas pueden variar en función de los parámetros utilizados para llevar a cabo la reacción. En la **Tabla 14** se recogen algunas de las condiciones de síntesis de MCA propuestas por distintos autores.

Tabla 14. Diferentes métodos de síntesis de MCA descritos en la bibliografía.

| Comp. N | Comp. Cl | Rel. Cl/N (mol) | pH | Tampón | Ref. |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------|-------------|-------|
| NH ₄ Cl | NaClO | 1: 1.25 | 8 | Fosfato | [183] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1 : 1.03 | 10 | NaOH | [199] |
| NH ₃ | NaClO | 1:1.1 | - | - | [304] |
| NH ₄ OH | Cl ₂ | 1 : 1 | - | Bicarbonato | [305] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1:1.25 | 8.5 | - | [181] |
| NH ₄ OH | NaClO | - | > 8.5 | Bicarbonato | [188] |
| NH ₄ OH | NaClO | - | 9 | Bicarbonato | [184] |
| NH ₃ | NaClO | 1:5 | 8 | - | [306] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1:1.03 | 8.5 | Fosfato | [307] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1:1 | 10 | - | [303] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1 : 1.2 | - | Fosfato | [308] |
| NH ₃ | NaClO | 1:1 | 11 | - | [309] |

Tal y como puede apreciarse, todas las metodologías de síntesis coinciden en utilizar una relación molar N/Cl \geq 1 en medio básico. Por lo tanto, a la vista de los resultados, se optó por utilizar una relación N/Cl 1.25:1 en un medio de reacción con pH 8. El exceso de N se empleó para evitar la aparición de productos policlorados como la DCA y TCA, mientras que el pH básico favoreció la formación de la MCA.

A continuación, para comprobar que la formación de MCA era cuantitativa, la disolución se analizó mediante el método estándar de la APHA basado en la reacción colorimétrica con N,N-dietil-p-fenilendiamina (DePD) [194]. La elección de esta metodología se debió a que esta técnica permite discernir entre las diferentes especies de cloro combinado (MCA, DCA y TCA), por lo que se pudo verificar si las condiciones de reacción eran las óptimas para la síntesis de la MCA o si, por el contrario, se producían subproductos como la DCA y TCA.

El DePD es un reactivo cromóforo que, en presencia de cloro, se oxida para dar lugar a un compuesto de color rosa con un máximo de absorbancia en 515 nm (lectura A: Cloro libre). Además, la adición de pequeñas cantidades de yoduro causan la oxidación del DePD debido a la presencia de MCA (lectura B: Cloro libre + MCA), mientras que un exceso de iones yoduro provocan la aparición del color debido a la DCA (lectura C: Cloro libre + MCA + DCA). Por consiguiente, en el caso de que la muestra contenga MCA o DCA, se produce un incremento en la señal registrada a 515 nm.

Como aparece en la **Figura 18**, la cantidad de cloro libre (lectura A) es nula, lo que indica que todo el cloro está en forma de cloro combinado. Por otra parte, la diferencia C-B, que indica la presencia de DCA, es insignificante, lo que indica que esta sustancia no está presente. Por último, la diferencia entre las señales B-A indica la concentración de MCA. Por lo tanto, la formación de este compuesto es cuantitativa.

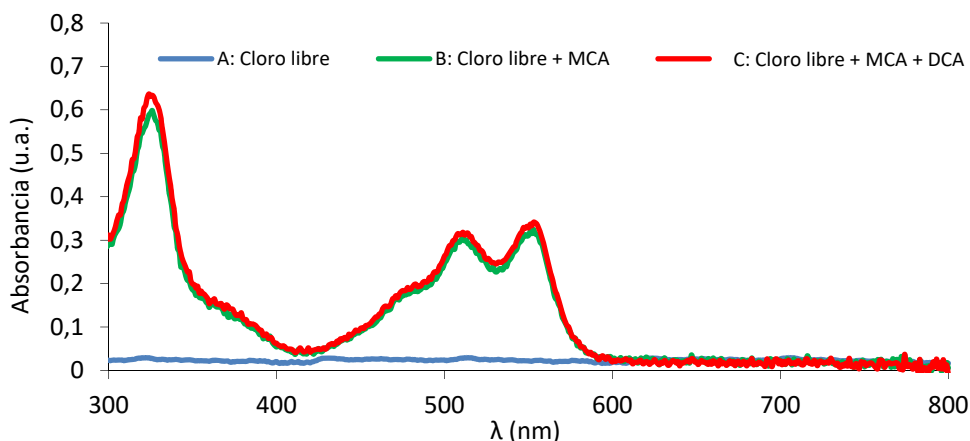


Figura 18. Espectro UV-vis del producto de oxidación de la N,N-dietil-p-fenilendiamina. A: Cloro libre, B: Cloro libre + MCA, C: Cloro libre + MCA + DCA.

Además, la concentración de MCA obtenida en la síntesis se estandarizó mediante tres métodos diferentes: el método colorimétrico de DePD, la reacción de Berthelot [83] y el método yodométrico [194]. Seguidamente, con el fin de comprobar si los resultados obtenidos por los tres métodos eran estadísticamente equivalentes, se llevó a cabo un análisis estadístico mediante el programa informático SPSS Statistics. La aplicación del test ANOVA de un factor reveló que los tres resultados eran estadísticamente diferentes ($\alpha < 0.05$). Por esta razón, a continuación, se analizaron los resultados usando un test-T para muestras independientes. Este test mostró que el método colorimétrico de DePD y el de la reacción de Berthelot daban resultados estadísticamente equivalentes, así como el método del DePD y el yodométrico. Sin embargo, las medias calculadas para la reacción de Berthelot y para el método yodométrico fueron estadísticamente diferentes para un nivel de confianza del 95%. Esta variación pudo ser debida a que el yoduro se oxida con el oxígeno del aire, por lo que las señales obtenidas mediante este método pudieron haber sufrido desviaciones.

De acuerdo con estos resultados, se usaron los métodos colorimétricos de DePD y de Berthelot para estandarizar las disoluciones de MCA. Así, se concluyó que el rendimiento de la reacción de formación de la MCA alcanzaba valores cercanos al 100 % en menos de 1 minuto.

4.1.2. Estabilidad de las disoluciones de MCA

Con el propósito de determinar la estabilidad de las disoluciones de MCA, un vial con una disolución patrón preparada de acuerdo a las condiciones comentadas anteriormente se cubrió con aluminio y se guardó en la nevera durante varios días. Posteriormente, dicha disolución se sometió al ensayo colorimétrico de DPD a distintos intervalos de tiempo para medir la concentración de MCA (**Figura 19**). Los resultados obtenidos mostraron que, aunque la concentración de MCA disminuía con el tiempo, ésta se mantuvo constante durante una jornada laboral. Por eso, las disoluciones de MCA se prepararon diariamente.

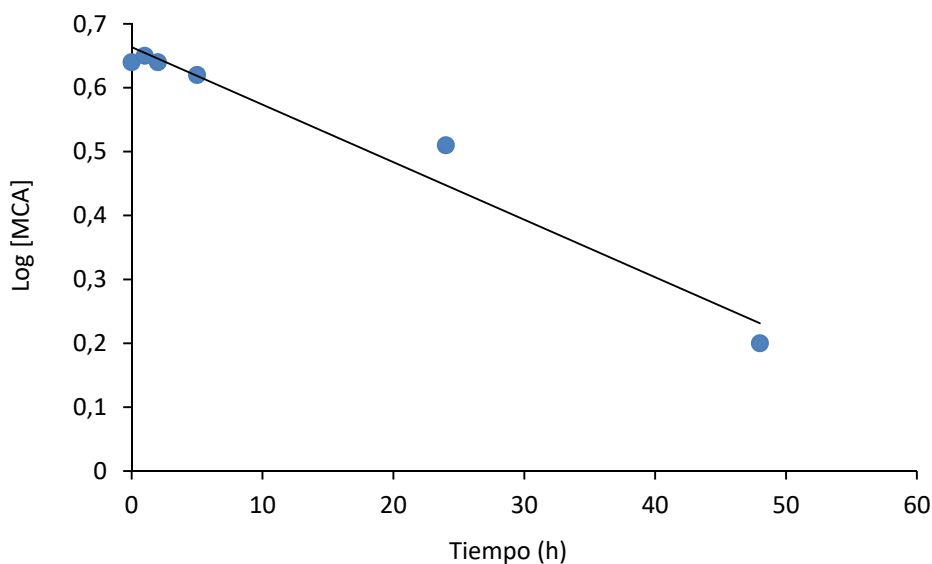


Figura 19. Variación de la concentración de MCA en función del tiempo.

4.1.3. Estudio de la etapa de preconcentración

Una vez establecidas las condiciones de síntesis de la MCA, se procedió a estudiar los parámetros relativos al IT-SPME-CapLC-DAD, como la naturaleza del recubrimiento, el volumen de muestra procesado y el pH.

En primer lugar, para estudiar el proceso de preconcentración, un segmento de columna de cromatografía capilar TRB-5, con un volumen interno de 25 μL , se usó como bucle de inyección. A continuación, se procesaron diferentes volúmenes de una disolución de 0.5 mg/L de MCA, empleando el sistema IT-SPME-CapLC. De la misma manera, se inyectaron diferentes volúmenes conteniendo la misma cantidad de analito (16 μg). En ambos casos, los volúmenes ensayados fueron desde 25 μL a 4 mL. Finalmente, los resultados se compararon con los obtenidos mediante la inyección directa (25 μL) de disoluciones en el rango de 2 a 16 mg/L.

Cuando la cantidad de MCA inyectada se mantuvo constante, se observó una disminución de la señal analítica a medida que se aumentó el volumen de muestra procesada, fenómeno que podría ser debido a la coelución del analito. Sin embargo, cuando se aumentaron los volúmenes de inyección usando una disolución de 0.5 mg/L de MCA, se observó un incremento del área de pico (**Figura 20**). Generalmente, el volumen de muestra procesado es alto en relación con la fase extractiva, por lo que la extracción de los analitos no es cuantitativa. Sin embargo, un incremento del volumen de muestra procesado conduce a un incremento de la respuesta, puesto que la cantidad absoluta de analito extraída es mayor.

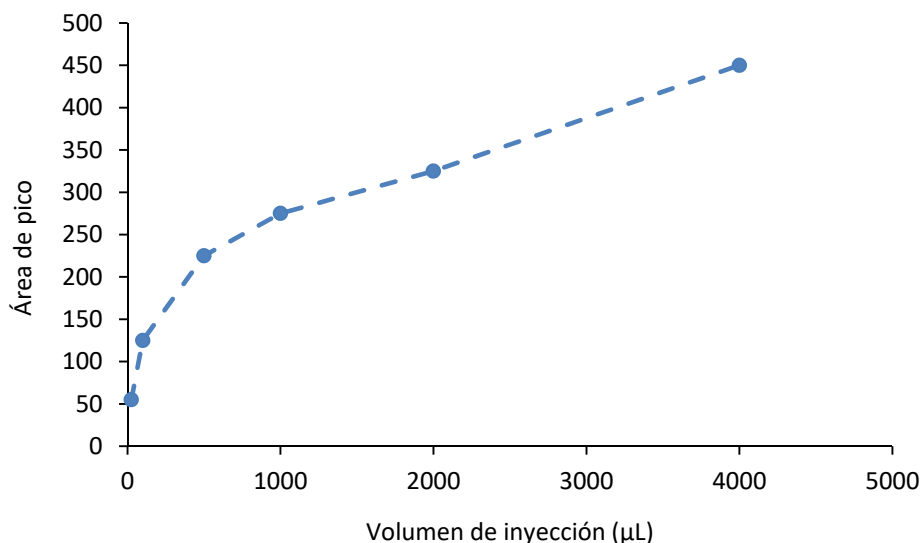


Figura 20. Variación de la respuesta analítica (área de pico) para la MCA (0.5 mg/L) en función del volumen de muestra procesado.

Por otra parte, la eficiencia de la IT-SPME se calculó por comparación entre la cantidad de analito extraída (transferida a la columna analítica) y total (cargada en el capilar del IT-SPME). En este sentido, la MCA retenida se obtuvo a través de las ecuaciones de calibrado construidas mediante la inyección directa de 25 μL de disoluciones de MCA.

Como era de esperar, para un volumen de 100 μL , la recuperación fue superior al 50%, mientras que para 4 mL fue cercana al 10%. Sin embargo, aunque la recuperación fue menor cuando se procesaron volúmenes altos, la cantidad absoluta de analito retenida en la fase adsorbente fue mayor, por lo que la respuesta obtenida presentó valores más altos. Estos resultados están de acuerdo con estudios publicados anteriormente [310].

Finalmente, se estudió el efecto de introducir una etapa de lavado después de la inyección de las disoluciones de MCA (25 μL H_2O). No obstante, se observó una disminución de la señal como consecuencia de la pérdida de analito, por lo que se descartó la introducción de esta etapa en el procedimiento.

4.1.4. Estudio de la influencia del pH de la fase móvil

Debido a que tanto la síntesis como la estabilidad de la MCA dependen del pH, se estudió la influencia de este parámetro en la respuesta analítica obtenida. Para ello, se prepararon tres fases móviles con metanol y tampón fosfato 0.1 M (60:40) (v/v) a diferentes valores de pH (3, 7 y 10). Seguidamente, se procedió a la inyección de la MCA (2.32 mg/L) en el sistema, registrando las señales analíticas en cada caso. Los resultados obtenidos mostraron que el valor del pH tiene un papel crítico, no solamente en la formación de la MCA, sino que también en su detección mediante HPLC-DAD. Así, para la misma concentración de MCA, la señal obtenida a pH 3 fue significativamente inferior a la registrada a pH 7, y ésta, a su vez, menor a la alcanzada a pH 10 (**Figura 21**). Este comportamiento indica que, a medida que el pH de la disolución desciende, también lo hace la estabilidad de la MCA, favoreciendo la presencia de DCA [311]. Por lo tanto, para una misma relación Cl/N, la señal analítica debida a la MCA será menor cuando el pH de la disolución disminuya.

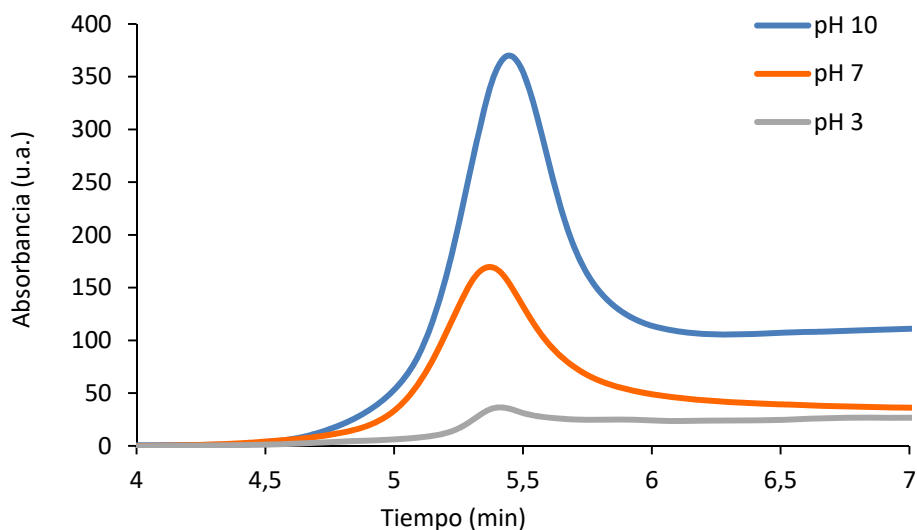


Figura 21. Cromatogramas obtenidos para una disolución de 2 mg/L de MCA usando fases móviles a diferentes pH.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede concluir que la señal de la MCA depende del pH, por lo que es necesario que el valor de pH de la fase móvil se asemeje al de las muestras que vayan a analizarse. De lo contrario, la concentración de MCA determinada podría no corresponderse con la concentración real presente en la muestra. Por consiguiente, dado que las muestras de agua se encuentran, normalmente, en el rango de pH entre 6.5-7, se optó por utilizar este valor para llevar a cabo los experimentos.

4.1.5. Parámetros analíticos

Las ecuaciones de la recta de calibrado, el intervalo lineal, la sensibilidad, la precisión y la exactitud del método fueron evaluados, obteniendo los resultados recogidos en la **Tabla 15**.

Tabla 15. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de MCA utilizando diferentes volúmenes de inyección.

| V (μl) | Linealidad (y=a+bx) | | | Intervalo lineal (mg/L) | RDS (%) | | LD (mg/L) |
|--------|---------------------|--------------------|----------------|-------------------------|----------------|-----------------|-----------|
| | a ± s _a | b ± s _b | R ² | | Intradía (n=3) | Interdía (n=6) | |
| 100 | -11 ± 7 | 515 ± 8 | 0.99 | 0.09-5 | 3 ^a | 13 ^b | 0.029 |
| 4000 | -45 ± 30 | 2057 ± 33 | 0.99 | 0.03-5 | --- | --- | 0.010 |

a: Calculada a 0.25 mg/L

b: Calculada a 2 mg/L

Los valores obtenidos indican que este procedimiento es adecuado en el intervalo de concentraciones de 0.09-5 mg/L. Por otra parte, la repetibilidad y la reproducibilidad se evaluaron mediante la RSD(%) intra- e inter-día, siendo 3 y 13, respectivamente.

El LD se determinó experimentalmente para una concentración de analito que diera una respuesta analítica que fuera 3 veces la relación S/N, siendo el resultado 0.029 mg/L. Aunque la legislación europea no establece ningún valor límite para la MCA, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un valor límite de 3

mg/L de MCA en agua de consumo [312], mientras que la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*) fija ese límite en 4 mg/L, expresado como Cl₂ [313]. En consecuencia, el método propuesto es capaz de detectar concentraciones de MCA muy por debajo de los límites establecidos por estas agencias.

Considerando los valores presentados anteriormente, se seleccionó un volumen de inyección de 100 µL para llevar a cabo los análisis. No obstante, en el caso de que se necesitaran LD menores, se podría incrementar el volumen de inyección (usando 4 mL, el LD fue de 0.010 mg/L).

4.1.6. Análisis de muestras de agua

El método propuesto en este trabajo se aplicó para analizar diferentes muestras de agua de piscina de la Comunidad Valenciana (Ver Capítulo III, sección 3.4.1.).

La concentración de MCA obtenida mediante el método colorimétrico fue, en todos los casos, inferior al LD. Por otra parte, en análisis mediante IT-SPME-CapLC-DAD reveló la presencia de MCA en todas las muestras analizadas (**Tabla 16**), obteniendo valores comprendidos entre 69 y 98 µg MCA/L. Estos resultados confirmaron que el método propuesto es capaz de obtener LDs mucho menores que los obtenidos mediante el método colorimétrico con DePD.

Tabla 16. Concentraciones de MCA determinadas en diferentes muestras, mediante el método colorimétrico con DPD y IT-SPME-CapLC.

| Muestra | Método colorimétrico con DePD | IT-SPME-CapLC-DAD (mg NH ₂ Cl/L) |
|-----------------|-------------------------------|---|
| Piscina 1 | < LD | 0.090 ± 0.011 |
| Piscina 2 | < LD | 0.069 ± 0.004 |
| Piscina 3 | < LD | 0.094 ± 0.007 |
| Piscina 4 | < LD | 0.098 ± 0.009 |
| Agua de consumo | < LD | 0.084 ± 0.012 |

En la **Figura 22** se muestran los cromatogramas obtenidos al procesar disoluciones patrón de MCA, una muestra de agua de piscina y esa misma muestra fortificada con 0.3 mg/L de MCA.

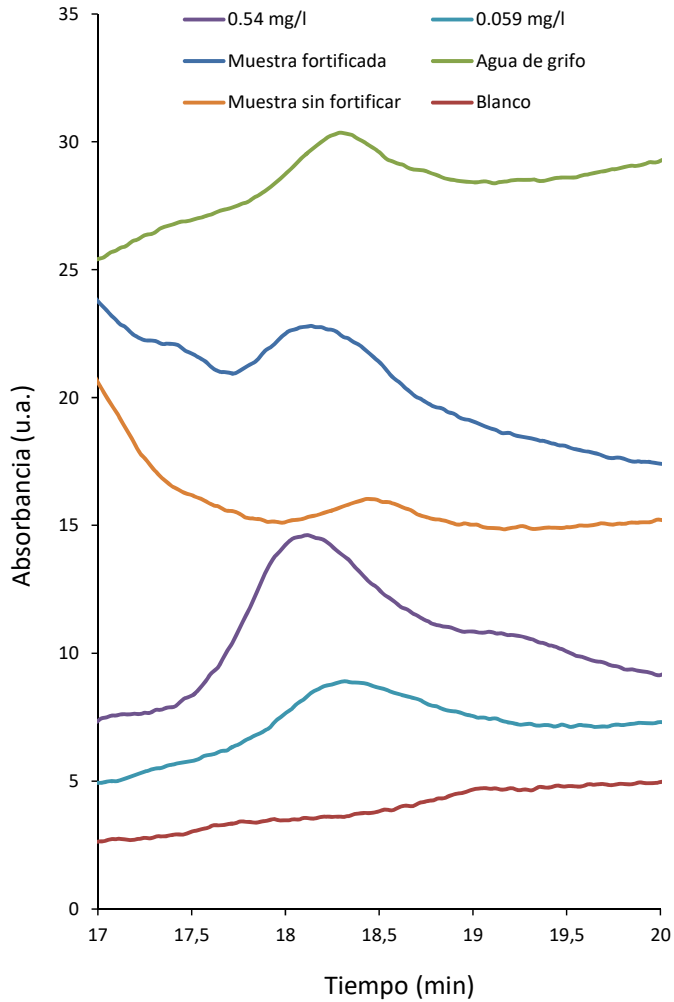


Figura 22. Cromatogramas correspondientes a diferentes disoluciones: blanco, disoluciones patrón, muestras de agua de piscina, muestras de agua de piscina fortificadas y agua de grifo (Volumen procesado: 100 μ L).

Como puede observarse, el pico relativo a la MCA aparece en todos los cromatogramas (exceptuando el blanco), a un tiempo entre 18 y 18.5 min.

Finalmente, para evaluar la exactitud del método, tanto las muestras de agua como el blanco se fortificaron con una concentración de 0.3 mg/L, obteniéndose recuperaciones de $81 \pm 6\%$ (n=3).

4.1.7. Aplicabilidad del método

Cabe destacar que el procedimiento descrito sería igualmente aplicable para la determinación de las otras dos cloraminas (DCA y TCA), permitiendo la separación y cuantificación de las distintas especies de cloro combinado.

Tal y como se ha comentado anteriormente, la proporción de estos compuestos depende, principalmente, del pH y la relación entre el cloro y el nitrógeno. La formación de la DCA exige un pH alrededor de 4.5 y una relación Cl/N entre 2:1-3:1, mientras que valores de $\text{pH} < 3$ y relaciones Cl/N superiores a 3 favorecen la aparición de la TCA [186]. Así, con el fin de comprobar si la DCA y TCA podían ser detectadas mediante el método propuesto, se prepararon disoluciones con una relación molar Cl/N de 3.5 a $\text{pH} 3$ y se inyectaron en el sistema IT-SPME-CapLC-DAD (Capítulo III, sección 3.3.1.).

Como cabría esperar, en la **Figura 23** se observa que el pico correspondiente a la TCA es el que presentó mayor área debido a que las condiciones utilizadas ($\text{Cl/N} > 3$ y $\text{pH} = 3$) favorecen la formación de esta especie [186]. No obstante, también se detectaron MCA y DCA, aunque con un área de pico significativamente menor que la obtenida para la TCA.

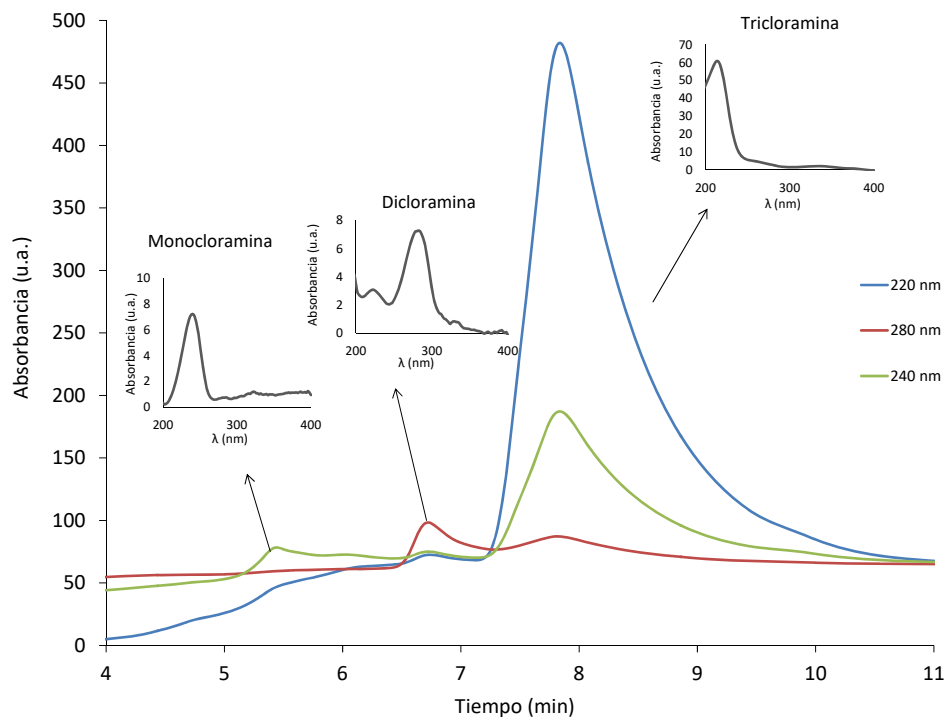


Figura 23. Cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda de una disolución de TCA (6 mg/L) a pH=3.5, utilizando una fase móvil MeOH:Tampón pH 3.5.

4.1.7. Comparación con otros métodos

En la **Tabla 5** (Capítulo I, sección 1.4.1.) se han expuesto las principales características de los métodos propuestos para la determinación de MCA. Como puede observarse, en algunas ocasiones, estos métodos solamente son capaces de determinar la cantidad de cloro total, sin diferenciar entre las especies de cloro combinado y cloro libre. Sin embargo, los métodos basados en el uso del reactivo DePD (colorimétrico y valoración) sí que permiten distinguir entre los diferentes tipos de cloraminas, aprovechando los distintos potenciales de oxidación que presentan estos compuestos. Finalmente, se ha propuesto el uso de sistemas de separación como HPLC capaces de distinguir entre las distintas especies de cloro combinado gracias a la diferencia de polaridad existente entre ellas.

En el presente trabajo se ha acoplado la IT-SPME a un sistema de HPLC, aprovechando, de esta manera, las ventajas de ambas técnicas. Por una parte, la IT-SPME permite realizar la extracción y preconcentración de los analitos, mientras que la HPLC permite discernir entre las distintas cloraminas presentes en la muestra. Además, la extracción, preconcentración y análisis se llevan a cabo en una sola etapa, reduciendo la manipulación de la muestra y minimizando el riesgo de contaminación.

4.1.7. Conclusiones.

En este trabajo se ha comprobado que las condiciones de síntesis de la MCA son un factor crítico a la hora de obtener este producto, puesto que parámetros como el pH o la relación Cl/N puede dar lugar a la formación mayoritaria de MCA, DCA o TCA.

Por otra parte, la dependencia del pH que muestran las cloraminas es un factor importante a la hora de seleccionar la fase móvil cuando se quiera emplear un método cromatográfico. Como se ha visto, una variación en el pH de la fase móvil conlleva una disminución en la señal de la MCA como consecuencia de la formación de la DCA. De acuerdo con estos resultados, el pH de la fase móvil tiene que ser ajustado teniendo en cuenta el pH de las muestras que se vayan a procesar.

Basándonos en estos resultados, una combinación de IT-SPME-CapLC-DAD permite la determinación selectiva de la MCA a un nivel de concentración bajo. La metodología propuesta dio lugar a un intervalo lineal satisfactorio, así como a un buen LD, permitiendo determinar niveles de concentración inferiores a los recomendados por agencias como la EPA o la OMS.

4.2. Microextracción en fase sólida en tubo acoplada a un sistema cromatográfico capilar (IT-SPME-CapLC-DAD) para la determinación de biocidas en aguas

La acumulación de microorganismos y plantas en las superficies sumergidas de embarcaciones puede deteriorar el recubrimiento, aumentar el consumo de combustible o introducir especies foráneas en nuevos ecosistemas [213,216,217]. Con el fin de dar solución a estos problemas, a finales de los años 50 y principios de los 60, el tributilestano (TBT) se introdujo en la composición de las pinturas aplicadas en muelles o en el casco de las embarcaciones como agente anti incrustante, obteniendo muy buenos resultados. Sin embargo, en el año 2008, la Organización Marítima Internacional prohibió su uso a nivel mundial dada su elevada toxicidad [314].

Como alternativa al TBT, se optó por utilizar insecticidas, fungicidas y herbicidas para desarrollar el papel de agentes antiincrustantes, siendo el diurón y el irgarol-1051 dos de los compuestos más empleados. El irgarol-1051 es una triazina simétrica que actúa bloqueando una etapa en la cadena de transporte electrónico del fotosistema II [202–204]. Por otra parte, el diurón es un herbicida de la familia de las fenilureas que, al igual que el irgarol-1051, es un inhibidor de la fotosíntesis que actúa sobre el fotosistema II. Estos biocidas son sustancias persistentes en el medio marino, estableciéndose el tiempo de vida media para el irgarol-1051 en un periodo comprendido entre 100 y 350 días [203,207,208], mientras que para el diurón este valor oscila entre 43 y 2180 días [209].

Las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas que desarrolla la Directiva Marco del Agua [315], establecen una concentración máxima permitida de 0.016 µg/L de irgarol-1051 y 1.8 µg/L de diurón en aguas superficiales. Sin embargo, la determinación de estos compuestos implica, generalmente, la extracción, limpieza y preconcentración de las muestras antes del análisis cromatográfico. Por lo tanto, el empleo de la técnica de IT-SPME puede resultar una alternativa atractiva para la determinación de estos compuestos en muestras de agua.

En este trabajo se propone un procedimiento en línea para determinar irgarol-1051 y diurón en muestras de agua basado en IT- SPME-CapLC-DAD. Además, la eficiencia de la metodología empleada ha sido demostrada, no solo estimando los parámetros analíticos, sino que también por medio de la cuantificación del impacto ambiental a través del cálculo de la huella de carbono (CFP). Por consiguiente, entre las principales ventajas que ofrece esta metodología se encuentran la eliminación de la etapa de pretratamiento, así como la minimización del tiempo de análisis, residuos y costes.

4.2.1. Optimización del procedimiento de IT- SPME

En este trabajo, una columna cromatográfica capilar se usó como bucle de inyección, produciéndose la extracción de los analitos durante la fase de carga. Posteriormente, los analitos fueron transferidos a la columna analítica por medio de la fase móvil cuando la válvula cambió de posición. Esta configuración es especialmente ventajosa para el análisis de muestras de agua debido a que se pueden procesar volúmenes de muestra relativamente grandes (mayores que 4 mL) y, en consecuencia, alcanzar los límites de detección requeridos.

En primer lugar, se procedió a optimizar el sistema propuesto para el análisis de biocidas. Para ello se evaluaron los siguientes parámetros: la naturaleza de la fase adsorbente, la longitud de la columna capilar y el volumen de muestra procesado.

Para estudiar la influencia de la fase adsorbente en la retención del irgarol-1051 y el diurón, se utilizaron distintos tipos de columnas capilares de PDMS con distintos porcentajes de grupos fenilo (5%, 20%, 35% y 50%). Seguidamente, se inyectó 1 mL de disolución con ambos biocidas (2.5 µg/L de irgarol-1051 y 12.5 µg/L de diurón) y se registró la respuesta analítica (**Figura 24**).

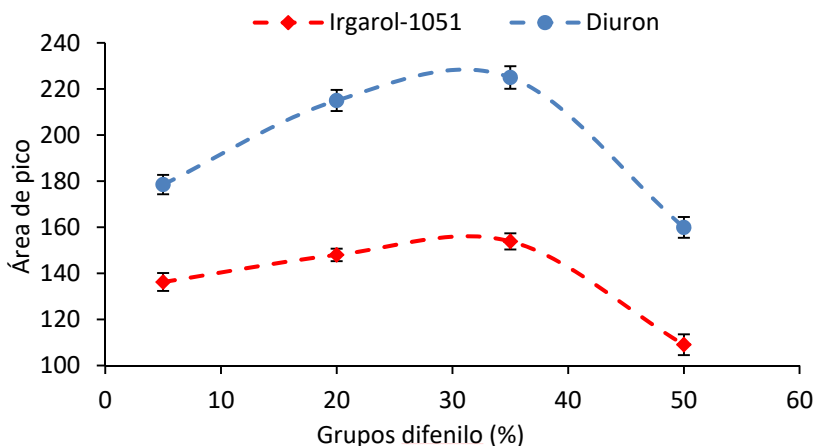


Figura 24. Variación de la respuesta analítica (área de pico) para el irgarol-1051 (2.5 $\mu\text{g/L}$) y diurón (12.5 $\mu\text{g/L}$) en función del porcentaje de grupos difenilo en la fase extractante, para un volumen procesado de 1mL.

Como puede observarse, el incremento de los grupos difenilo lleva asociado un incremento de la respuesta analítica. Sin embargo, fases adsorbentes con un porcentaje de éstos mayor al 50% provocaban una disminución significativa del área de pico. Por esta razón, una composición del 35% proporciona un ambiente óptimo de retención que puede ser atribuido a un equilibrio entre las interacciones apolares y de tipo π - π entre el adsorbente y los analitos. Así, la fase adsorbente TRB-35 fue seleccionada para llevar a cabo experimentos.

En la siguiente etapa, se estudió la influencia de la longitud de la columna capilar. Para ello, se inyectaron volúmenes de 1 mL de disolución patrón de irgarol-1051 (2.5 $\mu\text{g/L}$) y diurón (25 $\mu\text{g/L}$) en columnas capilares de 30, 60 y 100 cm. La respuesta analítica del irgarol-1051 se incrementó en un 18% y 57% para las columnas capilares de 60 y 100 cm, respectivamente, comparada con la respuesta obtenida con la columna de 30 cm. En el caso del diurón, este incremento fue del 36% y 75% para columnas capilares de 60 y 100 cm, respectivamente. Sin embargo, mayores longitudes no incrementaron la respuesta analítica. Así, 100 cm fue la longitud elegida como óptima.

Finalmente, se analizó el efecto del volumen procesado mediante la inyección de volúmenes entre 50 μL y 4 mL (**Figura 25**). Como puede verse, en el caso del

irgarol-1051, la respuesta analítica se incrementó a medida que lo hacía el volumen inyectado. De la misma manera, la señal analítica del diurón aumentó junto con el volumen procesado. No obstante, en este caso, la inyección de volúmenes superiores a 0.5 mL no produjo un aumento significativo de la respuesta, comportamiento que puede ser debido a la saturación de la fase adsorbente, produciéndose la coelución del diurón con la muestra. Sin embargo, con el propósito de obtener una mayor respuesta para el irgarol-1051, 4 mL fue el volumen de muestra seleccionado para llevar a cabo los experimentos.

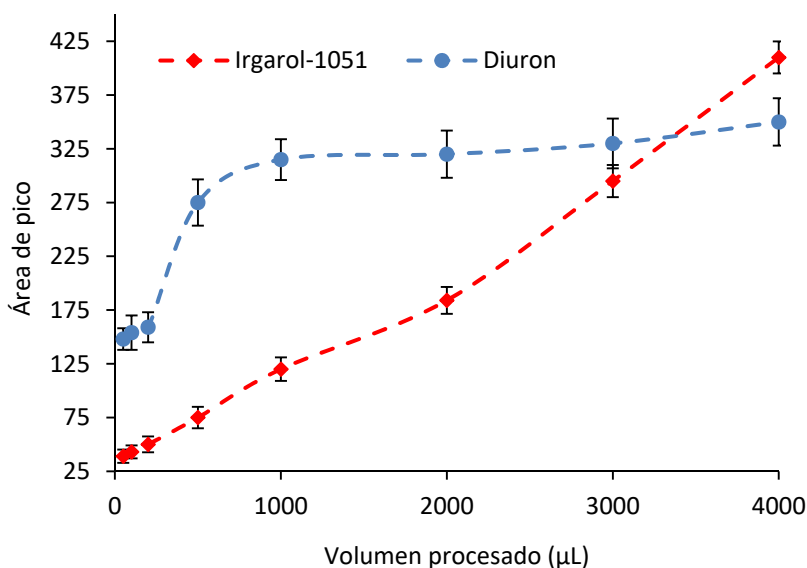


Figura 25. Variación de la respuesta analítica (área de pico) para el irgarol-1051 (2.5 µg/L) y diurón (12.5 µg/L) en función del volumen de muestra procesado. (Fase extractante de TRB-35 y longitud del capilar de 100 cm).

La IT-SPME es una técnica de extracción no exhaustiva, por lo que no pueden conseguirse extracciones cuantitativas. Sin embargo, se obtienen buenos resultados debido al gran volumen de muestra procesada por la columna. La eficiencia de la extracción para diurón e irgarol-1051 se estimó comparando la cantidad de analito extraído (cantidad de analito transferido a la columna analítica) con la cantidad total de sustancia que pasó a través de la columna

capilar. La cantidad de compuesto retenida se estableció a través del área de pico en los cromatogramas resultantes y por las rectas de calibrado construidas mediante inyección directa de 2 μL de disoluciones patrón.

La eficiencia de extracción obtenida fue del 3 y 19% para diurón e irgarol-1051, respectivamente, valores acordes con los principios de la técnica. La **Figura 26** muestra los cromatogramas obtenidos para una mezcla de irgarol-1051 y diurón bajo las condiciones seleccionadas.

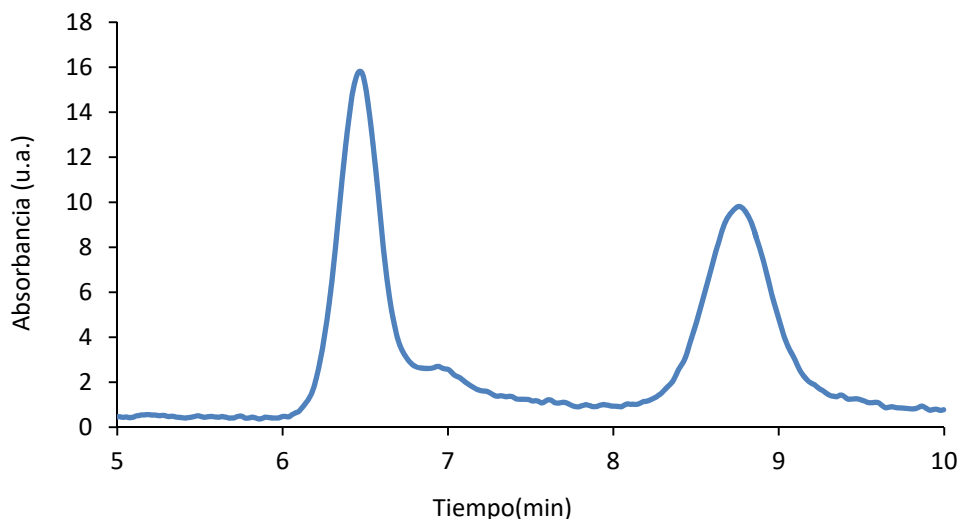


Figura 26. Cromatograma obtenido en condiciones experimentales óptimas para una mezcla de diurón (12.5 $\mu\text{g/L}$) e irgarol-1051 (2.5 $\mu\text{g/L}$).

4.2.2. Parámetros analíticos

Las ecuaciones del calibrado para el irgarol-1051 y el diurón, el intervalo lineal, el LD, el LQ y la precisión se muestran en la **Tabla 17**, obtenidos a 226 y 254 nm, respectivamente. El LD se obtuvo experimentalmente a partir de los patrones en base a la relación $S/N = 3$, mientras que el LQ se estableció considerando el criterio $S/N = 10$. Los límites del rango lineal quedaron definidos por el LQ y la concentración de analito en la cual el coeficiente de regresión tenía un valor inferior a 0.99. Cabe decir que la curva de calibrado no fue forzada a pasar por 0.

En lo referente a la precisión del método, ésta se expresó por medio de la RSD(%). Finalmente, las concentraciones cuantificadas se expresaron como la media \pm incertidumbre expandida $k=2$ y usando la desviación estándar de las réplicas, de acuerdo con el National Institute of Standards and Technology (NIST) [316].

El método propuesto ha obtenido resultados satisfactorios en el intervalo de 0.05-15 $\mu\text{g/L}$ y 0.7-15 $\mu\text{g/L}$ para el irgarol-1051 y el diurón, respectivamente. El LD y LQ para el irgarol-1051 fue de 0.015 y 0.05 $\mu\text{g/L}$, respectivamente. En el caso del diurón, LD fue de 0.2 $\mu\text{g/L}$ y LQ de 0.7 $\mu\text{g/L}$. Estos resultados mostraron que la sensibilidad alcanzada con el método propuesto es adecuada para el análisis de estos compuestos porque los LDs están por debajo del nivel máximo fijado por la legislación europea [315]. La precisión del método propuesto se evaluó en términos de reproducibilidad, obteniéndose valores inferiores al 4% para los niveles de concentración estudiados.

Tabla 17. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de diurón e irgarol-1051.

| Analito | Intervalo lineal ($\mu\text{g/L}$) | Recta de calibración $y=a+bx$ | | R^2 | LD ($\mu\text{g/L}$) | RSD (%) |
|---------|---|----------------------------------|-----------------------|-------|---------------------------|------------|
| | | a | b ($\mu\text{g/L}$) | | | |
| | | Irgarol-1051 | 0.05-10 | | | |
| Diurón | 0.7-10 | 6 ± 4 | 11 ± 1 | 0.998 | 0.200 | 1.5 |

4.2.3. Análisis de muestras de agua

El método optimizado se aplicó para analizar muestras de agua de tres puertos de la región de Valencia (Puerto de Valencia, Port Saplaya y Siles) en diferentes períodos de tiempo (**Figura 27**). El método de muestreo aparece detallado en el Capítulo III, sección 3.4.1.



Figura 27. Zonas seleccionadas para el muestreo de irgarol-1051 y diurón.

La identificación de los analitos en las muestras de agua se realizó mediante los tiempos de retención y los espectros UV-vis. La **Tabla 18** recoge las muestras analizadas y los resultados obtenidos mediante el método propuesto. Tal y como puede observarse, la concentración de diurón fue menor que el LD en todos los puertos y en todos los periodos muestreados. Por lo tanto, estos puntos satisfacen la legislación europea referente a este analito. La concentración de irgarol-1051 también se encontró por debajo del LD, excepto en el caso de las muestras 1 y 2 del Puerto de Valencia, donde la concentración fue de $0.02 \mu\text{g/L}$. La presencia de irgarol-1051 en estas aguas se entiende teniendo en cuenta que el Puerto de Valencia es el principal puerto de esta región y uno de los que más tráfico acoge de España. En la **Figura 28** se muestra el cromatograma obtenido para la muestra 1, perteneciente al Puerto de Valencia.

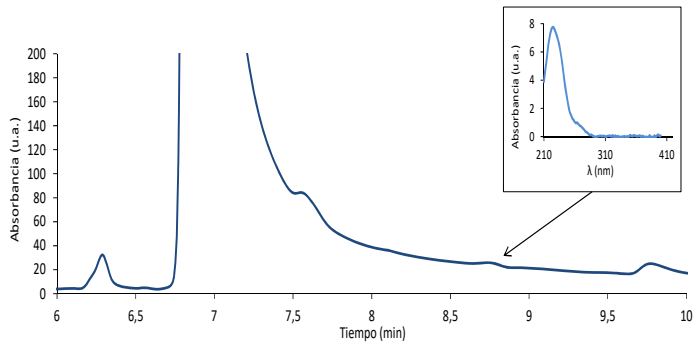


Figura 28. Cromatograma obtenido en la muestra 1. En el recuadro se representa el espectro UV-vis del pico $t_r = 8.7$ minutos, correspondiente al irgarol-1051.

Finalmente, con el fin de validar los resultados obtenidos, se realizó un estudio de recuperación. Para este propósito, se analizaron muestras fortificadas con irgarol-1051 ($0.2 \mu\text{g/L}$) y diurón ($1.5 \mu\text{g/L}$) siguiendo el método propuesto. En la **Tabla 18** aparecen los porcentajes de recuperación obtenidos, situándose entre el 92 y el 105% para todas las muestras.

Tabla 18. Concentraciones de irgarol-1051 y diurón obtenidas en las diferentes muestras de agua analizadas mediante el método IT-SPME-CapLC-DAD.

| | | | Concentración ($\mu\text{g/L}$) | | Recuperación (%) | |
|------------------------|------------|-------|--------------------------------------|--------|---------------------|-------------|
| | | | Irgarol-1051 | Diurón | Irgarol-1051 | Diurón |
| Puerto de Valencia | Muestra 1 | Marzo | 0.02 | <LD | 102 \pm 9 | 96 \pm 4 |
| | Muestra 2 | Abril | 0.02 | <LD | 110 \pm 5 | 100 \pm 5 |
| | Muestra 3 | Junio | <LD | <LD | 104 \pm 6 | 105 \pm 6 |
| | Muestra 4 | Julio | <LD | <LD | 102 \pm 4 | 99 \pm 7 |
| Marina Port Saplaya | Muestra 5 | Marzo | <LD | <LD | 92 \pm 5 | 99 \pm 4 |
| | Muestra 6 | Abril | <LD | <LD | 108 \pm 3 | 103 \pm 6 |
| | Muestra 7 | Junio | <LD | <LD | 113 \pm 3 | 96 \pm 5 |
| | Muestra 8 | Julio | <LD | <LD | 115 \pm 6 | 100 \pm 8 |
| Puerto de Siles | Muestra 9 | Marzo | <LD | <LD | 93 \pm 5 | 92 \pm 7 |
| | Muestra 10 | Abril | <LD | <LD | 98 \pm 4 | 105 \pm 6 |
| | Muestra 11 | Junio | <LD | <LD | 91 \pm 8 | 94 \pm 8 |
| | Muestra 12 | Julio | <LD | <LD | 103 \pm 5 | 98 \pm 6 |

4.2.4. Estudio de estabilidad

Tal y como se ha comentado anteriormente, uno de los principales inconvenientes de los biocidas irgarol-1051 y diurón reside en su elevada persistencia en el ambiente, facilitando que estos compuestos puedan ser ingeridos por los organismos acuáticos y, de esta manera, entren en la cadena trófica. Por consiguiente, con el objetivo de determinar la estabilidad de estos biocidas, se preparó una disolución con una concentración de 2.5 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$ de irgarol-1051 y diurón, respectivamente, y se guardó en un vial transparente. Posteriormente, la disolución se sometió a radiación solar durante un período de 130 días. Durante este tiempo, se tomaron alícuotas de la disolución y se analizaron mediante el procedimiento propuesto.

Tal y como puede observarse en la **Figura 29**, la respuesta obtenida por el diurón se mantuvo constante durante todo el período, mientras que el área de pico presentada por el irgarol-1051 sufrió un ligero descenso.

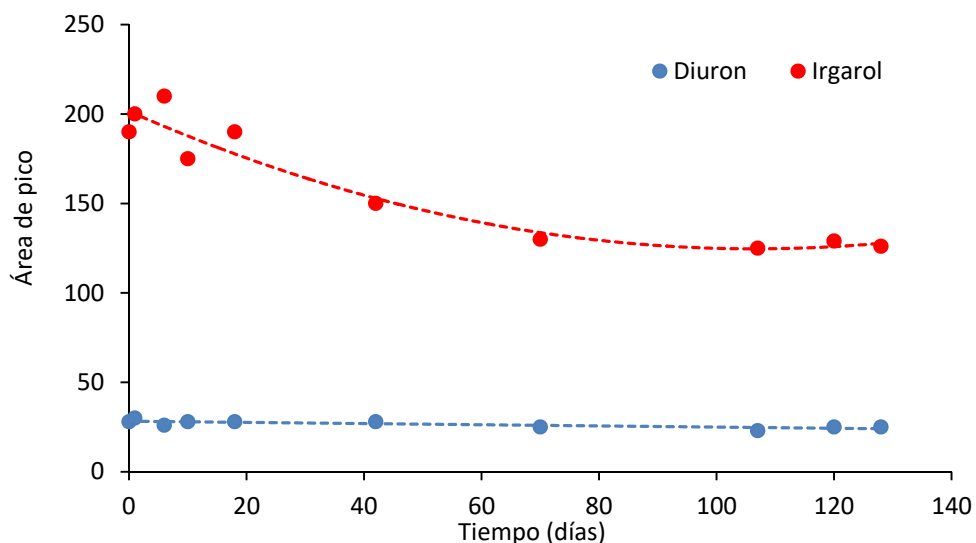


Figura 29. Variación de la respuesta analítica (área de pico) obtenida para el irgarol-1051 (2.5 µg/mL) y diurón (10 µg/mL) después de ser sometidos a un proceso de fotoalteración.

Los datos obtenidos mediante esta experiencia confirman la escasa degradación que sufren estas especies en el medio ambiente, resultados que están en concordancia con los valores obtenidos en distintos estudios publicados en la bibliografía [203,207–209].

4.2.5. Cálculo de la huella de carbono

La CFP representa la cantidad de emisiones de GHG producidas por una actividad, expresada como kg CO₂eq. En este trabajo, se ha obtenido la CFP como un parámetro cuantitativo para evaluar el impacto ambiental del método desarrollado, así como para compararlo con otras propuestas existentes en la bibliografía. La CFP se calculó utilizando la fórmula $\text{kgCO}_2\text{eq} = \Sigma(\text{cantidad de electricidad consumida (kWh)} \times \text{factor de emisión de la electricidad (kg CO}_2/\text{kWh)})$.

Los cálculos se llevaron a cabo considerando la energía consumida en el análisis de 100 muestras, teniendo en cuenta los tiempos de análisis descritos en cada estudio. El consumo energético de cada equipo se obtuvo a partir de los instrumentos utilizados en cada caso. Por otra parte, se usó el factor de emisión de referencia de 0.247 kg CO₂/kWh. En la **Tabla 19** se recogen los parámetros analíticos de las metodologías previamente desarrolladas para la determinación de biocidas, junto con el valor de la huella de carbono.

Tabla 19: Parámetros analíticos y huella de carbono para diferentes métodos propuestos para el análisis de biocidas.

| Análito | Pretratamiento | | Separación/ Detección | Tiempo de análisis (min) | Parámetros analíticos | | CFP (kg CO ₂ eq.) | Ref. | |
|--------------------------|-------------------|-------------|--------------------------|--------------------------------|-----------------------|------------|---------------------------------|--------|---------------------|
| | Fuera de línea | En línea | | | LD (µg/L) | RSD (%) | | | Rec. (%) |
| Irgarol-1051 | | | | | | | | | |
| Diurón | | | | | | | | | |
| Clorotanollil | | | | | | | | | |
| Diclofluánida | SPE | - | HPLC-DAD | 17 | 0.007- 0.415 | <11 | 68-103 | 1.80 | [216] |
| TCMTB | | | | | | | | | |
| Thiram | | | | | | | | | |
| Irgarol-1051 | | | | | | | | | |
| Diurón | | | | | | | | | |
| Derivados | SPE | - | HPLC-DAD | 60 | 0.005- 0.011 | <14 | 97-116 | 2.33 | [202] |
| Clorotanollil | | | | | | | | | |
| Diclofluánida | | | | | | | | | |
| Sea-Nine 211 | SBSE | - | TD-GC-MS | 110 | 0.005- 0.900 | <30 | 82-118 | 16.90 | [213] |
| Irgarol-1051 | | | | | | | | | |
| TCMTB | | | | | | | | | |
| Irgarol 1051 | | | | | | | | | |
| Sea-Nine 211 | HS- SPME | - | GC-MS | 80 | 0.010- 0.030 | <9 | 82-118 | 220.00 | [317] |
| Irgarol-1051 | | | | | | | | | |
| Diurón | MF- SPME | - | HPLC-DAD | 100 | 0.0014- 0.0048 | <12 | - | 23.80 | [318] |
| Pesticidas y fármacos | | | | | | | | | |
| Irgarol-1051 | | | | | | | | | |
| Diurón | SPE | - | LC-ESI- MS/MS | 26 | 0.003-0.1 | <32 | 62-104 | 41.10 | [215] |
| Derivados | | | | | | | | | |
| Irgarol-1051 | | | | | | | | | |
| Diurón | - | IT- SPME | CapLC-DAD | 10 | 0.015- 0.200 | <4 | 92-113 | 1.14 | Método propuesto |

Tal y como puede observarse, los resultados indican que la CFP varía significativamente en función del tratamiento de la muestra y de la técnica de separación/detección empleada. Los valores de la CFP para SPE-HPLC-DAD fueron de 2.33 y 1.8 kg CO₂eq., siendo mayores que los obtenidos por el IT-SPME-HPLC-DAD. Estos resultados se deben a que los procedimientos que utilizan SPE requieren una etapa de preconcentración adicional (evaporación) para alcanzar los LDs requeridos y, por lo tanto, el consumo de energía aumenta. Además, en los métodos que usan la SPE, los tiempos de análisis, la generación de residuos y el consumo de disolventes son mayores. Mientras tanto, IT-SPME elimina completamente el consumo de disolvente en la etapa de preconcentración, reduciendo el valor de la CFP asociado a esta etapa. GC-MS combinado con SBSE y HS-SPME produjeron una cantidad mayor de emisiones, especialmente HS-SPME-HC-MS debido a la necesidad del acondicionamiento de la fibra, el baño de agua y los agitadores durante el pretratamiento de la muestra. En MF-SPME acoplado a SPE también se obtuvieron valores altos de CFP como consecuencia de la larga etapa de pretratamiento.

4.2.6. Comparación con otros métodos

Las metodologías analíticas para la determinación de biocidas recopiladas en la **Tabla 6** (Capítulo I, sección 1.4.2.), en su mayoría, hacen uso de la HPLC acoplada a detectores de DAD y MS/MS. Paralelamente, se han propuesto distintas técnicas de extracción, como la BA μ E, LL, DLLME, SPE o SPME. Sin embargo, cabe destacar que las técnicas de BA μ E, LL, DLLME, a día de hoy, no pueden ser acopladas en línea a un sistema HPLC, por lo que el análisis requiere de distintas etapas, aumentando la manipulación de la muestra y el riesgo de que ésta se contamine. No ocurre lo mismo en el método propuesto en este trabajo, donde la extracción, preconcentración y análisis se llevan a cabo en una sola etapa gracias al acoplamiento IT-SPME-HPLC.

Por otra parte, el sistema IT-SPME-HPLC, además de simplificar el análisis de los biocidas, ha conseguido reducir el impacto negativo sobre el ambiente, tal y como demuestra el valor de la CFP obtenido (1.14 kg CO₂ eq.). De esta manera, se puede

concluir que esta metodología se enmarca dentro de los principios de la Química Verde.

4.2.7. Conclusiones

En el presente trabajo se empleó una metodología basada en IT-SPME acoplado a CapLC con detector de fila de diodos para analizar los biocidas irgarol-1051 y diurón en muestras de agua. Esta nueva metodología demostró ser efectiva para la extracción y preconcentración en línea del irgarol-1051 y el diurón. Los límites de detección fueron de 0.015 y 0.2 $\mu\text{g/L}$ para el irgarol-1051 y diurón, respectivamente. En consecuencia, este método puede usarse para conseguir evaluar si cumplen los estándares propuestos en la legislación europea. Además, la precisión fue también satisfactoria.

Además, también se la calculado la CFP relativa al IT-SPME-CapLC-DAD con el fin de compararla con la obtenida en otros métodos propuestos en la bibliografía dirigidos el análisis de biocidas. Los resultados obtenidos sitúan al IT-SPME-CapLC-DAD como el método con menor impacto negativo para el entorno. Por consiguiente, IT-SPME-CapLC-DAD puede ser un método alternativo fácilmente aplicable y respetuoso con el medio ambiente para analizar irgarol-1051 y diurón en muestras ambientales de agua.

Finalmente, esta nueva metodología ha sido aplicada para evaluar muestras de agua en diferentes puertos o marinas de la región de Valencia. Los resultados mostraron que el irgarol-1051 y el diurón se encontraban por debajo de los LD y, por esta razón, las muestras de agua analizadas cumplen con la regulación europea.

4.3. Determinación de meropenem en muestras biológicas (secreciones mucosas) mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida capilar (IT-SPME-CapLC-DAD)

El uso de dispositivos invasivos, como los tubos endotraqueales (TE), es una fuente de infecciones debido a la colonización de estos instrumentos por diversos tipos de microorganismos [319]. La superficie de estos dispositivos actúa como un soporte que permite la adhesión de microorganismos, formando comunidades multicelulares de bacterias incrustadas en una matriz extracelular que las protege (biofilm) [320,321].

Aunque la estructura y funciones del biofilm dependen del tipo de microorganismo, muchos autores coinciden en que pueden diferenciarse cinco etapas en su formación [319,322–324]:

- I. Transporte y adhesión de los microbios
- II. Adhesión irreversible
- III. Formación de la microcolonia
- IV. Maduración del biofilm
- V. Dispersión de las células

En una primera etapa, las bacterias son transportadas y adheridas a la superficie mediante una interacción débil e irreversible. En este estadio, los microorganismos todavía son susceptibles al ataque de los antibióticos [324]. A continuación, se produce la adhesión irreversible mediante una matriz extracelular que mantiene a las células unidas. En la tercera fase, se produce el crecimiento de la microcolonia mediante la unión de otros microorganismos y la división de aquellos que ya forman parte de él. En la cuarta etapa, el biofilm, ya maduro, contiene cavidades que le sirven de canales de transporte de agua y de células libres a través de la microcolonia, proporcionando un ambiente óptimo para la absorción de nutrientes y la eliminación de desechos [322]. En esta etapa se produce la máxima resistencia contra los antibióticos [324]. Finalmente, se produce la expansión de la

infección mediante la colonización de otras zonas por los organismos del biofilm (Figura 30).

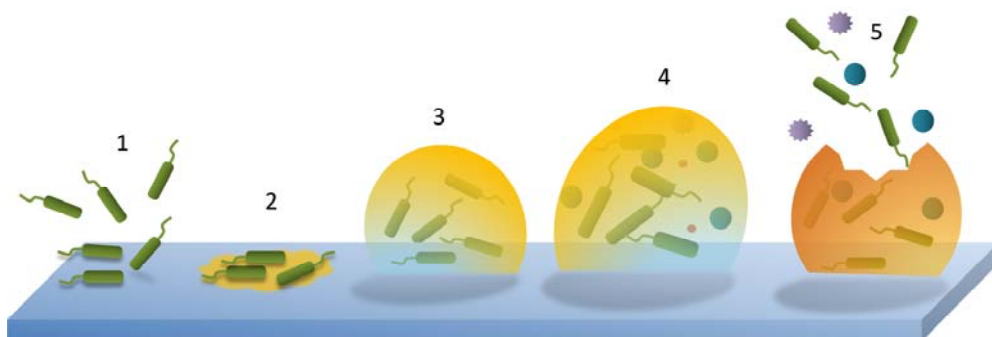


Figura 30: Proceso de formación de un biofilm. 1: Transporte y adhesión, 2: Adhesión irreversible, 3: Formación de la microcolonia, 4: Maduración del biofilm, 5: Dispersión de las células.

La formación de un biofilm en un dispositivo médico es una situación preocupante debido a que, una vez colonizado, la infección resulta muy difícil de tratar y, en muchos casos, se recomienda la extracción del dispositivo. Sin embargo, en algunas situaciones, esto no es posible, por lo que se hace necesario el tratamiento con antibióticos.

El meropenem es un antibiótico de amplio espectro de la familia de los β -lactámicos, perteneciente al subgrupo de las carbapenemas. Este tipo de antibióticos se usan, frecuentemente, como último recurso para el tratamiento de infecciones graves o para combatir bacterias resistentes a otros medicamentos [280,292].

La eficacia farmacológica de estos antibióticos está determinada por la concentración inhibitoria mínima (CIM), entendiéndose como tal el nivel más bajo de antibiótico necesario para inhibir el crecimiento de las bacterias [283–286]. Este parámetro depende del tipo de patógeno que se desee tratar. Como ejemplo, la CIM₉₀ del meropenem establecida para la *Pravotella corpis*, el *Peptostreptococcus anaerobius* o el *Bacteroides distasonis* es de 0.06, 2 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente [325]. Así, para asegurar un tratamiento eficaz, es

necesario que la concentración del medicamento se encuentre por encima de la CIM. Por ello, resulta necesario disponer de métodos analíticos capaces de cuantificar estos compuestos en fluidos biológicos con el fin de poder verificar si éstos se encuentran en la concentración recomendada para el correcto tratamiento de la infección.

En este contexto, el objetivo de este trabajo reside en proponer una metodología para el análisis de meropenem en muestras biológicas, consistente en IT-SPME acoplada a un sistema de CapLC, con detección de DAD. Para este fin, el método propuesto ha sido optimizado y aplicado en la determinación de este antibiótico en muestras reales de TEs usados en pacientes de la unidad de cuidados intensivos que han sido tratados con este antibiótico.

4.3.1. Estudio de la etapa de preconcentración

Debido a que tanto la longitud de la columna capilar como el volumen de muestra procesado son parámetros que influyen en el resultado de la IT-SPME, se procedió a la optimización de estas variables.

En primer lugar se estudió la influencia de la longitud de la columna capilar. Para ello, segmentos de una columna capilar TRB-35 de diferente longitud (30, 40 y 60 cm) se usaron como bucle de inyección del sistema cromatográfico. Seguidamente, se inyectaron 500 μL de una disolución de meropenem (0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como era de esperar, la respuesta analítica se incrementó a medida que la longitud de la columna capilar fue mayor, puesto que había más cantidad de material adsorbente disponible para extraer los analitos. Sin embargo, debido a problemas de presión, las columnas de 40 y 60 cm se rompían continuamente, por lo que, finalmente, se decidió utilizar la columna de 30 cm.

A continuación, se analizó el efecto del volumen de muestra procesado, por lo que se inyectaron diferentes volúmenes (50 μL a 1000 μL) de una disolución de meropenem (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en el sistema IT-SPME-CapLC-DAD, obteniendo los resultados que se muestran en la **Figura 31**.

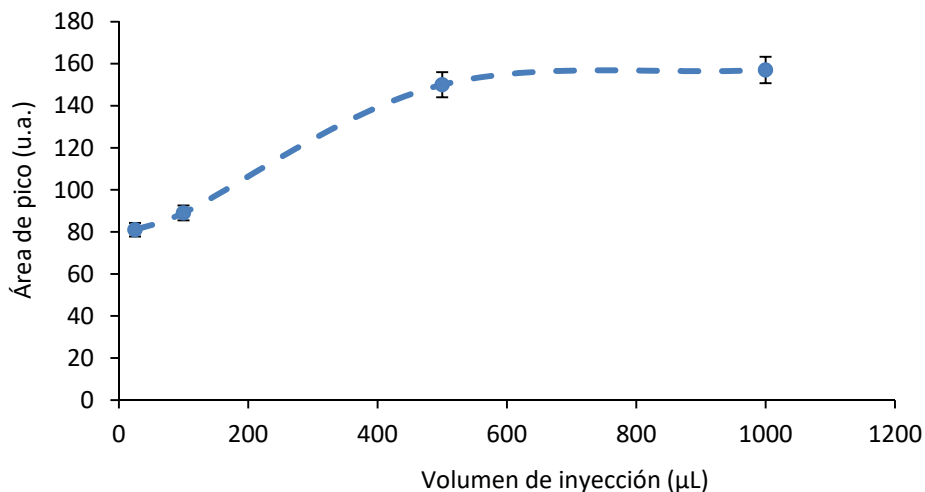


Figura 31. Respuesta analítica obtenida en función del volumen de muestra procesado.

Como puede observarse, se produce un enaltecimiento de la señal a medida que los volúmenes de muestra procesados son mayores. Sin embargo, la inyección de volúmenes superiores a los 500 μL no produjo un incremento en la señal analítica. Estos resultados están en concordancia con los fundamentos de la IT-SPME, puesto que esta técnica no es un método de extracción exhaustivo, por lo que no se produce una retención cuantitativa. Generalmente, cuando se aumenta el volumen de muestra procesado, se observa un incremento en la respuesta obtenida debido a que la cantidad de analito retenida en el recubrimiento es mayor. Sin embargo, cuando se alcanza la saturación de la fase adsorbente, la inyección de volúmenes mayores no mejora la respuesta obtenida. Por esta razón, el volumen de 500 μL fue seleccionado para llevar a cabo los experimentos.

4.3.2. Parámetros analíticos

La ecuación de la recta de calibrado, el rango lineal, LD, LQ y la precisión se muestran en la **Tabla 20**. Estos valores indican unos resultados satisfactorios en el rango lineal comprendido entre 0.01-1 $\mu\text{g/mL}$. El LD y LQ se determinaron

experimentalmente como la concentración de analito proporcionada por una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente, obteniendo valores de 0.003 µg/mL para LD y 0.01 µg/mL en el caso de LQ. La precisión también se evaluó mediante los valores de desviación estándar relativa intradía e interdía, siendo la primera 1.05% y la segunda 3.8% (n = 3).

Tabla 20. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de meropenem mediante IT-SPME-CapLC-DAD.

| Intervalo lineal (µg/mL) | Recta de calibrado | | R ² | LD (µg/mL) | LQ (µg/mL) | RSD% | |
|--------------------------|--------------------|-----------|----------------|------------|------------|----------------|----------------|
| | y= a + bx | | | | | Intradía (n=3) | Interdía (n=3) |
| | a | b (µg/mL) | | | | | |
| 0.01-1 | 23±6 | 1627±13 | 0.99 | 0.003 | 0.01 | 1.05 | 3.8 |

4.3.3. Análisis de los tubos endotraqueales

En primer lugar, se estudió la extracción del antibiótico adherido en TEs. Para ello, se cortó una zona de dos tubos endotraqueales: un TE que no había sido utilizado previamente (blanco) y otro que había sido usado en un paciente, al que no se había administrado meropenem. Cada segmento se fortificó añadiendo 20 µL de una disolución de meropenem 10 mg/L en la superficie del tubo. A continuación, la disolución se secó durante 1 hora a vacío. Una vez el disolvente se evaporó, cada pieza fortificada se introdujo en un vial con 2 mL de agua. Seguidamente, se testearon diferentes procedimientos de extracción con el fin de comprobar cuál proporcionaba mejores resultados. Dichos procedimientos de extracción fueron:

- Extracción directa (ED)
- Extracción asistida por ultrasonidos (EAU)
- Extracción asistida por vortex (EAV)

La extracción directa se llevó a cabo, simplemente, sumergiendo el TE en un volumen de agua (2 mL) durante 5 minutos.

Por otra parte, en la EAU, el vial se sometió a un baño de ultrasonidos durante 5 minutos. Finalmente, la EAV se llevó a cabo agitando el vial con vortex durante 30 segundos.

Seguidamente, las disoluciones se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos y el líquido sobrenadante se pasó a través de un filtro de membrana de nylon de 0.45 μm . Finalmente, 500 μL de la disolución fueron inyectados en el sistema IT-SPME-CapLC-DAD. Los porcentajes de recuperación obtenidos mediante las distintas metodologías fueron 92 ± 5 , 87 ± 4 y $92\pm 4\%$ para ED, EAU y EAV, respectivamente. Como puede observarse, las tres técnicas de extracción alcanzan valores muy similares de recuperación. Por lo tanto, se eligió la EAV para posteriores experimentos, puesto que el tiempo de extracción requerido era menor.

El procedimiento optimizado de EAV-IT-SPME-CapLC-DAD se aplicó al análisis de muestras de ETTs utilizados en pacientes reales que habían sido tratados con meropenem (Ver Capítulo III, sección 3.4.3.). La **Figura 32** ofrece una representación esquemática de los diferentes pasos seguidos para llevar a cabo los análisis.

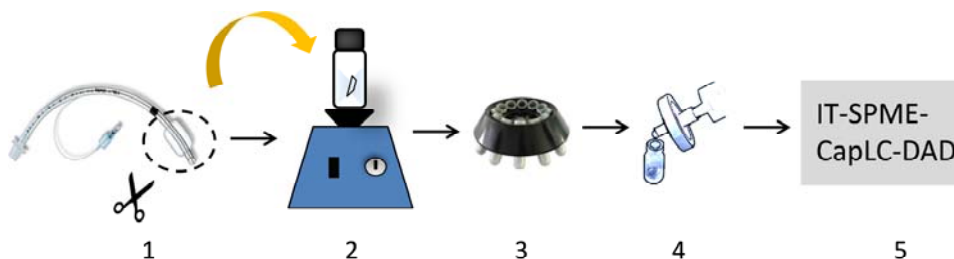


Figura 32. Representación esquemática de las diferentes etapas implicadas en el análisis de los tubos endotraqueales. 1: Muestreo, 2: Extracción, 3: Centrifugación, 4: Filtrado, 5: Inyección en el sistema IT-SPME-CapLC-DAD.

En total se analizaron cinco muestras de ETTs usados en pacientes, en los que el meropenem se utilizó como terapia contra la infección causada por la formación del biofilm. La concentración de este carbapenema detectado en las muestras TE010, TE013 y TE024 fue 0.04, 0.03 and 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. Por otra

parte, la concentración de meropenem obtenida en las muestras TE008 y TE015 se situó por debajo del LD.

Tabla 21. Concentración de meropenem obtenida en los diferentes tubos endotraqueales analizados.

| Samples TEs | MER concentrations found $\mu\text{g/mL}$ |
|-------------|---|
| TE 008 | <LD |
| TE 010 | 0.04 |
| TE 013 | 0.03 |
| TE 015 | <LD |
| TE 024 | 0.08 |

En la **Figura 33** se muestran los cromatogramas obtenidos al procesar la muestra TE010 y una disolución patrón de meropenem.

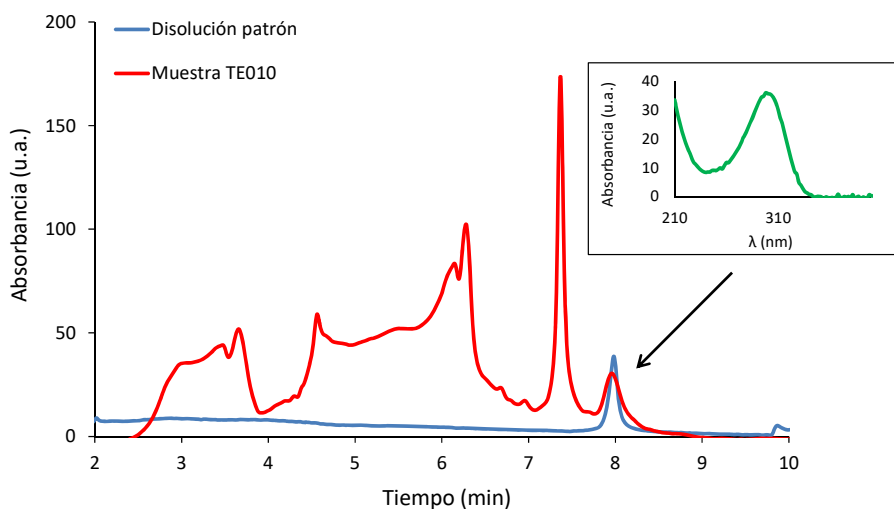


Figura 33. Cromatogramas obtenidos para la muestra TE010 y una disolución patrón de meropenem. En el recuadro se muestra el espectro UV del meropenem.

Finalmente, para evaluar la exactitud del método, las muestras fueron fortificadas con 2 mg/L de meropenem y se analizaron mediante IT-SPME-CapLC-DAD, obteniéndose recuperaciones del $95 \pm 12\%$.

4.3.4. Comparación con otros métodos

Como puede apreciarse en la **Tabla 10** (Capítulo I, sección 1.4.6.), la inmensa mayoría de los métodos descritos en la bibliografía para la determinación de antibióticos están basados en el uso de HPLC, aunque también se han propuesto ensayos microbiológicos o determinaciones espectrofotométricas.

Los LDs alcanzados mediante el método propuesto son del mismo orden que los obtenidos por los procedimientos utilizados en otras publicaciones. Sin embargo, la metodología desarrollada en este trabajo permite extraer, preconcentrar y analizar el analito en una sola etapa, reduciendo el tiempo de análisis y minimizando la manipulación de la muestra.

4.3.5. Conclusiones

La cuantificación de la concentración de antibiótico en dispositivos médicos invasivos puede proporcionar información sobre la capacidad del medicamento para penetrar en el biofilm y, por consiguiente, la eficacia proporcionada para el tratamiento de la infección.

En este trabajo, se ha propuesto una nueva metodología para la determinación de la concentración de meropenem en TEs procedentes de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos a los que se les había tratado con este antibiótico. Para ello, se ha utilizado la técnica de IT-SPME acoplada a CapLC para el análisis de muestras reales. Esta nueva metodología ha demostrado ser efectiva para la extracción y preconcentración del meropenem en las muestras analizadas, obteniendo resultados con precisión y exactitud adecuados.

4.4. Desarrollo de un sensor óptico basado en papel para la determinación *in situ* de sulfuro de hidrógeno en muestras ambientales

La generación de sulfuro de hidrógeno se produce de manera natural por la descomposición anaerobia de materia orgánica. No obstante, esta sustancia resulta particularmente peligrosa para los trabajadores de plantas extractivas de petróleo y refinerías, tratamiento de aguas residuales, vertederos, así como para los granjeros que trabajen cerca de pozos de estiércol [78]. Es importante resaltar que, puesto que es más pesado que el aire, puede acumularse en espacios confinados [326,327]. En la **Tabla 22** se describen los efectos que este compuesto puede ocasionar sobre la salud, dependiendo de la concentración en la que se encuentre.

Tabla 22. Efectos sobre la salud causados por la exposición a diferentes concentraciones de sulfuro de hidrógeno.

| Concentración (mL/m ³) | Efectos sobre la salud |
|------------------------------------|--|
| 0.008-0.2 | Umbral respiratorio |
| 20 | Tolerancia durante algunas horas sin daño |
| 20-50 | Irritación ocular |
| 50 | La exposición prolongada puede causar faringitis o bronquitis |
| 60 | La exposición prolongada puede causar conjuntivitis y dolor de ojos |
| >150 | Irritación del tracto respiratorio superior y sensación de pérdida de olfato |
| 250 | Edema pulmonar con riesgo de muerte |
| 1000-2000 | Respiración agitada, angustia, náusea y vómito. Puede ser seguido de pérdida de conciencia, coma y paro respiratorio |
| >2000 | Pérdida inmediata de conciencia y probabilidad de muerte |

Dada la peligrosidad de este gas, distintos organismos han propuesto valores límite de referencia para que los trabajadores puedan desarrollar su actividad sin sufrir por ello consecuencias adversas en su salud (**Tabla 23**).

Tabla 23. Valores límite para el sulfuro de hidrógeno propuestos por distintas organizaciones.

| Organización | TLV-TWA | TLV-STEL | REL | IDLH | Ref. |
|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------|-----------------------|-------|
| OSHA | | | | | |
| - Construcción | 10 mL/m ³ | --- | --- | --- | [328] |
| - Sector marítimo | 10 mL/m ³ | --- | --- | --- | [329] |
| - Industria general | * | * | --- | --- | [330] |
| ACGIH | 1 mL/m ³ | 5 mL/m ³ | --- | --- | |
| NIOSH | --- | --- | 10 mL/m ³ (10 min) | 100 mL/m ³ | [331] |
| INSHT | 5 mL/m ³ | 10 mL/m ³ | --- | --- | [332] |

*La exposición no debe exceder los 20 mL/m³ (techo) con la siguiente excepción: si no se produce otro tipo de exposición durante la jornada de trabajo de 8 horas, la exposición puede superar las 20 ppm, no debiendo superar los 50 mL/m³ (pico), para un periodo de hasta 10 minutos.

Por todo lo comentado anteriormente, es necesario disponer de dispositivos capaces de detectar el sulfuro de hidrógeno, tanto en aire como en agua, con el fin de asegurar que su concentración se encuentre por debajo de los límites establecidos.

El objetivo del presente trabajo consiste en desarrollar un sensor colorimétrico que combine las ventajas de los sensores basados en papel y las de los dispositivos móviles, con el fin de desarrollar un método analítico capaz de determinar sulfuro de hidrógeno en muestras ambientales. Para ello, la formación de azul de metileno ha sido elegida como reacción colorimétrica, puesto que es una reacción ampliamente utilizada para la determinación de sulfuro en agua [226,333]. La formación del azul de metileno, propuesto por Fischer en 1886, implica la reacción del sulfuro con N,N-Dimetil-p-fenilendiamina (DmPD), en presencia de iones Fe⁺³, dando lugar a un característico color azul con un máximo de absorbancia a 670 nm y un coeficiente de absortividad molar $\epsilon=71090 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ [223] (**Figura 34**).

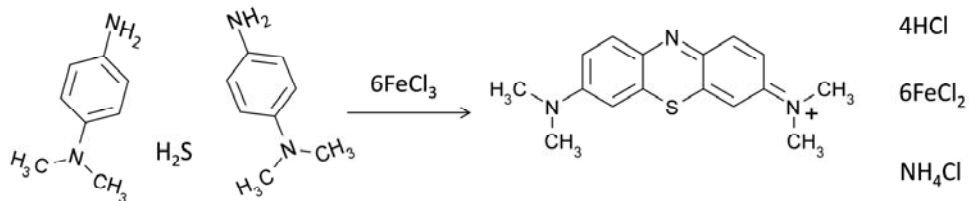


Figura 34. Reacción entre el sulfuro de hidrógeno, N,N-dimetil-p-fenilendiamina y Fe (III) para formar el azul de metileno.

Por otra parte, como alternativa al espectrofotómetro, la cuantificación del analito se ha realizado mediante un editor de imágenes, minimizando, de este modo, los costes derivados de la adquisición de instrumentación sofisticada y permitiendo el análisis *in situ*. Estas características convierten a este sensor en una herramienta potente para monitorizar el sulfuro de hidrógeno, tanto en agua como en aire (**Figura 35**).

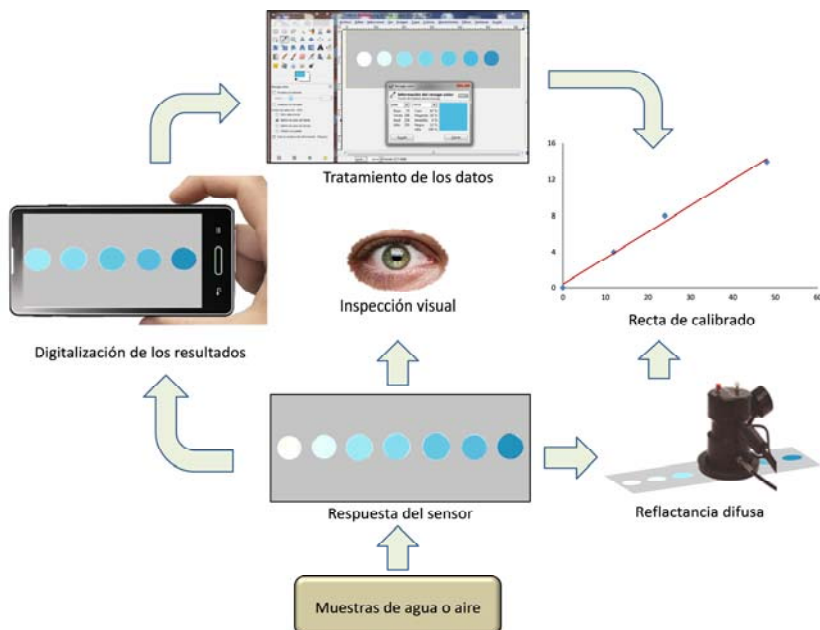


Figura 35. Esquema del método propuesto para la determinación de sulfuro de hidrógeno y ácido sulfhídrico.

4.4.1. Estudio de la inmovilización de los reactivos en el soporte de papel

Como se ha descrito anteriormente, el sulfuro de hidrógeno reacciona con N,N-dimetil-p-fenilendiamina, en presencia de iones Fe^{+3} , para dar lugar a la formación del azul de metileno, que tiene un máximo de absorbancia a 670 nm. En este trabajo se pretendió inmovilizar estos reactivos en un soporte para que la reacción tuviera lugar en él.

En primer lugar, se estudió la inmovilización de los reactivos en diferentes soportes (fibra de cuarzo y celulosa), observándose que, usando la misma forma y tamaño, la sensibilidad que ofrecía la celulosa era mayor que la conseguida por la fibra de cuarzo. Además, el papel ofrecía una resistencia mecánica mayor, por lo que este soporte se seleccionó para inmovilizar los reactivos.

También se ensayaron distintas formas y tamaños, manteniendo constante la concentración de sulfuro de hidrógeno y el tiempo de exposición. Los resultados indicaron que la respuesta del sensor era independiente de estos parámetros, de modo que se optó por un disco de papel de diámetro 1.3 cm, por su adaptación al portafiltros Swinnex (Merk Millipore, Alemania) para el muestreo activo (**Figura 36**).



Figura 36. Portafiltros utilizado para inmovilizar el soporte de celulosa.

Una vez seleccionado el material y tamaño del sensor, se realizaron ensayos para la determinación de sulfuro de hidrógeno en aire mediante muestreo activo y pasivo (Ver Capítulo III, sección 3.3.3.2.). Cabe decir que, transcurrido el tiempo de exposición y formación del producto de reacción, antes de analizar la intensidad del azul de metileno se incluyó una etapa de lavado para eliminar el exceso de reactivo. Así, lavando el sensor con 5 mL de agua, se eliminó la interferencia

debida al exceso de reactivo. En la **Figura 37** se muestra el aspecto del sensor en las diferentes etapas del muestreo.

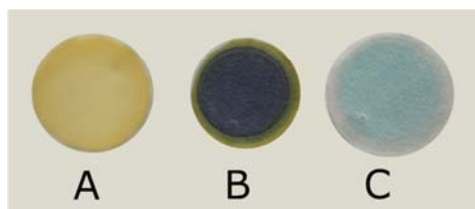


Figura 37. Aspecto del sensor en las diferentes etapas del proceso: (A) reactivos inmovilizados, (B) después de ser expuesto a H_2S , (C) después del lavado.

En el muestreo activo, el sensor no cambió de color cuando el papel se impregnaba solamente con FeCl_3 y DmPD. Este comportamiento podría explicarse porque el sensor, al hacer pasar una corriente de aire a través de él, se secaba en exceso y la reacción no se producía. Así, se decidió introducir glicerol en la composición del sensor. En general, los humectantes como el glicerol facilitan las reacciones gas/sólido incrementando la cantidad de moléculas de agua. Las moléculas de agua pueden mediar en la reacción, favoreciendo la incorporación de moléculas de gas en el soporte sólido [77]. En este trabajo, se estudió el efecto de la cantidad de glicerol en la superficie del papel en un rango que varió desde 0 a 100 μL . La presencia de glicerol favoreció la reacción en el sensor. Sin embargo, no se observaron mejoras incrementando la cantidad de humectante. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cantidad seleccionada para los experimentos fue de 10 μL . Además, se observó que el glicerol contribuía a una distribución más homogénea del reactivo en la superficie del papel; por consiguiente, el color obtenido después de la reacción era más homogéneo.

Aunque el color del sensor cambió de amarillo a azul cuando se produjo la reacción como consecuencia de la formación del azul de metileno, previamente al lavado se observó un color intermedio que se relacionó con la presencia de humedad (**Figura 37**). La humedad presente en la atmósfera afecta al reactivo, modificando el color original del sensor. Para estudiar la influencia de la humedad relativa en la eficiencia de la detección de sulfuro de hidrógeno, se llevó a cabo un análisis pasivo en atmósferas con una concentración de 24 mL/m^3 de sulfuro de hidrógeno con diferentes porcentajes de humedad (desde 60 a 90%). Aunque la

presencia de agua modificaba el color original del sensor, la respuesta final del reactivo (color azul) no se vio afectado por este parámetro, obteniendo un valor de RSD (%) del 4%.

4.4.2. Obtención de la señal analítica

La respuesta del sensor se analizó mediante dos procedimientos diferentes. En primer lugar, se registró el espectro UV-vis de los sensores mediante reflectancia difusa, analizando la variación de la señal a 670 nm. En segundo lugar, como alternativa al espectrofotómetro, se cuantificó la intensidad del color mediante el empleo del modelo de color CMYK, estudiando el valor de la coordenada cian.

Tal y como se ha comentado anteriormente, en el análisis mediante modelos de color, la obtención de la imagen digital es una etapa crítica, puesto que requiere una serie de precauciones que deben tenerse en cuenta para obtener resultados reproducibles. Para ello, se obtuvieron fotografías de los sensores bajo diferentes condiciones de iluminación: (i) luz natural, (ii) luz interior (fluorescente) y (iii) el flash de la cámara del teléfono. Como era de esperar, tal y como afirmaron Chaplan y col. [164], el valor de la coordenada cian fue diferente para cada una de las condiciones ambientales ensayadas, por lo que se decidió obtener las fotografías en condiciones de iluminación controladas. Por lo tanto, el teléfono se depositó en un soporte y las fotografías se captaron a una distancia de 25 cm, siempre con las mismas condiciones de luz.

Por otra parte, con el propósito de comprobar si existían diferencias entre distintos dispositivos, se digitalizaron los sensores utilizando diferentes cámaras de fotos, pero manteniendo las condiciones ambientales constantes (distancia e iluminación). En este caso, los resultados obtenidos fueron similares, con una RSD (%) de 8.

A la vista de los resultados, puede concluirse que la iluminación es un factor determinante a tener en cuenta cuando se desee digitalizar imágenes con el fin de analizarlas mediante modelos de color.

4.4.3. Aplicabilidad del sensor

El método propuesto se utilizó para analizar la concentración de ácido sulfhídrico en agua y sulfuro de hidrógeno en aire. Dependiendo de la matriz, se optimizaron diferentes variables.

4.4.3.1. Análisis de agua

Cuando los sensores se usaron en muestras de agua, el color se formó de manera instantánea, indicando que la reacción colorimétrica es muy rápida. En la **Figura 38** se muestran los sensores después de ser expuestos a disoluciones con distinta concentración de ácido sulfhídrico.

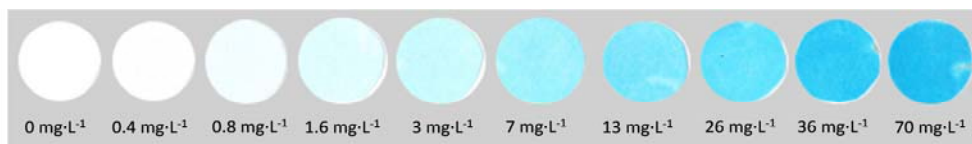


Figura 38. Coloración presentada por los sensores después de ser expuestos a diferentes concentraciones S^{2-} en agua.

En la **Figura 39** se muestran los registros de absorbancia obtenidos mediante reflectancia difusa, correspondientes al azul de metileno formado en los sensores en presencia de distintas concentraciones de sulfhídrico en agua.

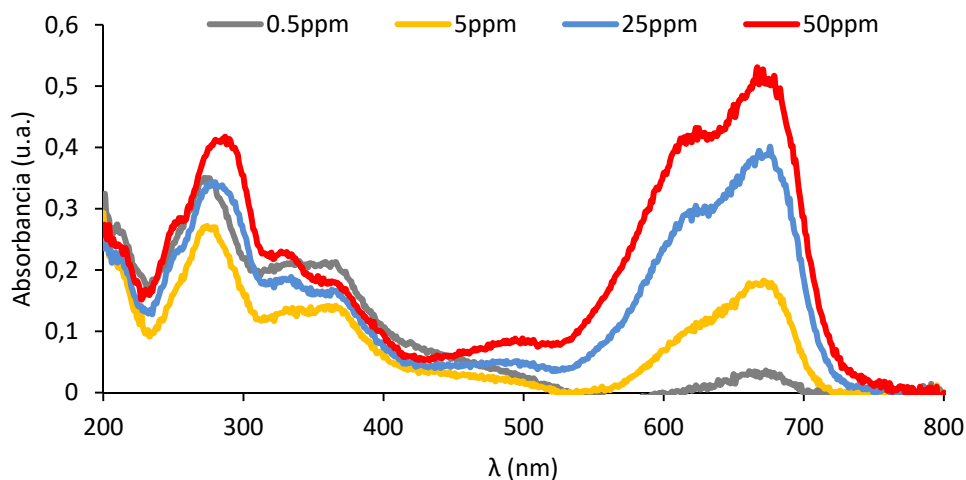


Figura 39. Espectros de reflectancia difusa obtenidos después de exponer los sensores a diferentes concentraciones de sulfhídrico en agua.

4.4.3.2. Análisis de aire (muestreo pasivo)

En este tipo de muestreo, los gases y vapores son captados por el sensor a través de un proceso de difusión, por lo que el tiempo de exposición es un parámetro decisivo que debe ser optimizado. Así, con el propósito de seleccionar el tiempo de muestreo más adecuado, los sensores se introdujeron en botellas de dilución estática de 2 L, donde se generó una atmósfera de 24 ppm_v de H₂S, y se dejaron reaccionar durante diferentes tiempos (de 5 a 60 min) (Ver Capítulo III, sección 3.3.3.2.). Tal y como era de esperar, la respuesta del sensor aumentó a medida que lo hizo el tiempo de exposición, alcanzando un máximo a los 30 minutos (**Figura 40**). A tiempos de exposición mayores, se observó una saturación de la señal, por lo que el tiempo seleccionado para llevar a cabo los análisis fue de 30 minutos.

4.4.3.3. Análisis de aire (muestreo activo)

El muestreo activo implica el uso de una bomba que fuerce el paso de aire a través del sensor, por lo que el tiempo de muestreo y el flujo de aire son parámetros importantes que deben ser evaluados con el fin de obtener una respuesta adecuada. Así, se estudió la influencia de ambas variables para una concentración de 24 ppm_v de H₂S, utilizando el montaje descrito en el Capítulo III, sección 3.3.3.2.

En primer lugar, se estudió la influencia del caudal utilizando flujos comprendidos entre 30 y 500 mL/min durante un período constante de 30 minutos. Los resultados obtenidos mostraron que, para flujos altos, la señal analítica del sensor fue muy pequeña, como consecuencia de que el analito no era retenido por el papel. En este caso, la mayoría del H₂S fue captado por la disolución reactiva (DmPD y Fe⁺³ en medio ácido) contenida en el borboteador, produciéndose un cambio de color.

A flujos pequeños también se detectó una respuesta baja del sensor, debido, en este caso, a la pequeña cantidad de sulfuro que quedó retenido en el sensor durante este intervalo de tiempo. Por esta razón, para el resto de experiencias, se estableció un flujo de 100 mL/min por ser el más adecuado en tiempo y respuesta.

En segundo lugar, una vez seleccionado el caudal, se estudió la respuesta del sensor a diferentes tiempos de muestreo, manteniendo el caudal constante (100 mL/min). Como puede verse en la **Figura 40**, la señal analítica aumentaba cuando lo hacía el tiempo de muestreo hasta alcanzar una meseta en torno a los 30 minutos. Debido a que el muestreo durante tiempos superiores no supuso una mejora sustancial de la señal, se seleccionó un tiempo de muestreo de 30 minutos para llevar a cabo los análisis.

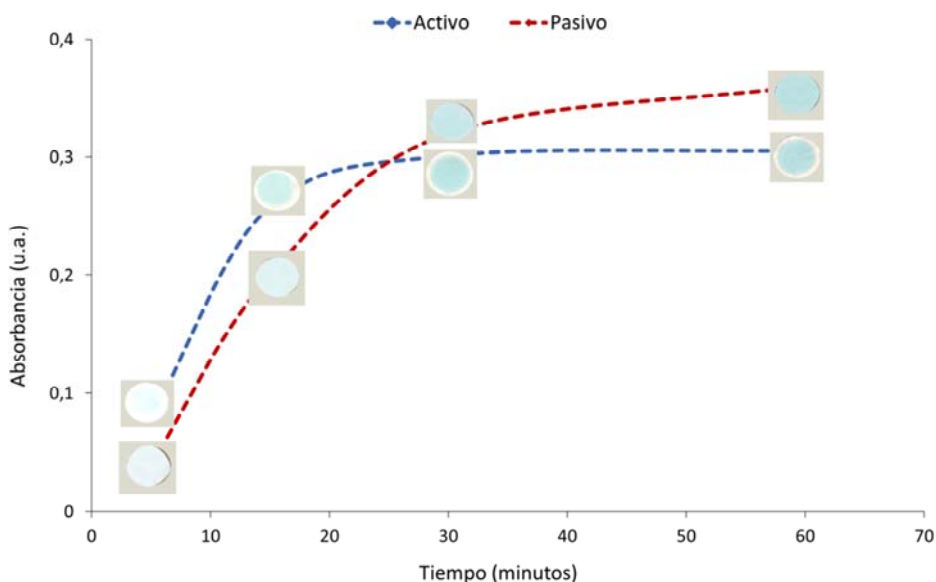


Figura 40. Variación de la respuesta analítica obtenida en función del tiempo de muestreo.

4.4.4. Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos (rango lineal, sensibilidad y precisión) se muestran en la **Tabla 24**. Éstos se calcularon para la respuesta del sensor bajo diferentes configuraciones mediante dos métodos diferentes: reflectancia difusa y el editor de imágenes GIMP.

En primer lugar, se obtuvieron las rectas de calibrado mediante reflectancia difusa representando la absorbancia a 670 nm frente a la concentración de H_2S . Los valores obtenidos indicaban que este método es lineal en el intervalo comprendido entre 3 y 50 ppm_v en el muestreo de aire activo y pasivo. Cuando la reacción transcurrió en disolución, el rango lineal se situó entre 1.2 y 6 mg/L.

Por otra parte, se estudió la precisión del método mediante el cálculo de la RSD (%). El valor de la RSD (%) intradía se evaluó para una concentración de 24 ppm_v en aire y 6 mg/L en disolución, siendo 4 y 5 para el muestreo pasivo y activo,

respectivamente, y 4 para disolución. La RSD (%) interdía se obtuvo comparando la respuesta de tres sensores preparados en tres días diferentes bajo las mismas condiciones, al mismo nivel de concentración que en el estudio intradía. En este caso, La RSD (%) interdía fue de 9 para el muestreo pasivo, 10 para el activo y 8 para disolución. Los valores de RSD (%) obtenidos indican que el sensor propuesto en este trabajo es un dispositivo reproducible.

Finalmente, el LD se calculó como 3·SD/sensibilidad, siendo SD la desviación estándar relativa de 10 blancos, obteniendo valores de 1.11 y 1.12 ppm_v para muestreo activo y pasivo, respectivamente, y 0.5 mg/L en disolución.

Tabla 24. Parámetros analíticos obtenidos mediante reflectancia difusa.

| | Linealidad (y=a+bx) (ppm)* | | | Intervalo lineal (ppm) | Precisión RSD (%) | | LD (ppm) |
|------------------|-------------------------------|------------------|----------------|------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------|
| | a±s _a | b±s _b | R ² | | Intradía (n=3) ¹ | Interdía (n=3) ¹ | |
| Dis | 0.018±0.008 | 0.051±0.004 | 0.99 | 1.2-6 | 4 | 8 | 0.5 |
| A _{act} | 0.07±0.01 | 0.0061±0.0007 | 0.99 | 3-50 | 5 | 10 | 1.11 |
| A _{pas} | 0.077±0.009 | 0.0053±0.0004 | 0.99 | 3-50 | 4 | 9 | 1.12 |

*En disolución ppm hacen referencia a mg S²⁻/L, mientras que en aire ml H₂S/m³.

¹ Calculado a 6 mg S²⁻/L en disolución y 25 ml H₂S/m en aire.

Como alternativa al espectrofotómetro, el editor de imágenes GIMP se usó para realizar el análisis cuantitativo del H₂S mediante el modelo de color CMYK. En este caso, las rectas de calibrado se obtuvieron representando el valor de color cian frente a la concentración de analito. Los resultados indicaron que este método presentaba linealidad en el rango de concentraciones comprendido entre 1-7 mg/L para disolución y 5-50 ppm_v para el muestreo activo y pasivo en aire.

En lo referente a los LDs, el valor obtenido en el caso del muestreo activo y pasivo fue de 1.8 ppm_v, mientras que en el caso de la determinación en agua, éste fue de 0.6 mg/L. El valor de la RSD (%) intradía en disolución fue de 6, mientras que para el muestreo activo y pasivo se obtuvo un valor de 7. Además, los valores de precisión interdía fueron 10, 12 y 12 para disolución, muestreo activo y pasivo, respectivamente. Estos resultados aparecen recogidos en la **Tabla 25**.

Tabla 25. Parámetros analíticos obtenidos mediante CMYK.

| | Linealidad ($y=a+bx$) (ppm)* | | | Intervalo lineal (ppm) | Precisión RSD (%) | | LD (ppm) |
|------------------|-----------------------------------|-------------|-------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------|
| | $a\pm s_a$ | $b\pm s_b$ | R^2 | | Intradía ($n=3$) ¹ | Interdía ($n=3$) ¹ | |
| Dis | 0.1±0.9 | 5.4±0.3 | 0.99 | 1-7 | 6 | 10 | 0.6 |
| A _{act} | 0.4±0.5 | 0.29±0.02 | 0.99 | 5-50 | 7 | 12 | 1.8 |
| A _{pas} | 0.5±0.7 | 0.300±0.016 | 0.99 | 5-50 | 7 | 12 | 1.8 |

*En disolución ppm hacen referencia a mg S²⁻/L, mientras que en aire ml H₂S/m³
 1 Calculado a 6 mg S²⁻/L en disolución y 25 ml H₂S/m³ en aire

4.4.5. Estudio de posibles interferentes

La selectividad es un parámetro importante en el campo analítico. Por ello, con el fin de estudiar el posible efecto de sustancias interferentes, se generaron atmósferas de diferentes tipos de compuestos volátiles: acetona (7.90 mg/m³), amil mercaptano (179.68 mg/m³), ácido propanoico (9.90 mg/m³), benzaldehído (10.05 mg/m³), etanol (8.00 mg/m³), propanol (7.90 mg/m³), tolueno (8.70 mg/m³) y 1-pentanotiol (13.12 mg/m³).

El mismo estudio se llevó a cabo en agua con diferentes compuestos: EDTA (80 mg/L), Al⁺³ (22 mg/L), Ca⁺² (113 mg/L), CO₃²⁻ (169 mg/L), K⁺ (344 mg/L), Na⁺ (52 mg/L), NO₃⁻ (485 mg/L), PO₄³⁻ (121 mg/L), SO₄²⁻ (413 mg/L), NH₄⁺ (135 mg/L).

Los resultados obtenidos en aire y en agua indicaron que ninguna de las sustancias ensayadas interfería en la respuesta del sensor.

4.4.6. Análisis de muestras de agua

Con el fin de demostrar la aplicabilidad del dispositivo desarrollado en entornos reales, se procedió a determinar la concentración de sulfhídrico en agua. Para ello se seleccionaron muestras de aguas residuales procedentes de tres zonas diferentes de una EDAR: entrada, decantación y salida. Los procedimientos de

muestreo y análisis de las muestras se encuentran descritos en el Capítulo III, secciones 3.4.1. y 3.3.3.2., respectivamente.

Los resultados obtenidos para este compuesto en agua se muestran en la **Tabla 26**. Tal y como se puede comprobar, la concentración de sulfuro encontrada en el agua de las zonas de “decantación” y “salida” fue menor que el LD. No ocurrió lo mismo en la zona de “entrada”, cuya concentración se estableció en 1.23 ± 0.05 mg/L (reflectancia difusa) y 1.0 ± 0.4 mg/L (GIMP).

Seguidamente, para calcular la exactitud del método, las muestras de agua se fortificaron con 6 mg/L de sulfhídrico, siendo los porcentajes de recuperación de 101, 105 y 97 (usando reflectancia difusa) y 105, 98 y 98 (mediante GIMP) para la zona de entrada, decantación y salida, respectivamente (**Tabla 26**).

Tabla 26. Concentraciones de S^{2-} obtenidas en diferentes zonas de EDAR.

| Zona | | Añadido (mg $S^{2-} \cdot L^{-1}$) | Obtenido (mg $S^{2-} \cdot L^{-1}$) | Recuperación (%) | |
|---------|---------------------|--|---|---------------------|-----|
| Entrada | Reflectancia difusa | 0 | 1.23 ± 0.05 | --- | |
| | | 6 | 7.3 ± 0.3 | 101 | |
| | CMYK | 0 | 1.0 ± 0.4 | --- | |
| | | 6 | 7.6 ± 0.7 | 105 | |
| | Decantación | Reflectancia difusa | 0 | <LD | --- |
| | | | 6 | 6.3 ± 0.4 | 105 |
| CMYK | | 0 | <LD | --- | |
| | | 6 | 5.9 ± 0.5 | 98 | |
| Salida | | Reflectancia difusa | 0 | <LD | --- |
| | | | 6 | 5.8 ± 0.5 | 97 |
| | CMYK | 0 | <LD | --- | |
| | | 6 | 5.9 ± 0.5 | 98 | |

Estos resultados demostraron que este sensor puede ser usado para el análisis de sulfuro en muestras reales, evitando el problema del pretratamiento de las muestras, puesto que la turbidez no afecta en la aplicación de este método.

4.4.7. Análisis de muestras de aire

Por otra parte, el sensor también se aplicó para la determinación de la concentración de sulfuro de hidrógeno en atmósferas reales. Como en el caso anterior, se seleccionaron diferentes zonas de una EDAR para llevar a cabo una serie de muestreos pasivos, en los que el sensor se dejó suspendido durante 30 minutos. Las zonas seleccionadas fueron: decantador, tanque de homogeneización, desbaste, digestor y rebosador. Al mismo tiempo, se usaron tubos colorimétricos para la detección de H₂S 0.5/a (Dräger, Alemania) para contrastar la respuesta obtenida por el sensor con la lectura proporcionada por éstos últimos. Los resultados obtenidos se recogen en la **Tabla 27**.

La concentración señalada por los tubos colorimétricos fue menor que el LD en todas las zonas excepto en el rebosador, donde aparecieron saturados (>15 ml/m³).

Los mismos resultados se obtuvieron utilizando el muestreo pasivo con el método propuesto: en todas las zonas la concentración fue inferior al LD, excepto en la zona de rebosado, cuya concentración se estableció 25±4 y 28±4 mL/m³, para reflectancia difusa y GIMP, respectivamente.

Tabla 27. Concentraciones de sulfuro de hidrógeno obtenidas en diferentes zonas de una EDAR. 1: decantador, 2: tanque de homogeneización, 3: desbaste, 4: rebosador, 5: digestor.

| Método | Zona | | | | | |
|--------------------|---------------------|-----|-----|------------------------|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| Tubo colorimétrico | <LD | <LD | <LD | >15 mL·m ⁻³ | <LD | |
| Muestreo pasivo | Reflectancia difusa | <LD | <LD | <LD | 25±4 | <LD |
| | CMYK | <LD | <LD | <LD | 28±4 | <LD |

Como se ha podido comprobar, el método propuesto proporcionó resultados acordes a los obtenidos mediante el uso de tubos colorimétricos, demostrando su capacidad para convertirse en un método de detección de sulfuro de hidrógeno simple, portátil y económico.

4.4.8. Comparación con otros métodos

Los sensores propuestos en la **Tabla 7** (Capítulo I, sección 1.4.3.) para determinar H₂S son, básicamente, de tipo eléctrico y óptico (fluorescentes y colorimétricos). En el primer caso, se utilizan óxidos metálicos capaces de producir una repuesta eléctrica cuando el analito se encuentra presente. En el segundo caso, se han utilizado distintos reactivos (orgánicos e inorgánicos) que, en presencia de H₂S, producen una señal de tipo óptico. Este tipo de sensores ofrece la ventaja de no requerir instrumentación sofisticada para interpretar la señal analítica, puesto que puede realizarse un análisis cualitativo o semicuantitativo mediante simple inspección visual. No obstante, en el caso de necesitar datos cuantitativos, generalmente, estos métodos hacen uso de equipos convencionales.

El método propuesto, además de reunir las ventajas de los métodos colorimétricos comentadas anteriormente, ofrece la posibilidad de realizar análisis cuantitativos sin la necesidad de disponer de un espectrofotómetro, ya que se ha propuesto la

cuantificación de H_2S mediante el uso del modelo de color CMYK. Además, es importante destacar que la metodología propuesta en este trabajo es económica (utiliza papel como soporte), y simple (elimina la necesidad de manipular los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción debido a que están inmovilizados en el soporte).

4.4. Conclusiones

En el presente estudio se ha desarrollado un método simple para preparar un sensor colorimétrico para la detección de sulfuro en diferentes matrices ambientales (agua y aire). Para ello, se han inmovilizado los reactivos DmPD y Fe^{+3} en un soporte de papel que, en presencia de H_2S , da lugar a la formación del azul de metileno.

La determinación de H_2S mediante el método propuesto puede ser semicuantitativa o cuantitativa. El análisis semicuantitativo puede realizarse mediante inspección visual y comparación con una carta de colores, mientras que el análisis cuantitativo puede ser llevado a cabo mediante el uso de la técnica de reflectancia difusa y mediante el editor de imágenes gratuito GIMP, sin la necesidad de instrumentación sofisticada.

Finalmente, el método ha sido validado y aplicado a muestras reales, obteniéndose resultados satisfactorios. Este sensor ofrece numerosas ventajas, como son la simplicidad, rapidez, bajo coste, portabilidad y la posibilidad de realizar análisis *in situ*, así como una alta sensibilidad para la determinación de sulfuro en agua y aire.

4.5. Biosensor colorimétrico para la determinación de peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno está involucrado en gran cantidad de procesos medioambientales y biológicos por tratarse de un subproducto generado en distintas reacciones enzimáticas [243]. Además, el H_2O_2 está considerado como un marcador de estrés oxidativo, parámetro asociado con diversas enfermedades, incluyendo cáncer, aterosclerosis, párkinson, alzhéimer, o neurodegeneración [243].

Actualmente, debido a su carácter oxidante, el H_2O_2 se usa comúnmente como antiséptico en diferentes preparados farmacéuticos. Además, también está presente en muchos productos blanqueantes como sustituto del cloro o en productos decolorantes del cabello.

En consecuencia, debido a la gran variedad de productos y procesos en los que está presente el H_2O_2 , resulta necesario disponer de métodos analíticos capaces de determinar esta sustancia de una manera rápida y simple.

El objetivo de este trabajo reside en el desarrollo de un biosensor basado en la integración de todos los reactivos en una misma matriz, con el fin de obtener un film con la enzima y el sustrato inmovilizados en el mismo soporte. Para ello, la peroxidasa del rábano (HRP, del inglés *Horseradish peroxidase*), y la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) han sido inmovilizados en un soporte de PDMS-TEOS- SiO_2NP_5 . De esta manera, cuando el biosensor se introduce en una disolución que contiene H_2O_2 , los reactivos difunden hacia la disolución, produciéndose la reacción colorimétrica catalizada por la HPR (**Figura 41**).

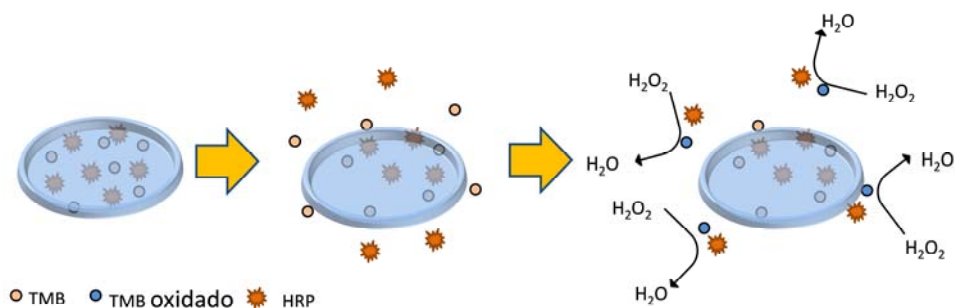


Figura 41. Mecanismo de acción del sensor propuesto.

El film ha sido usado para desarrollar sensores capaces de determinar peróxido de hidrógeno en distintas muestras, produciendo un color azul que puede ser medido espectrofotométricamente o por inspección visual.

4.5.1. Estudio de la reacción de derivatización

La enzima HRP cataliza la oxidación del TMB por el H_2O_2 , produciendo la formación de un complejo de transferencia de carga de color azul con un máximo en 653 nm. Por otra parte, acidificando el medio, la reacción se detiene, dando lugar a la formación de un producto de color amarillo correspondiente a la formación de la diimina, que absorbe a una longitud de onda de 450 nm (**Figura 42**).

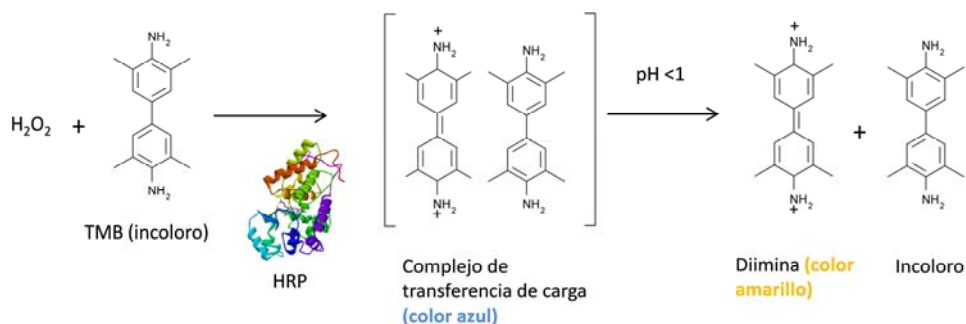


Figura 42. Reacción de oxidación del TMB con el peróxido de hidrógeno, catalizada por la HRP.

Ambos productos, el azul y el amarillo, pueden utilizarse para la cuantificación del analito. Sin embargo, cabe destacar que la diimina tiene una sensibilidad mayor que el producto de transferencia de carga. Tal y como puede apreciarse en la **Figura 43**, para una misma concentración, la sensibilidad es mayor a 450 nm que a 653 nm.

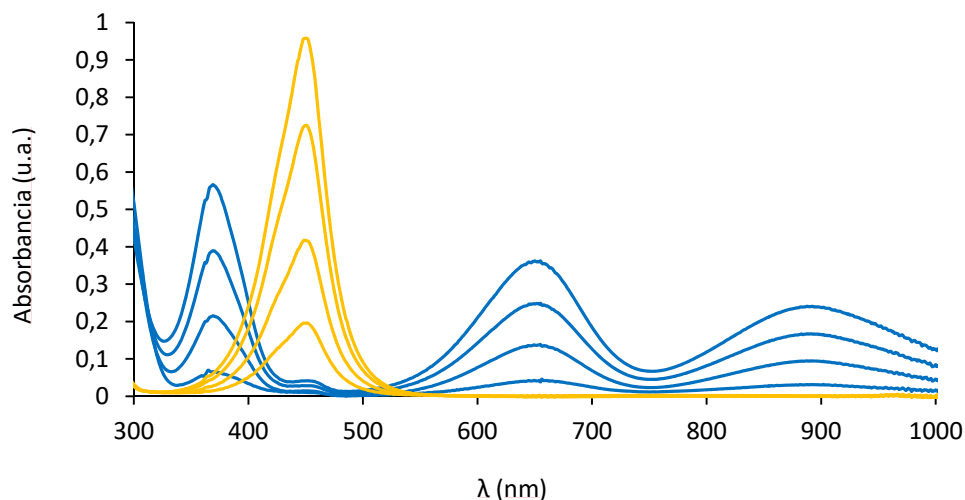


Figura 43. Espectros UV-vis obtenidos en el rango de 5-50 μM , transcurridos 15 minutos desde la adición del sensor. En color azul se representa el producto de oxidación del TMB ($\lambda=653$ nm) a pH 5.0; El color amarillo después de detener la reacción mediante la adición de H_2SO_4 ($\lambda=450$ nm) a pH 1.0.

Por lo tanto, en el caso en que se desee alcanzar LDs más bajos o se necesite una sensibilidad mayor, puede acidificarse el medio para obtener el producto de reacción amarillo. La **Figura 44** muestra los diferentes colores que puede presentar el TMB.

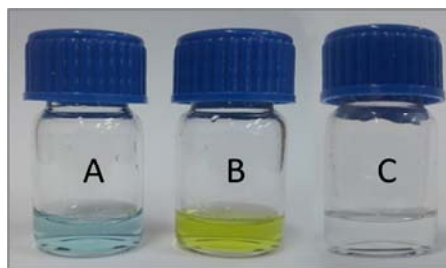


Figura 44. Fotografías de los colores obtenidos como consecuencia de la oxidación del TMB. A: color azul ($\lambda=653$ nm), B: color amarillo ($\lambda=450$ nm) y C: blanco.

4.5.2. Estudio de la inmovilización del TMB

El PDMS es un polímero hidrofóbico que puede ser combinado con alcóxidos metálicos como el trietoximetilsilano o el tetraetil ortosilicato (TEOS), pudiendo ser usado como soporte para la inmovilización de diferentes reactivos. En este sentido, el grupo de investigación MINTOTA ha desarrollado distintos soportes basados en la combinación de PDMS/TEOS y ha observado que, dependiendo de la composición de la matriz, las condiciones experimentales y las características de los analitos/reactivos, el comportamiento es distinto. Principalmente, se han observado dos modos de acción:

- i) El reactivo difunde a la solución bajo las condiciones óptimas y la reacción de derivatización se lleva a cabo con la presencia del analitos [83].
- ii) El analito difunde dentro de la matriz y la reacción se produce en su interior [86].

Por ello, en este trabajo, en primer lugar, con el fin de estudiar el comportamiento del TMB al ser inmovilizado en una matriz polimérica, éste se atrapó en una matriz de PMDS y se añadió a una disolución con HRP y H_2O_2 para completar la reacción. Los resultados obtenidos mostraron que, en este caso, la reacción se produjo mediante la primera modalidad (i.e. el reactivo difundió a la disolución).

Seguidamente, para comprobar la influencia de la matriz a la hora de facilitar la difusión del TMB hacia la disolución, la reacción de derivatización se llevó a cabo, por una parte, utilizando todos los reactivos en disolución y, por otra parte, con el TMB atrapado en soportes de PDMS con diferentes composiciones (100% PDMS y 50% PDMS:50% TEOS), registrándose la absorbancia a 653 nm a intervalos de 5 minutos durante un periodo de 55 minutos (**Figura 45**).

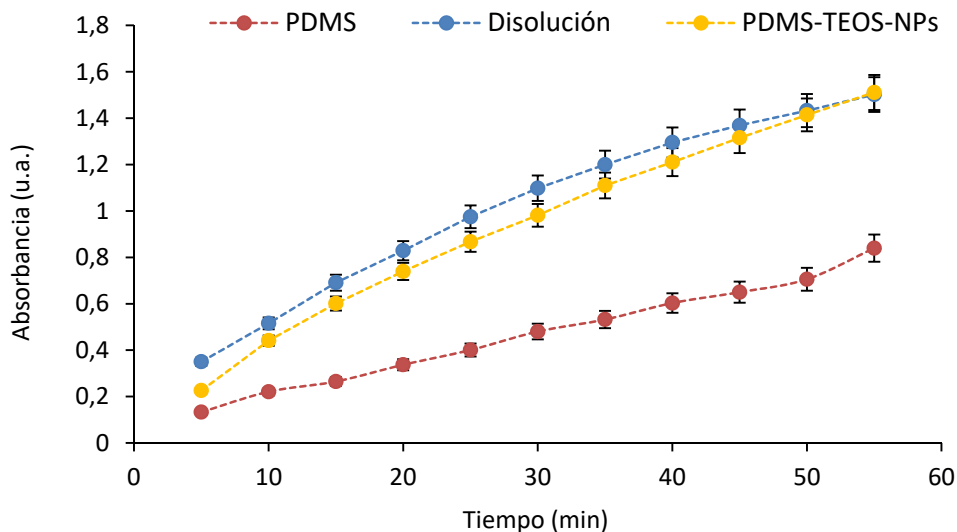


Figura 45. Curva cinética de la oxidación del TMB en diferentes condiciones a) Todos los reactivos en disolución b) TMB atrapado en PDMS c) TMB atrapado en PDMS-TEOS-SiO₂NPs. Absorbancia registrada a 653 nm. Condiciones: H₂O₂: 0.18mM, HRP: 18 ng/mL, TMB: 0.2 mg/sensor (atrapado) y 0.06 mg/mL (en disolución).

Como puede verse en la **Figura 45**, la absorbancia obtenida usando el TMB atrapado en una matriz 100% de PDMS fue menor que la obtenida usando el método de derivatización directamente en disolución. Por otra parte, en el soporte compuesto por PDMS-TEOS-SiO₂NPs, el TEOS modificó la estructura del polímero, imprimiéndole cierta hidrofiliidad pero manteniendo el carácter inerte y la estabilidad del PDMS. Además, el TEOS permitió una mejor mezcla de la fase orgánica e inorgánica, dando lugar a una dispersión homogénea. Sin embargo, la adición de este compuesto dificultó el proceso de gelificación del polímero, por lo que fue necesaria la adición de NPs de SiO₂ para mejorar la resistencia del soporte

y evitar su rotura. En estas condiciones, la cantidad de reactivo que difundió a la disolución fue mayor que la conseguida con la matriz compuesta únicamente por PDMS, por lo que los valores de absorbancia fueron similares a los obtenidos cuando todos los reactivos fueron añadidos en disolución.

Estos estudios sugirieron que la presencia de TEOS favorece la difusión de los reactivos hacia la disolución debido a las propiedades que éste le confiere a la membrana. Por lo tanto, se puede concluir que el TMB puede ser atrapado satisfactoriamente en la matriz de PDMS-TEOS-NPs y, en las condiciones de reacción adecuadas, difundir a la solución para oxidarse en presencia de un oxidante como el H_2O_2 .

A continuación, se calculó la cantidad de TMB que difundía de la matriz a la disolución usando una recta de calibrado obtenida con todos los reactivos en disolución (manteniendo la cantidad de HRP y H_2O_2 constante y variando la concentración de TMB). De esta manera, la interpolación de los valores de absorbancia obtenidos al añadir un sensor con el TMB atrapado permitió calcular la concentración de TMB presente en la disolución. Los resultados obtenidos indican que la cantidad de TMB que difunde a la disolución fue alrededor del 10% del total atrapado en la matriz polimérica.

4.5.3. Inmovilización de la enzima HRP en un soporte de PDMS-TEOS-SiO₂NPs

La inmovilización de la enzima en el soporte se realizó mediante dos procedimientos diferentes: adsorción física y atrapamiento (Ver Capítulo III, sección 3.3.3.1.).

En este punto cabe destacar que el proceso de oxidación del TMB presenta diferentes coloraciones dependiendo del tiempo y el estado de oxidación. El producto azul se obtiene como consecuencia de la pérdida de un electrón por parte del TMB, mientras que el amarillo se debe a la pérdida de un segundo electrón [334]. En determinadas ocasiones, puede aparecer un color verde como una mezcla del azul y el amarillo. De acuerdo con esto, la cantidad de HRP

requerida en los diferentes tipos de ensayos llevados a cabo se optimizó para obtener el producto de reacción azul.

4.5.3.1. Estudio de la inmovilización de la HRP mediante adsorción

Con el objetivo de estudiar el proceso de inmovilización de la HRP en el soporte mediante el método de adsorción física, las membranas de PDMS-TEOS se incubaron durante 1 hora en 200 μL de distintas disoluciones con distintas concentraciones de HRP (1 - 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Seguidamente, con el fin de calcular la cantidad de HRP adsorbida en cada caso, se construyó una recta de calibrado añadiendo todos los reactivos en disolución (manteniendo constante la concentración de TMB y H_2O_2 , modificando la de HRP). A continuación, se realizó la misma reacción, aunque, en este caso, la HRP en disolución se sustituyó por los sensores con la HRP adsorbida. Finalmente, la absorbancia obtenida mediante los sensores de HRP se interpoló en la recta de calibrado con el fin de conocer la cantidad de HRP presente en la disolución y, por consiguiente, adsorbida en el soporte. Los resultados obtenidos mostraron que los valores de absorbancia obtenidos en los diferentes sensores crecían a medida que lo hacía la concentración de la disolución incubadora, por lo que se concluyó que la cantidad de HRP adsorbida en el soporte aumentaba a medida que lo hacía la concentración de HRP en la disolución de incubación.

Posteriormente, se representó la isoterma C_s frente a C_m , donde C_s hace referencia a la cantidad de enzima adsorbido y C_m es la concentración de enzima en la disolución en equilibrio con el adsorbente, observándose un comportamiento lineal. Por consiguiente, para trabajar bajo condiciones similares a las establecidas en disolución, se seleccionó una solución de 0.03 mg/mL de HRP (para incubación).

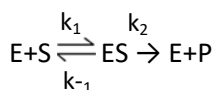
4.5.3.2. Estudio de la inmovilización de la HRP mediante atrapamiento

A continuación, se estudió el proceso de inmovilización de la HRP mediante atrapamiento en la matriz polimérica. Para ello, se sintetizaron membranas con

cantidades de HRP atrapado comprendidas entre $2.5 \cdot 10^{-5}$ y $3.5 \cdot 10^{-2}$ g HRP/sensor. Seguidamente, se construyó una recta de calibrado con todos los reactivos en disolución (manteniendo la concentración de H_2O_2 y TMB constante y variando la de HRP) para poder calcular la concentración de HRP que es capaz de difundir a la disolución. Posteriormente, se realizó la misma reacción, aunque, en este caso, la HRP en disolución se sustituyó por los sensores con la HRP atrapada. Finalmente, la absorbancia obtenida mediante los sensores de HRP, se interpoló en la recta de calibrado para obtener el valor de la concentración de HRP en la disolución. Los resultados mostraron que la cantidad de HRP que difundía hacia la disolución era del 10%. Por ello, con el fin de obtener respuestas analíticas similares a las conseguidas utilizando todos los reactivos en disolución, se seleccionó una cantidad de 0.001 mg HRP/sensor.

4.5.4. Estudio cinético

El estudio cinético de la HRP es esencial para comprender las características enzimáticas. En 1913, Leonor Michaelis y Maude Menten desarrollaron un modelo para describir la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas basado en dos etapas [335]: en primer lugar, la enzima (E) y el sustrato (S), se unen en un paso rápido y reversible para formar un complejo enzima-sustrato (ES) que, en un segundo paso, evoluciona a la formación del producto.



Así, para una misma concentración de enzima, la velocidad de la reacción aumenta de manera lineal a medida que lo hace la cantidad de S. No obstante, a partir de cierta concentración de S, la tasa de formación de producto deja de ser lineal, acercándose asintóticamente al valor de velocidad máxima (V_{max}). En este momento, todos los sitios activos de la enzima están ocupados por el sustrato (**Figura 46**).

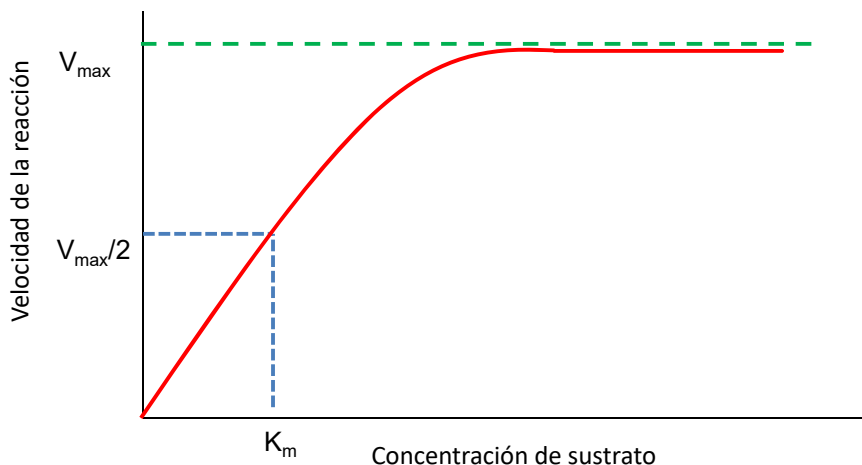


Figura 46. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato.

La concentración de S para la cual la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max} recibe el nombre de constante de Michaelis-Menten (K_M). Éste es un parámetro importante en cinética enzimática, puesto que cada enzima tiene un valor de K_M específico para un determinado sustrato, el cual aporta información acerca de cómo de afín es la unión entre el sustrato y la enzima (cuanto menor sea el valor de K_M , mayor será la afinidad entre E y S).

La variación de la velocidad de la reacción en función de la concentración de sustrato está descrita a través de la ecuación propuesta por Michaelis y Menten:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Sin embargo, como se aprecia en la **Figura 46**, la representación de esta ecuación no es lineal, lo que dificulta el cálculo de los parámetros cinéticos. Para solventar este problema, Hans Lineweaver y Dean Burk aplicaron un método de dobles inversos con el objetivo de linealizar la expresión anterior obtenida por Michaelis y Menten [336]:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

En el caso que nos atañe, los experimentos cinéticos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un volumen de reacción de 1 mL de tampón HAc/NaAc (0.1 M pH 5) y en presencia de una cantidad fija de HRP (0.02 µg/mL). El H₂O₂ y el TMB se usaron como sustratos, manteniendo constante la concentración de uno de ellos. Las medidas cinéticas se obtuvieron a 653 nm durante 50 minutos. Seguidamente, los datos de absorbancia se convirtieron en la correspondiente concentración usando el término $\epsilon=39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (a 653 nm) para la forma oxidada del producto TMB.

Tal y como se aprecia en la **Figura 47**, bajo un cierto rango de concentraciones del sustrato, las gráficas de velocidad en función de la concentración de TMB o H₂O₂ mostraron un comportamiento típico de Michaelis-Menten. Finalmente, el valor de K_M se calculó empleando la representación gráfica de Lineweaver-Burk.

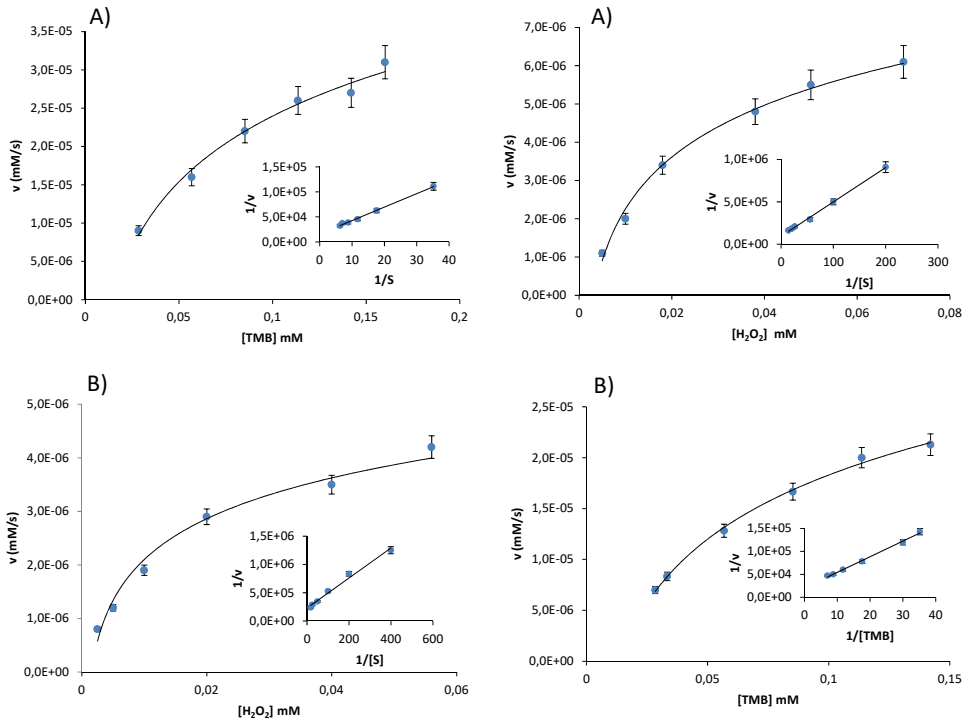


Figura 47. Ensayo cinético de los diferentes tipos de biosensores desarrollados. A) HRP atrapado, B) HRP adsorbido. Condiciones: la concentración de TMB se fijó en 0.05 mg/ml, mientras que la de H₂O₂ varió; la concentración de H₂O₂ se mantuvo en 0.3 mg/ml y la de TMB se modificó. Los recuadros representan los gráficos de Lineweaver-Burk.

Analizando los resultados recogidos en la **Tabla 28** se observa que los valores aparentes de la constante K_M obtenidos para la enzima HRP libre son similares, siendo ligeramente diferentes cuando el TMB estaba atrapado. Una explicación para este fenómeno puede ser que la cantidad de reactivo en la disolución es menor que el considerado. Valores similares de K_M fueron obtenidos cuando la HRP fue inmovilizada, y no se observaron diferencias significativas entre la adsorción y el atrapamiento. La K_M obtenida para el co-atrapamiento del TMB y la HRP fue ligeramente superior a la obtenida sin esta co-inmovilización. Este efecto puede estar relacionado con el hecho de que ambos reactivos están atrapados. La

V_{\max} se alcanza cuando todos los sitios activos del enzima están saturados con el sustrato. Los valores de este parámetro fueron similares en todos los casos.

Tabla 28. Parámetros cinéticos relativos a la actividad de la HRP en diferentes configuraciones.

| Catalizador | K_m (mM) | | v_{\max} ($\mu\text{M/s}$) | |
|-------------|--------------------|------------------------|--------------------------------|------------------------|
| | TMB | H_2O_2 | TMB | H_2O_2 |
| HRP | 0.11 _a | 0.068 _a | 0.015 _a | 0.0084 _a |
| | 0.247 _b | 0.10 _b | 0.019 _b | 0.012 _b |
| | 0.15 _c | 0.017 _c | 0.057 _c | 0.0045 _c |
| | 0.13 _d | 0.023 _d | 0.04 _d | 0.0077 _d |
| | 0.16 _e | 0.016 _e | 0.004 _e | 0.005 _e |
| | 0.77 _f | 0.033 _f | 0.02 _f | 0.0092 _f |

a: Todos los reactivos en disolución

b: TMB atrapado, H_2O_2 and HRP en disolución

c: TMB y H_2O_2 en disolución, HRP atrapado

d: TMB y H_2O_2 en disolución, HRP adsorbido

e: TMB atrapado, H_2O_2 en disolución, HRP adsorbido

f: TMB atrapado, H_2O_2 en disolución, HRP atrapado

4.5.5. Parámetros analíticos

Las rectas de calibrado para la determinación de H_2O_2 se establecieron para las diferentes configuraciones (solución, compuestos con el TMB inmovilizado y biocompuestos con el HRP adsorbido o atrapado). Además, se evaluaron parámetros como el intervalo lineal, la sensibilidad, la precisión y la exactitud del método, tal y como se muestra en la **Tabla 29**. Los valores obtenidos indican que este procedimiento da resultados adecuados en el intervalo de concentraciones de 4.2-72 μM y 4.3-54 μM para la enzima adsorbida y atrapada, respectivamente. El LD se calculó como $3 \cdot \text{SD} / \text{sensibilidad}$, donde SD es la desviación estándar de la señal del blanco ($n=10$), siendo 1.3 μM en todos los casos.

Tabla 29. Parámetros analíticos obtenidos en las diferentes configuraciones ensayadas.

| HRP | Linealidad ($y=a+bx$) (mM) | | | Intervalo lineal (μ M) | Precisión RSD (%) | | LD (μ M) |
|------------|---------------------------------|---------------|-------|--------------------------------|----------------------|--------------------|------------------|
| | $a \pm s_a$ | $b \pm s_b$ | R^2 | | Intradía (n=3) | Interdía (n=3)* | |
| Adsorbido | 0.012 \pm 0.008 | 6.9 \pm 0.3 | 0.99 | 4.2-72 | 4 _a | 5 _a | 1.3 |
| Atrapado | 0.025 \pm 0.003 | 4.7 \pm 0.1 | 0.99 | 4.3-54 | 5 _a | 7 _a | 1.3 |
| Disolución | 0.006 \pm 0.003 | 5.3 \pm 0.3 | 0.99 | 4.4-200 | 4 _b | 8 _b | 1.3 |

a: Calculada a 0.0363 mM

b: Calculada a 0.18 mM

*Diferentes lotes

Los parámetros analíticos de los biosensores fueron comparados con los obtenidos para la reacción en disolución. Como puede verse en la **Tabla 29**, los parámetros analíticos obtenidos en las tres configuraciones fueron similares.

La precisión se evaluó mediante la obtención de la RSD (%) interdía e intradía, calculada usando sensores sintetizados en el mismo lote (misma síntesis). La RSD (%) intradía obtenida para el sensor adsorbido, atrapado y en disolución fue de 4, 5 y 4, respectivamente. Por otra parte, la RSD (%) interdía fue de 7 para el sensor adsorbido, 8 para el atrapado y 8 en el caso de realizar la reacción en disolución. Además, se estudió la RSD (%) de biosensores procedentes de diferentes lotes, obteniendo unos valores de RSD (%) de 5, 7 para adsorbido y atrapado, respectivamente. Estos resultados indican valores de precisión satisfactorios.

Además, en el caso de que se necesiten LDs menores, la sensibilidad puede mejorarse acidificando la disolución. Bajo estas condiciones, la cinética de la reacción se detiene y aparece el producto amarillo del TMB, alcanzando un LD de 0.4 μ M. El TMB, en presencia de H₂O₂ (tiempo de reacción de 15 minutos) a pH 5, presenta un espectro UV-vis con un máximo de absorbancia en 653 nm, mientras que la misma disolución acidificada a pH 1 presenta un máximo a 450 nm (**Figura 43**). El máximo de absorbancia a 650 nm corresponde al complejo de transferencia de carga, mientras que el de 450 nm corresponde a la diimina. Como puede observarse, la sensibilidad a 450 nm es mayor que la conseguida a 653 nm.

4.5.6. Estudio de posibles interferencias

Bajo las condiciones seleccionadas, se examinó el efecto que tenían diferentes especies en la respuesta del sensor: ácido cítrico (572 mg/L), ácido ascórbico 485 (mg/L), alcohol isopropílico (800 mg/L), glucosa (950 mg/L), EDTA (95 mg/L), Mn^{+2} (22mg/L), Ca^{+2} (127 mg/L), CO_3^{2-} (184mg/L), K^+ (454 mg/L), Na^+ (72 mg/L), NO_3^- (575 mg/L) y SO_4^{2-} (473 mg/L). Los resultados obtenidos indicaron que estas sustancias no interferían en la respuesta del sensor.

4.5.7. Determinación de H_2O_2 en muestras reales

La aplicabilidad del biosensor se evaluó analizando diferentes muestras reales de productos industriales que contenían este compuesto en su formulación: agua oxigenada 10 vol. 3% Kern Pharma (España), Emulsión estabilizadora Life Cream Developer 20 vol. 6% Farmavita (Italia), Emulsión estabilizadora 9% Deliplus (España), Emulsión oxidante estabilizadora 1.5% Deliplus (España).

Para llevar a cabo el análisis, 100 μ L de muestras se diluyeron y se añadieron a 1 mL de disolución tampón, de manera que la concentración final de H_2O_2 se encontrara dentro del rango lineal. La validación de la metodología se llevó a cabo comparando los resultados con los obtenidos usando el método convencional de derivatización. En la **Tabla 30** se muestra la concentración de peróxido de hidrógeno encontrada en estas muestras.

Tabla 30. Concentración de H_2O_2 obtenida en los distintos productos analizados mediante las diferentes conformaciones ensayadas.

| HRP | Disolución de peróxido de hidrógeno 3% (0.98M) | Emulsión oxidante estabilizada 6% (1.96M) | Emulsión reveladora 9% (2.94M) | Emulsión reveladora 1.5% (0.49M) |
|---------------|--|---|--------------------------------|----------------------------------|
| Adsorbido | 0.91±0.03 | 1.96±0.08 | 2.95±0.12 | 0.52±0.02 |
| Atrapado | 0.84±0.04 | 1.97±0.10 | 2.95±0.15 | 0.49±0.03 |
| En disolución | 0.92±0.04 | 1.90±0.07 | 2.94±0.12 | 0.50±0.02 |

En el análisis de la disolución de agua oxigenada al 3% no se observó efecto matriz y la concentración se calculó directamente interpolando en la recta de calibrado construida con los patrones. Sin embargo, la pendiente de la recta obtenida en las diferentes emulsiones oxidantes fue diferente de la que se obtuvo mediante patrones, por lo que el efecto matriz se hizo patente en este tipo de muestras. En estos casos, la concentración se calculó aplicando el método de adición estándar. En todos los casos, la concentración encontrada fue similar a la indicada en la etiqueta. El comportamiento de las diferentes emulsiones oxidantes fue similar, y las pendientes obtenidas para la enzima atrapada y adsorbida fue de $57\pm 3\%$ y $59\pm 9\%$ de la pendiente correspondiente a la recta de calibrado, respectivamente.

Finalmente, se aplicó el test ANOVA de un factor con un nivel de significación α del 95% a través del programa IBM SPSS Statistics v 22 para el análisis estadístico de los resultados. En todos los casos, el parámetro estadístico α fue mayor que 0.05 (0.073 para el agua oxigenada de 10 vol., 0.576 para la emulsión oxidante estabilizadora (6%), 0.994 para la emulsión oxidante estabilizadora (9%) y 0.355 para la emulsión oxidante estabilizadora (1.5%). Por esta razón, no se observaron diferencias significativas a un nivel de confianza del 95% entre los resultados obtenidos por los tres métodos, siendo éstos estadísticamente equivalentes.

4.5.8. Estabilidad del biosensor

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de fabricar un biosensor reside en su estabilidad, puesto que el transcurso del tiempo puede provocar una disminución o pérdida de sus propiedades iniciales. Así, para comprobar la estabilidad del sensor, se sintetizaron sensores de PDMS-TEOS-NPs-TMB-HRP(atrapado) y PDMS-TEOS-NPs-TMB-HRP(adsorbido) y se guardaron dentro de viales en el congelador. Posteriormente, cada cierto tiempo, se analizó la respuesta de los sensores frente a una disolución de H_2O_2 0.0363 mM. Los resultados demostraron que los sensores eran estables durante un período de 3 meses desde su fabricación. Después de este tiempo, el sensor retuvo una actividad superior al 90%.

4.5.9. Comparación con otros métodos

Como se ha podido observar en la **Tabla 8** (Capítulo I, sección 1.4.4.), la mayoría de los métodos propuestos para la determinación de H_2O_2 se basan en la reacción colorimétrica entre la HRP y un sustrato colorimétrico, aunque bien es cierto que, en los últimos años, se han desarrollado compuestos inorgánicos capaces de imitar la función de las enzimas.

No obstante, en los estudios propuestos en la bibliografía, las enzimas han sido inmovilizadas en un soporte, mientras que el sustrato se ha añadido a la disolución. En este sentido, en el presente trabajo se ha propuesto un dispositivo en el que se han inmovilizado conjuntamente la enzima y el sustrato, por lo que el proceso de determinación del H_2O_2 se simplifica enormemente. Además, los procedimientos desarrollados alcanzan LDs de detección similares a los alcanzados en este trabajo.

La fortaleza de este dispositivo se encuentra en parámetros como la portabilidad, instrumentación o el tiempo de análisis. Comparado con otros métodos ópticos como la luminiscencia, el método colorimétrico propuesto no necesita instrumentación para realizar un análisis semicuantitativo, puesto que éste puede ser llevado a cabo mediante inspección visual. Por otra parte, es importante destacar que la metodología propuesta es simple, económica y sostenible, además de eliminar la necesidad de manipular reactivos derivatizantes por estar inmovilizados en la matriz.

4.5.10. Conclusiones

En el presente estudio, se ha desarrollado un método simple para preparar un compuesto con diversos reactivos inmovilizados. El enzima HRP y el sustrato TMB han sido seleccionados como reactivos modelo (orgánicos y biológicos) para la inmovilización. La metodología propuesta ha sido aplicada para el atrapamiento del TMB o para la inmovilización de ambos reactivos (TMB y HRP) en el mismo soporte. Así, este biocompuesto es capaz de reemplazar el método tradicional de que implica la preparación de reactivos y su posterior derivatización en disolución.

Estos sensores han sido utilizados para la determinación de H_2O_2 en muestras reales. Los resultados han sido validados comparando el método propuesto con el convencional, en disolución. Este biosensor ofrece las ventajas de simplicidad, estabilidad, bajo coste, rapidez, portabilidad y el análisis *in situ*, así como una gran sensibilidad para determinar H_2O_2 .

Cabe resaltar que este sensor es un dispositivo versátil que permite la determinación directa de H_2O_2 , pero también es aplicable para determinar otros analitos que están involucrados en reacciones de generación de peróxido de hidrógeno. La oxidación de compuestos como la glucosa, alcohol, colesterol o triglicéridos por el enzima correspondiente (glucosa oxidasa, alcohol oxidasa, colesterol oxidasa o lipasa) genera H_2O_2 que puede ser determinado utilizando el método propuesto.

Así, dada la gran variedad de posibles combinaciones enzima/sustrato y la eficacia de la metodología, este trabajo representa un nuevo camino para producir biosensores con un gran potencial para la aplicación en campos como la biotecnología, biomedicina o del medio ambiente.

4.6. Desarrollo de un dispositivo colorimétrico adaptado a una microplaca dirigido a la determinación *in situ* de glucosa en diversas muestras de suero simultáneamente

La diabetes es una enfermedad crónica que se origina cuando el páncreas no produce suficiente insulina (diabetes tipo 1) o cuando el organismo no la puede utilizar con eficacia (diabetes tipo 2) [257,258]. Ambas variantes provocan que la concentración de glucosa en sangre esté descontrolada, pudiendo derivar en complicaciones cardiacas, pérdida de visión, daños neurológicos o accidentes cerebrovasculares [337]. Los valores de glucosa típicos para personas adultas sanas, en situación de pre-diabetes y con diabetes, medidos en ayunas (basal) y después de haber ingerido alimentos (posprandial), se reflejan en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Concentraciones de glucosa en sangre en personas sanas y con diabetes.

| | | Glucosa en sangre (mg/dL) |
|--------------|-------------|---------------------------|
| Sin diabetes | Basal | 65-100 |
| | Posprandial | <140 |
| Pre-diabetes | Basal | 100-125 |
| | Posprandial | 140-199 |
| Diabetes | Basal | >126 |
| | Posprandial | >200 |

Esta enfermedad representa un problema importante para la salud pública debido a que, en las últimas décadas, la prevalencia de la diabetes ha aumentado. Según estimaciones, 422 millones de personas adultas padecían de diabetes en 2014, frente a los 108 millones de 1980 [338]. Aunque en la actualidad no existe una cura para la diabetes, mantener los niveles de glucosa dentro del rango saludable es esencial para evitar complicaciones mayores [339].

Actualmente, los dispositivos portátiles de análisis *in situ* desarrollados para el análisis de glucosa están diseñados para realizar los análisis de manera individual, por lo que en el caso de que el número de muestras sea elevado, el proceso de

análisis puede ser costoso. Con el fin de dar solución a este problema, diversos autores han propuesto metodologías basadas en el uso de placas de pocillos para llevar a cabo diversos análisis de manera simultánea [171–175]. Sin embargo, los lectores de placas son equipos caros y no son portátiles, por lo que existe un creciente interés por desarrollar sistemas de lectura alternativos simples, portátiles y económicos [171,340]. Por otra parte, los métodos que requieren la adición sucesiva de reactivos son costosos en términos de tiempo, además de resultar incómodos debido a la necesidad de preparar los reactivos en el momento del análisis.

En este trabajo se ha desarrollado un biosensor integrado en una placa de 96 pocillos para el determinar la concentración de glucosa en diversas muestras de suero simultáneamente. Además, las lecturas de los análisis han sido obtenidas mediante un teléfono inteligente y un programa informático gratuito de análisis de imágenes, evitando la adquisición de instrumentos sofisticados. El biosensor se ha basado en la inmovilización los reactivos GOx, HRP y TMB en un soporte polimérico de PDMS-TEOS-SiO₂NP_s, evitando, de esta manera, la necesidad de adicionar los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción. Para ello, en primer lugar, se diseñó un prototipo capaz de realizar análisis de manera individual y, posteriormente, este sensor se integró en la placa de pocillos (**Figura 48**).

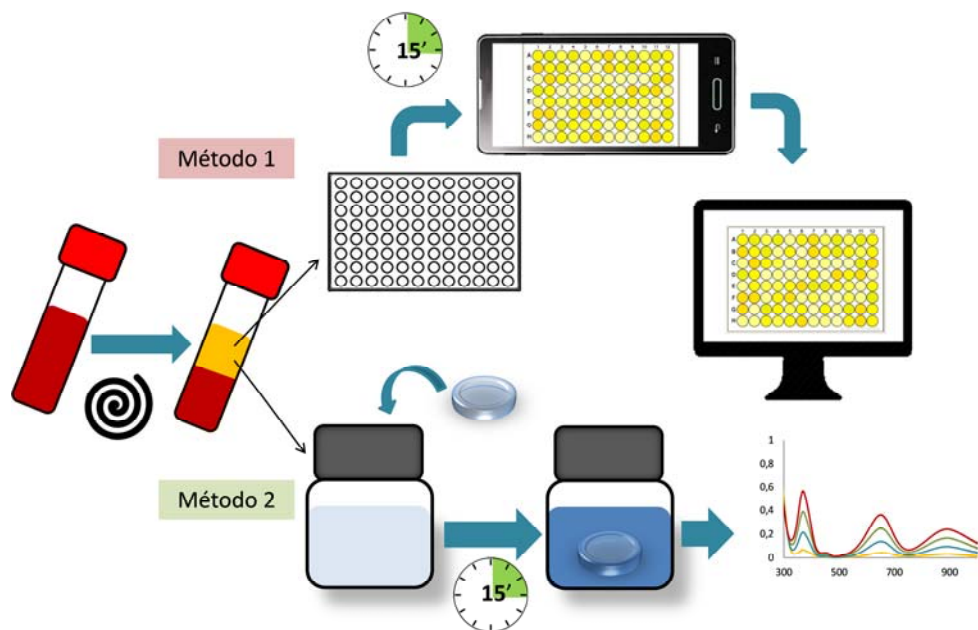


Figura 48. Representación esquemática de los métodos desarrollados para la determinación de glucosa.

4.6.1. Estudio de las condiciones de reacción

El biosensor propuesto para cuantificar la glucosa se ha basado en una reacción enzimática en cascada compuesta por dos etapas. En la primera reacción, la GOx cataliza la oxidación de la D-glucosa en ácido glucónico, obteniendo H_2O_2 como consecuencia de la reducción del O_2 . En la segunda etapa, se produce la oxidación del TMB por el H_2O_2 , catalizada por el HRP (**Figura 49**).

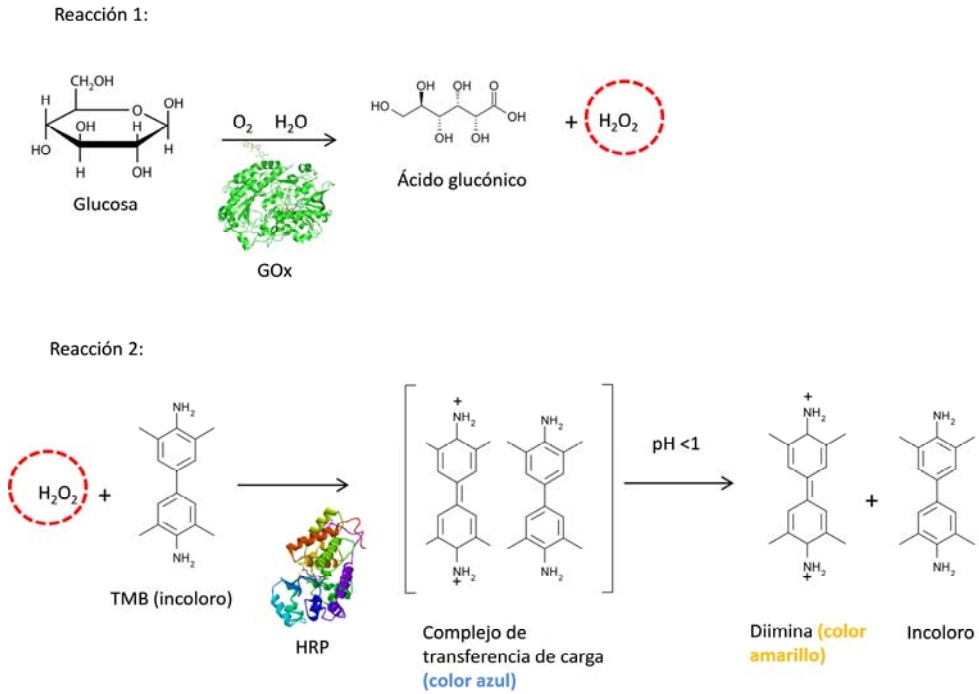


Figura 49. Reacción enzimática en cascada para la determinación de glucosa.

Cada una de estas enzimas presenta una actividad máxima bajo un rango específico de pH. Así, el pH óptimo para la GOx se sitúa en 5.5, aunque tiene un rango de actividad entre valores de pH 4-7 [182,341]. En el caso de la HRP, su valor óptimo de pH se sitúa en torno a 6.0-6.5 [342]. Por lo tanto, con el objetivo de determinar el pH óptimo para llevar a cabo la reacción, se prepararon cuatro disoluciones tampón (pH 5, 6, 7 y 8) y la derivatización se realizó en cada uno de estos medios. Como se observa en la **Figura 50**, para una misma concentración de glucosa (73 mg/L), la intensidad del color azul decrecía a medida que aumentaba el pH, obteniendo el mejor resultado con el tampón de pH 5, por lo que éste fue el medio utilizado para realizar los experimentos posteriores.

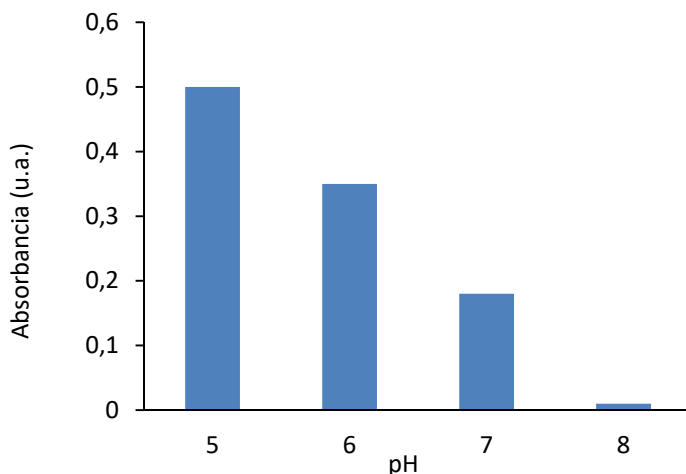


Figura 50. Influencia del pH en el valor de la respuesta analítica.

Por otra parte, el tiempo de reacción, contando a partir del momento en que la glucosa se añade a la disolución, afecta directamente a los valores de absorbancia obtenidos y, por consiguiente, tiene una influencia directa en la sensibilidad del método. En este sentido, se seleccionaron 15 minutos como el tiempo necesario para realizar los análisis, puesto que el LD obtenido era suficiente para cuantificar los niveles de glucosa en sangre.

De la misma manera, la reacción se desarrolló a temperatura ambiente, aunque, habitualmente, esta reacción se realiza a 37 °C [337]. Trabajando en estas condiciones, la concentración de glucosa en suero puede cuantificarse sin necesidad de calentar la disolución, haciendo que el método sea más simple.

4.6.2. Inmovilización de HRP y GOx en soportes de PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB

4.6.2.1. Soporte prototipo de PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx

Basándonos en los estudios previos de inmovilización de TMB y HRP en un soporte de PDMS-TEOS-SiO₂NPs [343], se procedió al estudio de la inmovilización de la GOx

en este mismo soporte. En este caso, se propusieron dos metodologías diferentes para la inmovilización de la GOx: adsorción y atrapamiento.

Inicialmente, la GOx se adsorbió en la superficie del sustrato, mientras que el TMB y la HRP se atraparon en la matriz. Para ello, se prepararon disoluciones de GOx comprendidas entre 0.5 y 3 mg/mL y distintas membranas de PDMS-TEOS-NPs-HRP-TMB se incubaron en estas disoluciones durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, para conocer la cantidad de GOx adsorbida en la superficie del sensor, se construyó una curva de calibrado manteniendo la concentración de glucosa, TMB y HRP constantes (inmovilizados en el soporte) y variando la concentración de GOx añadida en disolución. La respuesta de los sensores incubados con diferentes concentraciones de GOx (proceso de adsorción) se interpoló en la recta de calibrado, construida con la enzima en disolución, y se obtuvo que el porcentaje de GOx adsorbida fue del 3.0 ± 0.7 %.

A continuación, se estudió la relación existente entre la concentración de GOx en la disolución de incubación y la cantidad de GOx adsorbida en la superficie del sensor. Para ello, se construyó la isoterma $C_{s(\text{mg GOx}\cdot\text{g}^{-1}\text{ solido})}$ frente $C_{m(\text{mg/ml})}$, donde C_s representa la cantidad de enzima adsorbida, y C_m es la concentración de enzima en la disolución de incubación, siendo la ecuación resultante $C_{s(\text{mg GOx}\cdot\text{g}^{-1}\text{ solido})} = 0.1232 \cdot C_{m(\text{mg/ml})} + 0.1896$. Tal y como se puede observar, la cantidad de GOx adsorbida estaba relacionada de manera lineal con la concentración de GOx en la disolución de incubación. Por ello, para trabajar bajo condiciones similares a las utilizadas en disolución, la concentración de GOx en la disolución de incubación fue de 3.3 mg/mL de GOx.

Finalmente, la GOx se atrapó en el interior de la matriz junto con el HRP y el TMB, en concentraciones comprendidas entre 5 y 50 $\mu\text{g/sensor}$. Los mejores resultados se obtuvieron con la concentración de 50 $\mu\text{g/sensor}$ (7 unidades/sensor).

Se puede concluir que se han obtenido resultados satisfactorios con las diferentes estrategias de inmovilización de los tres reactivos (TMB, HRP y GOx). Sin embargo, aunque todos los procedimientos pueden ser utilizados, se decidió atrapar todos los reactivos en el interior de la matriz polimérica, por la simplicidad del

procedimiento, dado que solamente se necesita un paso para llevar a cabo la síntesis del biocompuesto.

4.6.2.2. Adaptación del biosensor a una placa de pocillos

Una vez el prototipo de sensor estuvo optimizado, éste se integró en una placa de pocillos con el fin de permitir el análisis de múltiples muestras de manera simultánea. En este formato, se trabajó con volúmenes de 100 μL de disolución tampón y 10 μL de disolución de glucosa, en lugar de 1 mL de tampón requerido para el prototipo, por lo que se consiguió reducir el volumen de reactivos y residuos en un factor de 10.

En primer lugar, se estudió la influencia del espesor de la membrana de PDMS-TEOS-NPs-TMB-HRP-GOx en la capacidad de difusión de los distintos reactivos hacia la disolución. Para ello, se introdujeron diferentes volúmenes de la mezcla PDMS-TEOS-NPs-TMB-HRP-GOx en los distintos pocillos (25, 50 and 75 μl) y, una vez la gelificada la matriz, se añadieron el tampón y la glucosa para dar comienzo a la reacción. Pasados 15 minutos se observó que los valores de absorbancia más altos correspondían a las membranas obtenidas con 25 μl de mezcla. Estos resultados pueden deberse a que, como consecuencia del menor espesor de la membrana, el TMB difunde mejor hacia la disolución, por lo que hay más cantidad disponible para que se lleve a cabo la reacción colorimétrica.

Sin embargo, en este nuevo formato, se observó que la señal analítica obtenida mediante atrapamiento de todos los reactivos en la matriz polimérica era significativamente menor que la que se alcanzaba con el prototipo. Este comportamiento pudo deberse a que, en el caso del prototipo, la superficie de contacto entre la matriz y la disolución era mucho mayor que en el caso del biosensor integrado en la placa de pocillos, por lo que, en el segundo caso, la difusión de los reactivos se vio más limitada. Por esta razón, se optó por adsorber las enzimas en la superficie de la matriz con el propósito de facilitar su difusión hacia la disolución, manteniendo el TMB atrapado en la matriz. No obstante, el color azul obtenido transcurridos 15 minutos de reacción dio una sensibilidad relativamente baja ($\text{Abs}=0.1338C + 0.0751$) en comparación con los resultados

obtenidos empleando el sensor prototipo. Sin embargo, la acidificación del medio para obtener el producto de reacción de color amarillo permitió obtener mayor sensibilidad ($Abs=1.6818C + 0.0629$) (Figura 51).

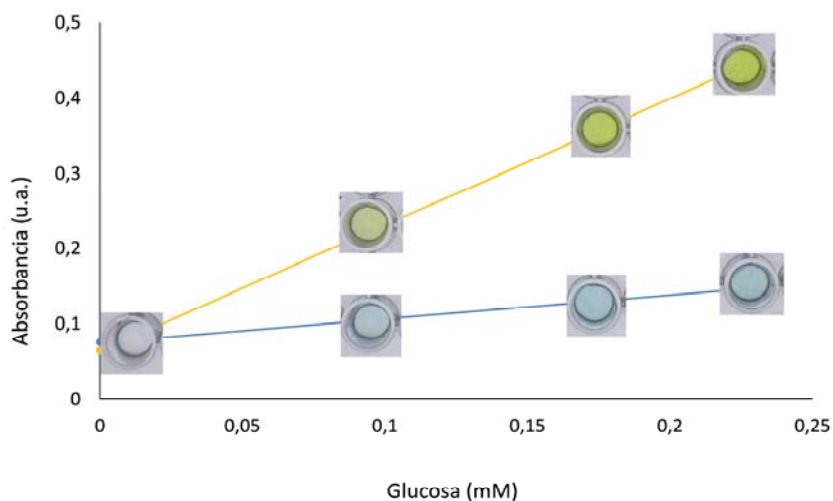


Figura 51. Comparación entre dos calibrados obtenidos antes y después de acidificar la disolución.

4.6.3. Detección colorimétrica de la glucosa en la placa de pocillos

Uno de los objetivos de este trabajo reside en desarrollar un dispositivo eficiente y económico para el análisis simultáneo de diversas muestras, con la mínima instrumentación. Por esta razón, como alternativa a equipos más sofisticados, se optó por el procesamiento de imágenes digitales para obtener una señal analítica. No obstante, tal y como se ha comentado anteriormente, la adquisición de imágenes de reactivos colorimétricos en disolución conlleva una serie de problemas, como el menisco que se forma en el pocillo o la aparición de reflejos debidos a una iluminación incorrecta [163]. Por lo tanto, se ensayaron distintas condiciones con el fin de observar su influencia en la reproducibilidad de las imágenes.

En primer lugar, se obtuvieron imágenes con diferentes grados de iluminación: (i) luz natural, (ii) luz interior (fluorescente) y (iii) el flash de la cámara del teléfono.

Los resultados obtenidos mostraron que la intensidad de las coordenadas del espacio de color RGB varió en función de la iluminación, por lo que no se obtuvieron resultados reproducibles. Por otra parte, el flash de la cámara del teléfono producía reflejos que impedían la correcta determinación de las coordenadas de color. Además, usando el flash de la cámara, la iluminación obtenida no era uniforme, por lo que había zonas más iluminadas que otras. Finalmente, se optó por usar la pantalla de un iPad mini como fuente de luz de fondo. Para ello, se instaló la aplicación gratuita MyLight en el dispositivo y, para impedir cualquier otra fuente de luz, se utilizó una capucha oscura. De esta manera se obtuvo una iluminación uniforme y libre de reflejos. Por otra parte, la distancia seleccionada para obtener la fotografía fue de 30 cm.

Una vez la imagen fue digitalizada, se analizó mediante el editor de imágenes ImageJ. Para ello, se descargó e instaló la extensión *Readplate* (disponible en la página web del programa) y la imagen digital se ajustó de manera que los puntos de medida coincidieron con el fondo del pocillo, tal y como se muestra en la **Figura 52**. Una vez realizado esto, el programa calculó la intensidad de la coordenada azul (modelo RGB) de cada uno de los pocillos y lo transformó en un valor de absorbancia.

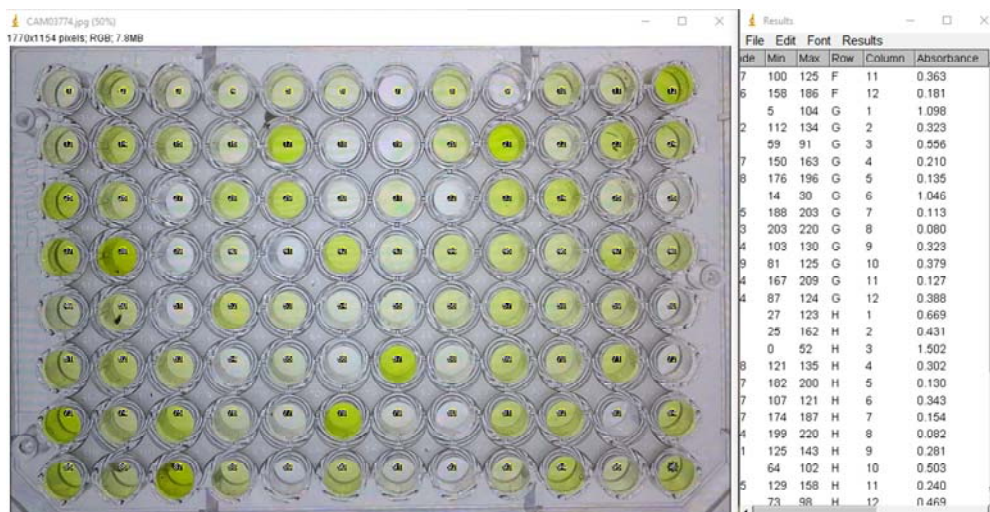


Figura 52. Ejemplo de señales obtenidas con distintas concentraciones de glucosa.

Aunque existe una gran variedad de editores de imágenes en el mercado, se decidió utilizar ImageJ por ser gratuito y de código abierto, por lo que no es necesaria una licencia para manejar el programa, lo que disminuye los costes del procedimiento. Además, este editor es compatible con distintos sistemas operativos.

4.6.4. Parámetros analíticos

Para cada una de las configuraciones utilizadas para determinar glucosa, se construyó una recta de calibrado y se establecieron los principales parámetros analíticos (rango lineal, precisión, sensibilidad y LDs) (**Tabla 32**). Los resultados obtenidos indican que este procedimientos proporciona una linealidad adecuada en el rango de 2.3-150 mg/mL, 4-150 mg/mL y 6-80 mg/mL, para el prototipo, la reacción en disolución y el biosensor adaptado a la placa de pocillos, respectivamente.

Tabla 32. Parámetros analíticos obtenidos para los diferentes métodos de determinación de glucosa. M1: disolución, M2: biosensor individual (prototipo), M3: biosensor múltiple.

| | Linealidad ($y=a+bx$) (mM) | | | Precisión RSD (%) | | LD (mg/L) | |
|----|------------------------------|-------------|-------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| | $a \pm s_a$ | $b \pm s_b$ | R^2 | Intervalo lineal | Intradía (n=3) | | Interdía (n=3) |
| M1 | 0.0184±0.0013 | 1.360±0.006 | 0.99 | 4.1-150 | 3 ¹ | 6 ¹ | 1.2 |
| M2 | 0.017±0.008 | 1.49±0.04 | 0.99 | 2.3-140 | 5 ¹ | 5 ¹ | 0.7 |
| M3 | 0.06±0.04 | 1.27±0.18 | 0.98 | 6-80 | 4 ¹ | 5 ¹ | 1.8 |

¹ Calculado a 50 mg/L

El LD, calculado $3 \cdot SD / \text{sensibilidad}$, siendo SD la desviación estándar de 10 blancos [344], fue de 0.7 mg/L para el dispositivos de análisis individual, 1.2 mg/L para disolución y 1.8 mg /L en el caso del biosensor múltiple. Como puede observarse, los LDs obtenidos mediante los 3 procedimientos presentan valores similares.

Además, se evaluó la precisión de los diferentes procedimientos estudiados a través del valor de la RSD (%). La RSD (%) interdía e intradía se calculó utilizando

sensores fabricados en el mismo lote (misma síntesis). La reacción en disolución obtuvo unos valores de RSD (%) intradía de 3, mientras que para el prototipo y el biosensor múltiple, este valor fue de 5 y 4, respectivamente. Los valores de RSD (%) interdía obtenidos fueron 6, 5 y 5 para disolución, prototipo y placa de pocillos, respectivamente. Además, también se estudió la precisión entre diferentes lotes (sensores fabricados en diferentes días). Para ello, 3 sensores preparados en 3 lotes diferentes se expusieron a una concentración de glucosa de 50 mg/L, obteniendo valores de RSD (%) de 5 y 7 para el formato de placa de pocillos y prototipo, respectivamente. Los bajos valores de RSD (%) obtenidos muestran que el biosensor propuesto es preciso para aplicaciones prácticas.

4.6.5. Estudio de posibles interferentes

Se estudió el efecto de posibles sustancias interferentes en la respuesta del sensor: ácido cítrico (668 mg/L), L-cisteína (564 mg/L), ácido glucónico (363 mg/L) y L-lisina (182 mg/L). Se observó que ninguna de estas sustancias produjo ninguna interferencia en la respuesta del sensor [277].

4.6.6. Determinación de glucosa en muestras de suero

Inicialmente, en el método de análisis propuesto, se aplicó la calibración por adición estándar con el propósito de detectar la presencia o ausencia de efecto matriz en la determinación de glucosa en muestras de suero. Al comparar las pendientes de las rectas de calibrado de la adición con la calibración con patrón externo, se obtuvo un valor de $t_{\text{calc}}(0.005) < t'(2.132)$, para un nivel de confianza del 95%. Este resultado permite concluir que las pendientes de ambas rectas son estadísticamente equivalentes y, por tanto, la concentración de glucosa se puede calcular directamente por la interpolación de la señal analítica de la muestra en la recta de calibrado preparada con patrones.

El método propuesto se empleó para la determinación de glucosa en muestras de suero reales obtenidas de 5 voluntarios. La validación del método se realizó por

comparación de los resultados obtenidos con los proporcionados por un medidor de glucosa comercial BGStar®. En la **Figura 53** se muestran los valores de concentración de glucosa obtenidos mediante los diferentes procedimientos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un test ANOVA de un factor con un nivel de confianza del 95%, utilizando el paquete estadístico *IBM SPSS Statistics v 22*. El parámetro α obtenido en todos los casos fue mayor que 0.05 (0.294, 0.653, 0.164, 0.818 y 0.214, para los voluntarios 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente). Por lo tanto, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95% entre los resultados obtenidos mediante los tres métodos, por lo que se puede concluir que los resultados son estadísticamente equivalentes.

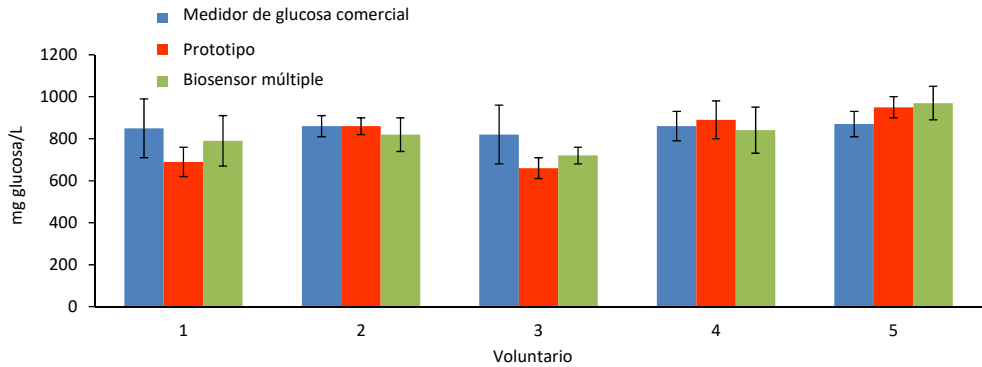


Figura 53. Concentración de glucosa obtenida mediante tres procedimientos diferentes en cinco voluntarios.

Seguidamente, también se procedió al análisis de cuatro muestras de suero de pacientes de un hospital. Como en el caso anterior, las muestras se analizaron mediante el procedimiento propuesto y, posteriormente, se compararon con los resultados obtenidos empleando un medidor de glucosa comercial electroquímico y los proporcionados por el hospital. En la **Figura 54** se muestran los resultados de concentración obtenidos mediante los diferentes procedimientos.

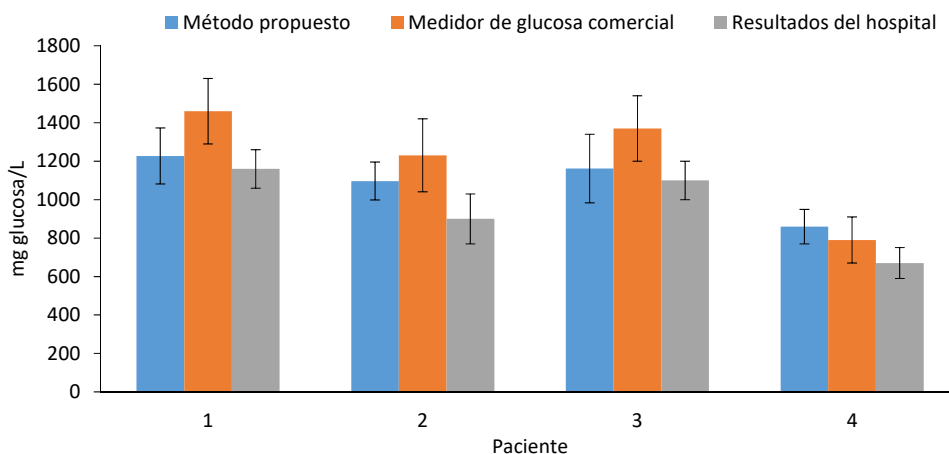


Figura 54. Concentración de glucosa obtenida en tres pacientes mediante dos métodos distintos.

Como en el caso anterior, en el análisis estadístico de los resultados obtenidos mediante los distintos métodos, se observaron valores de α superiores a 0.05 (0.09, 0.08, 0.158 y 0.135 para los pacientes 1, 2, 3 y 4, respectivamente). Estos resultados revelan que los valores obtenidos mediante los tres procedimientos son estadísticamente equivalentes, lo que implica que el método propuesto puede ser aplicado para el análisis rutinario de glucosa en varios pacientes de manera simultánea, reduciendo tiempo y costes.

4.6.7. Comparación con otros métodos

En la **Tabla 9** (Capítulo I, sección 1.4.5.) se muestra una recopilación de distintos métodos propuestos para la determinación de glucosa. Durante los últimos cinco años, se han publicado anualmente más de 100 artículos científicos relacionados con el desarrollo de sensores destinados al análisis de glucosa, lo que demuestra que la investigación enfocada hacia este tema es está en continua demanda. Además, como puede observarse, una gran cantidad de las metodologías propuestas están basadas en reacciones colorimétricas, aunque los métodos eléctricos también son numerosos. Por otra parte, algunas técnicas utilizan

enzimas para llevar a cabo la reacción, mientras que otras optan por el uso de sustitutos inorgánicos que imitan la función de las enzimas.

En relación a los parámetros analíticos, el biosensor presentado en este trabajo ha alcanzado LDs similares a los métodos propuestos en la bibliografía. Sin embargo, una de las fortalezas de la metodología desarrollada reside en la integración del biosensor en una placa de pocillos, lo que permite llevar a cabo una gran cantidad de análisis (96 determinaciones) de manera simultánea. Por otra parte, el uso de un teléfono inteligente y un programa informático como alternativa al espectrofotómetro, hacen de éste método una propuesta interesante para ser aplicada *in situ* o en zonas con pocos recursos económicos.

4.6.8. Conclusiones

En el presente trabajo se ha desarrollado un procedimiento simple y económico para realizar diversos análisis de glucosa en suero de manera simultánea. Para ello se ha propuesto una combinación de biosensor integrado en una placa de pocillos, utilizando un lector de placas basado en un teléfono inteligente y un programa informático gratuito de análisis de imágenes. El biosensor se ha basado en la inmovilización de todos los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción en un mismo soporte. Además, para la lectura de los resultados, se ha utilizado un teléfono inteligente y un programa de análisis de imágenes gratuito, evitando la adquisición de instrumentación sofisticada y minimizando, de esta manera, el coste del procedimiento.

El dispositivo desarrollado se ha aplicado para la determinación de glucosa en distintas muestras de suero sanguíneo. Los resultados obtenidos han sido comparados con el procedimiento en disolución y con las lecturas proporcionadas por un medidor de glucosa comercial mediante un análisis estadístico, concluyendo que todos los métodos proporcionaban resultados estadísticamente equivalentes. Por consiguiente, este procedimiento puede sustituir a los métodos convencionales de análisis basados en la adición sucesiva de los reactivos necesarios y el empleo de espectrofotómetros o colorímetros.

Por otra parte, se obtuvieron los parámetros analíticos de la metodología desarrollada, consiguiendo buenos resultados en cuanto a la precisión y exactitud.

En conclusión, la integración del biosensor en la placa de pocillos y el uso de un teléfono inteligente como lector permite combinar las ventajas de ambos dispositivos, como son la simplicidad, rapidez, estabilidad, bajo coste y portabilidad. La metodología desarrollada ha sido aplicada empleando la determinación de glucosa como analito. Sin embargo, es aplicable a cualquier otra determinación en la que se realice la oxidación del TMB con o sin catálisis enzimática.

CAPÍTULO V - CONCLUSIONES

A lo largo de los distintos trabajos que componen esta Tesis se han propuesto diferentes metodologías sostenibles dirigidas a mejorar y facilitar la determinación de distintos compuestos de interés en campos tan diversos como la medicina, la higiene industrial, la protección del medio ambiente o la salud pública. Para ello, se han establecido metodologías enfocadas hacia la simplificación y automatización, respetando los principios planteados por la Química Verde, tal y como sugieren las tendencias actuales detectadas en el ámbito de la Química Analítica. Por lo tanto, las metodologías desarrolladas se han centrado en dos líneas: IT-SPME-CapLC y dispositivos de análisis *in situ*.

La técnica de IT-SPME acoplada CapLC permite unificar la preconcentración y el propio análisis de la muestra en una sola etapa, minimizando la manipulación de la muestra y reduciendo el riesgo de contaminación o pérdida de analito. Para ello, en la configuración de IT-SPME utilizada en los trabajos realizados (*modalidad de circulación*), se ha empleado un segmento de columna capilar como bucle de inyección, permitiendo la extracción y preconcentración de los analitos en su recubrimiento interior. Posteriormente, los analitos fueron desorbidos por la fase móvil y transferidos al sistema cromatográfico. Esta metodología ha sido aplicada para la determinación de cloraminas y biocidas en matrices acuosas (aguas recreativas, de consumo, residuales y superficiales), además de ser utilizada para el análisis de antibióticos en dispositivos médicos invasivos. En todos los casos, los resultados obtenidos han sido satisfactorios, alcanzando LDs suficientemente bajos para detectar los analitos presentes en las distintas matrices, de acuerdo a la legislación vigente.

Así, se puede concluir que la IT-SPME-CapLC ofrece numerosas ventajas que hacen de ella una herramienta muy interesante a la hora de diseñar metodologías de análisis de muestras complejas.

Por otra parte, los dispositivos de análisis *in situ* posibilitan llevar a cabo análisis en el lugar en el que se encuentra la muestra, evitando el transporte de la muestra al laboratorio. Debido a que, tal y como se ha comentado anteriormente, uno de los objetivos planteados en la presente Tesis reside en la simplificación de las metodologías, se ha optado por desarrollar dispositivos colorimétricos, puesto que permiten llevar a cabo determinaciones cualitativas y semicuantitativas mediante

una simple inspección visual. Además, en el caso de necesitar resultados exactos y precisos, se han propuesto sistemas de detección de la señal analítica basados en el empleo de teléfonos inteligentes, junto con programas informáticos de tratamiento de imágenes, como alternativa a la instrumentación convencional. Para ello, se ha hecho uso de los modelos de color (modelos matemáticos que permiten expresar un color de forma numérica) como sustitutos de los espectros UV-vis.

El uso de teléfonos inteligentes y aplicaciones de tratamiento de imágenes para la cuantificación de la señal analítica, además de ser una alternativa a los métodos de análisis convencionales, reduce enormemente el coste del análisis, permitiendo que estos dispositivos puedan ser implantados en zonas rurales o subdesarrolladas, donde los recursos económicos no permitan adquirir los equipamientos necesarios. Además, permiten que el personal no cualificado pueda realizar el análisis de manera sencilla, rápida y económica.

En este caso, los sensores desarrollados se han basado en la inmovilización de los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción en un soporte de PDMS-TEOS o celulosa. En este punto, se han observado dos mecanismos diferentes por los que se produce la reacción:

- (I) El analito interacciona con los reactivos inmovilizados en el soporte, produciéndose la reacción en él (formación del azul de metileno en un soporte de celulosa en presencia de sulfuro de hidrógeno).
- (II) Los reactivos inmovilizados en la matriz polimérica difunden hacia la disolución, reaccionando con el analito presente en ella (obtención del producto de oxidación del TMB para la determinación de peróxido de hidrógeno y glucosa).

Por lo tanto, los dispositivos de análisis *in situ* propuestos en esta Tesis han demostrado ser un sustituto válido para los métodos comunes, puesto que la inmovilización de los reactivos en distintos soportes evita la necesidad de tener que adicionar las sustancias necesarias para llevar a cabo la reacción. Además, el nivel de simplificación alcanzado ha sido tal que se ha prescindido de equipos

convencionales para obtener una determinación cuantitativa, minimizando los costes asociados al análisis.

En conclusión, tanto los dispositivos colorimétricos de análisis *in situ* basados en la inmovilización de reactivos en distintos soportes como el empleo de la IT-SPME-CapLC han demostrado ser metodologías que simplifican el proceso de análisis de muestras complejas. Además, ambos métodos permiten minimizar el impacto negativo sobre el entorno, por lo que son una alternativa verde interesante a los métodos de análisis convencionales.

Finalmente, teniendo en cuenta la importancia de la interdisciplinariedad y transferibilidad, resulta necesario indicar que la investigación realizada ha sido aplicada a la resolución de problemas de interés económico y social. Algunos de estos trabajos se han llevado a cabo en colaboración con otros grupos de investigación de campos como la educación física (Proyecto ACOMP/2013/155) o la medicina (Proyecto: VLC-BIOMED).

Perspectivas futuras

La IT-SPME-CapLC ha demostrado ser una metodología analítica interesante, ya que aún la extracción, preconcentración y análisis en una sola etapa. Sin embargo, los niveles de extracción alcanzados por esta técnica están lejos de ser cuantitativos, por lo que resulta necesario seguir desarrollando fases adsorbentes que superen las limitaciones que presentan los recubrimientos comerciales (especialmente para los compuestos polares). Es por ello que el grupo MINTOTA, dentro del proyecto CTQ2014-53916P, ha dirigido su investigación más reciente hacia la funcionalización de los recubrimientos con nanomateriales.

Además, en lo referente a la IT-SPME magnética, será necesario continuar estudiando los efectos que tiene la aplicación de un campo magnético sobre la separación de los analitos, así como el empleo de nanopartículas magnéticas como fase extractante. Esta técnica, acoplada a sistemas de LC miniaturizadas, permite realizar análisis más sensibles, rápidos, reproducibles, y con menor consumo de disolventes.

Por otra parte, en el contexto actual, el desarrollo de herramientas de análisis basadas en el uso de modelos de color ya es una realidad. Este hecho puede suponer una revolución dentro del ámbito de la Química Analítica debido a que hace prescindible el uso de equipamiento sofisticado para realizar un análisis cuantitativo, reduciendo los costes de manera drástica y permitiendo que esta tecnología llegue a rincones con pocos recursos.

Aunque los distintos trabajos expuestos en esta Tesis se han centrado en el desarrollo de dispositivos colorimétricos, se están orientando nuevas investigaciones enfocadas al desarrollo de dispositivos fluorescentes y quimioluminiscentes con el objetivo de aumentar la sensibilidad de los mismos. Además, siguiendo la filosofía de la Química Verde, se pretende utilizar soportes biodegradables (proteínas y polisacáridos) obtenidos a partir de productos naturales, así como nanomateriales u otros agentes dopantes. Todas estas investigaciones se enmarcan en el proyecto PROMETEO 2016/109.

Finalmente, los sensores desarrollados en esta Tesis han sido validados en un entorno real. En este sentido, los resultados obtenidos han contribuido al desarrollo del Proyecto de transferencia *Valoritza i Transfereix 2016-2017 de la Universitat de València*, titulado "*Proyecto piloto basado en el empleo de kits para la evaluación de la contaminación en entornos ambientales de diferente naturaleza*". Este proyecto se ha realizado en colaboración con varias empresas, tratándose de una experiencia piloto que tiene por objetivo la validación de los dispositivos de análisis *in situ* a través de la monitorización de diferentes contaminantes.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] M. Valcárcel, A modern definition of analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 124–131. doi:10.1016/S0165-9936(97)00010-1.
- [2] M. Valcárcel, S. Cárdenas, Vanguard-rearguard analytical strategies, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 67–74. doi:10.1016/j.trac.2004.07.016.
- [3] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principios de Análisis Instrumental*, 5th ed., McGraw Hill, 2001. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [4] M. Valcárcel, La I+D+T como seña de identidad de la Química Analítica, *Boletín La Soc. Española Química Analítica.* 54 (2016) 14–20.
- [5] J.R. Baena, M. Valcárcel, Total indices in analytical sciences, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 641–646. doi:10.1016/S0165-9936(03)01101-4.
- [6] J.P. Llored, S. Sarrade, Connecting the philosophy of chemistry, green chemistry, and moral philosophy, *Found. Chem.* 18 (2016) 125–152. doi:10.1007/s10698-015-9242-z.
- [7] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Green Chem. Theory Pract. Oxford Univ. Press. New York. (1998) 30.
- [8] J. Clark, The 12 misunderstandings of green chemistry, *Environ. Sci. Eng. Mag.* (2012) 6–7.
- [9] N. Winterton, Green chemistry: deliverance or distraction?, *Clean Technol. Environ. Policy.* 18 (2016) 991–1001. doi:10.1007/s10098-016-1118-y.
- [10] Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, *Guía para el cálculo de la huella de carbono y para la elaboración de un plan de mejora de una organización*, 2015.
- [11] M. de la Guardia, S. Garrigues, An Ethical Commitment and an Economic Opportunity, in: *Challenges Green Anal. Chem.*, 2011: pp. 1–12.
- [12] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84. doi:10.1016/j.trac.2013.04.010.
- [13] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71

- (2015) 2–8. doi:10.1016/j.trac.2014.12.011.
- [14] C. Silva, C. Cavaco, R. Perestrelo, J. Pereira, J. Câmara, Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine, *Metabolites*. 4 (2014) 71–97. doi:10.3390/metabo4010071.
- [15] H. Kataoka, A. Ishizaki, Y. Nonaka, K. Saito, Developments and applications of capillary microextraction techniques: A review, *Anal. Chim. Acta*. 655 (2009) 8–29. doi:10.1016/j.aca.2009.09.032.
- [16] T. Rönkkö, *Recent Developments in Solid Phase Microextraction Techniques*, Universidad de Helsinki, 2015.
- [17] K. Belay, *Advanced Analytical Microextraction Techniques and Their Applications : A Review*, *J. Biol. Agric. Healthc*. 6 (2016) 13–20.
- [18] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent Microextraction into a Single Drop, *Anal Chem*. 68 (1996) 2236–2240.
- [19] Y. He, H.K. Lee, Liquid-Phase Microextraction in a Single Drop of Organic Solvent by Using a Conventional Microsyringe, *Anal*. 69 (1997) 4634–4640.
- [20] R. Jain, R. Singh, Microextraction techniques for analysis of cannabinoids, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 156–166. doi:10.1016/j.trac.2016.03.012.
- [21] A. Zgola-Greskowiak, T. Greskowiak, Dispersive liquid-liquid microextraction, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 1382–1399. doi:10.1016/j.trac.2011.04.014.
- [22] M. Rezaee, Y. Assadi, M.M. Hosseini, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction, *J. Chromatogr. A*. 1116 (2006) 1–9. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.007.
- [23] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem*. 71 (1999) 2650–2656. doi:10.1021/ac990055n.
- [24] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1–10. doi:10.1016/S0165-9936(04)00105-0.

-
- [25] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148. doi:10.1021/ac00218a019.
- [26] J. Chen, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2530–2533. doi:10.1021/ac00111a006.
- [27] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140–3147. doi:10.1021/ac970319a.
- [28] M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation : on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I . Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography – mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 801 (2004) 317–321. doi:10.1016/j.jchromb.2003.11.042.
- [29] A.C. Acta, M. Abdel-Rehim, Tutorial Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial, *Anal. Chim. Acta.* 701 (2011) 119–128. doi:10.1016/j.aca.2011.05.037.
- [30] M.M. Moein, A. Abdel-Rehim, M. Abdel-Rehim, Microextraction by packed sorbent (MEPS), *TrAC - Trends Anal. Chem.* 67 (2015) 34–44. doi:10.1016/j.trac.2014.12.003.
- [31] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747. doi:10.1002/(sici)1520-667x(1999)11:10<737::aid-mcs7>3.0.co;2-4.
- [32] F. David, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A.* 1152 (2007) 54–69. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.032.
- [33] E. Partitioning, D.S. Extraction, Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [34] M.Á. González-Curbelo, A. V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, Analysis of pesticides residues in environmental water

- samples using multiwalled carbon nanotubes dispersive solid-phase extraction, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 556–563. doi:10.1002/jssc.201200782.
- [35] X. Wu, H. Hong, X. Liu, W. Guan, L. Meng, Y. Ye, Y. Ma, Graphene-dispersive solid-phase extraction of phthalate acid esters from environmental water, *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 224–230. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.060.
- [36] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1362 (2014) 25–33. doi:10.1016/j.chroma.2014.08.024.
- [37] A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, J.L. Benedé, Analytica Chimica Acta Stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles e nylon 6 composite for the extraction of hydrophilic organic compounds in aqueous media, *Anal. Chim. Acta.* 926 (2016) 63–71. doi:10.1016/j.aca.2016.04.042.
- [38] R.A. González-Fuenzalida, E. López-García, Y. Moliner-Martínez, P. Campins-Falcó, Adsorbent phases with nanomaterials for in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to liquid nanochromatography, *J. Chromatogr. A.* 1432 (2016) 17–25. doi:10.1016/j.chroma.2016.01.009.
- [39] A. Masiá, Y. Moliner-Martínez, M. Muñoz-Ortuño, Y. Pico, P. Campins-Falcó, Multiresidue analysis of organic pollutants by in-tube solid phase microextraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1306 (2013) 1–11. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.019.
- [40] J. Pan, Y. Huang, L. Liu, Y. Hu, G. Li, A novel fractionized sampling and stacking strategy for online hyphenation of solid-phase-based extraction to ultra-high performance liquid chromatography for ultrasensitive analysis, *J. Chromatogr. A.* 1316 (2013) 29–36. doi:10.1016/j.chroma.2013.09.082.
- [41] R. González-Fuenzalida, Y. Moliner-Martínez, H. Prima-García, A. Ribera, P. Campins-Falcó, R. Zaragozá, Evaluation of Superparamagnetic Silica Nanoparticles for Extraction of Triazines in Magnetic in-Tube Solid Phase Microextraction Coupled to Capillary Liquid Chromatography, *Nanomaterials.* 4 (2014) 242–255. doi:10.3390/nano4020242.

- [42] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: Application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples., *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 4682–4687. doi:10.1016/j.chroma.2010.05.001.
- [43] N. Jornet-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, *J. Chromatogr. A.* 1347 (2014) 157–160. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.074.
- [44] M. Muñoz-Ortuño, A. Argente-García, Y. Moliner-Martínez, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, M.T. Picher, P. Campíns-Falcó, A cost-effective method for estimating di(2-ethylhexyl)phthalate in coastal sediments, *J. Chromatogr. A.* 1324 (2014) 57–62. doi:10.1016/j.chroma.2013.11.018.
- [45] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, In-tube solid-phase microextraction-capillary liquid chromatography as a solution for the screening analysis of organophosphorus pesticides in untreated environmental water samples, *J. Chromatogr. A.* 1141 (2007) 10–21. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.105.
- [46] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, On-fibre solid-phase microextraction coupled to conventional liquid chromatography versus in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography for the screening analysis of triazines in water samples, *J. Chromatogr. A.* 1125 (2006) 159–171. doi:10.1016/j.chroma.2006.05.056.
- [47] M.C. Prieto-Blanco, Y. Moliner-Martínez, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, Ion-pair in-tube solid-phase microextraction and capillary liquid chromatography using a titania-based column: Application to the specific lauralkonium chloride determination in water, *J. Chromatogr. A.* 1248 (2012) 55–59. doi:10.1016/j.chroma.2012.05.099.
- [48] Y. Vitta, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, A.F. Cuervo, An in-tube SPME device for the selective determination of chlorophyll a in aquatic systems, *Talanta.* 82 (2010) 952–956. doi:10.1016/j.talanta.2010.05.069.

- [49] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 205–213. doi:10.1016/j.trac.2015.02.020.
- [50] M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review, *Anal. Chim. Acta.* 906 (2016) 41–57. doi:10.1016/j.aca.2015.12.007.
- [51] Y. Nonaka, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 4416–4422. doi:10.1016/j.chroma.2009.03.035.
- [52] K. Saito, K. Yagi, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 727–733. doi:10.1016/j.jpba.2010.02.027.
- [53] H. Kataoka, T. Inoue, K. Saito, H. Kato, K. Masuda, Analysis of heterocyclic amines in hair by on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 786 (2013) 54–60. doi:10.1016/j.aca.2013.05.007.
- [54] M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, P. Campíns-Falcó, On-line analysis of carbonyl compounds with derivatization in aqueous extracts of atmospheric particulate PM10 by in-tube solid-phase microextraction coupled to capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4834–4839. doi:10.1016/j.chroma.2011.05.093.
- [55] H. Kataoka, M. Itano, A. Ishizaki, K. Saito, Determination of patulin in fruit juice and dried fruit samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 3746–3750. doi:10.1016/j.chroma.2009.03.017.
- [56] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010)

- 5555–5563. doi:10.1016/j.chroma.2010.06.068.
- [57] B.J.G. Silva, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, In-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography (in-tube SPME/LC) analysis of nontricyclic antidepressants in human plasma, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 862 (2008) 181–188. doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.006.
- [58] H. Kataoka, R. Inoue, K. Yagi, K. Saito, Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 108–114. doi:10.1016/j.jpba.2008.09.044.
- [59] K. Saito, E. Uemura, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of perfluorooctanoic acid and perfluorooctane sulfonate by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 658 (2010) 141–146. doi:10.1016/j.aca.2009.11.004.
- [60] L.P. Melo, R.H.C. Queiroz, M.E.C. Queiroz, Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 2454–2458. doi:10.1016/j.jchromb.2011.06.041.
- [61] X.-Y. Liu, Y.-S. Ji, H.-X. Zhang, M.-C. Liu, 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.* 1212 (2008) 10–5. doi:10.1016/j.chroma.2008.10.034.
- [62] W. Zhang, J. Zhang, T. Bao, W. Zhou, J. Meng, Z. Chen, Universal multilayer assemblies of graphene in chemically resistant microtubes for microextraction, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6846–6854. doi:10.1021/ac401157j.
- [63] B. Lin, T. Li, Y. Zhao, F.K. Huang, L. Guo, Y.Q. Feng, Preparation of a TiO₂ nanoparticle-deposited capillary column by liquid phase deposition and its application in phosphopeptide analysis, *J. Chromatogr. A.* 1192 (2008) 95–102. doi:10.1016/j.chroma.2008.03.043.

- [64] T. Li, J. Xu, J.H. Wu, Y.Q. Feng, Liquid-phase deposition of silica nanoparticles into a capillary for in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 2989–2995. doi:10.1016/j.chroma.2009.01.076.
- [65] M. Zarejousheghani, M. Möder, H. Borsdorf, A new strategy for synthesis of an in-tube molecularly imprinted polymer-solid phase microextraction device: Selective off-line extraction of 4-nitrophenol as an example of priority pollutants from environmental water samples, *Anal. Chim. Acta.* 798 (2013) 48–55. doi:10.1016/j.aca.2013.08.038.
- [66] A.R. Chaves, M.E. Costa Queiroz, In-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted polymer to determine interferon alpha 2a in plasma sample by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1318 (2013) 43–48. doi:10.1016/j.chroma.2013.10.018.
- [67] Y. Hu, C. Song, G. Li, Fiber-in-tube solid-phase microextraction with molecularly imprinted coating for sensitive analysis of antibiotic drugs by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1263 (2012) 21–27. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.029.
- [68] Y. Moliner-Martínez, H. Prima-Garcia, A. Ribera, E. Coronado, P. Campins-Falcó, Magnetic In-Tube Solid Phase Microextraction, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7233–7240. doi:10.1021/ac301660k.
- [69] Y. Moliner-Martínez, Y. Vitta, H. Prima-Garcia, R.A. González-Fuenzalida, A. Ribera, P. Campins-Falcó, E. Coronado, Silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction and magnetic in-tube solid-phase microextraction: Application to organophosphorous compounds Microextraction Techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2211–2215. doi:10.1007/s00216-013-7379-y.
- [70] Y. Moliner-Martínez, P. Serra-Mora, J. Verdú-Andrés, R. Herráez-Hernández, 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.* 407 (2015) 1485–1497. doi:10.1007/s00216-014-8366-7.
- [71] M. Sun, J. Feng, Y. Bu, C. Luo, Highly sensitive copper fiber-in-tube solid-phase microextraction for online selective analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high performance liquid chromatography, *J.*

- Chromatogr. A. 1408 (2015) 41–48. doi:10.1016/j.chroma.2015.07.024.
- [72] Y. Fan, Y.Q. Feng, S.L. Da, Z.G. Shi, Poly (methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolithic capillary for in-tube solid phase microextraction coupled to high performance liquid chromatography and its application to determination of basic drugs in human serum, *Anal. Chim. Acta.* 523 (2004) 251–258. doi:10.1016/j.aca.2004.07.052.
- [73] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, New micromethod combining miniaturized matrix solid-phase dispersion and in-tube in-valve solid-phase microextraction for estimating polycyclic aromatic hydrocarbons in bivalves, *J. Chromatogr. A.* 1211 (2008) 13–21. doi:10.1016/j.chroma.2008.09.074.
- [74] N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, Trends for the Development of In Situ Analysis Devices, *Encycl. Anal. Chem.* (2017) 1–23. doi:10.1002/9780470027318.a9593.
- [75] A.M. Nightingale, A.D. Beaton, M.C. Mowlem, Trends in microfluidic systems for in situ chemical analysis of natural waters, *Sensors Actuators, B Chem.* 221 (2015) 1398–1405. doi:10.1016/j.snb.2015.07.091.
- [76] S.K. Pandey, K.H. Kim, K.T. Tang, A review of sensor-based methods for monitoring hydrogen sulfide, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 32 (2012) 87–99. doi:10.1016/j.trac.2011.08.008.
- [77] J.F.D.S. Petrucci, A.A. Cardoso, Sensitive luminescent paper-based sensor for the determination of gaseous hydrogen sulfide, *Anal. Methods.* 7 (2015) 2687–2692. doi:10.1039/C4AY02952F.
- [78] M.M.F. Choi, P. Hawkins, Development of an optical hydrogen sulphide sensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 90 (2003) 211–215. doi:10.1016/S0925-4005(03)00030-3.
- [79] N. Donato, D. Aloisio, S.G. Leonardi, G. Neri, Ink-Jet Printed Colorimetric Sensor for the Determination of Fe (II), *IEEE Sens. J.* 15 (2015) 3196–3200.
- [80] E.M. Fenton, M.R. Mascarenas, G.P. López, S.S. Sibbett, Multiplex lateral-flow test strips fabricated by two-dimensional shaping, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 1 (2009) 124–129. doi:10.1021/am800043z.
- [81] C.D. Chin, V. Linder, S.K. Sia, A.S. Daar, H. Thorsteinsdottir, D.K. Martin, Lab-

- on-a-chip devices for global health: Past studies and future opportunities, *Lab Chip*. 7 (2007) 41–57. doi:10.1039/B611455E.
- [82] C.C. Coffey, T.A. Pearce, Direct-reading methods for workplace air monitoring, *J. Chem. Heal. Saf.* 17 (2010) 10–21. doi:10.1016/j.jchas.2009.08.003.
- [83] M.C. Prieto-Blanco, N. Jornet-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, *Sci. Total Environ.* 503–504 (2015) 105–112. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.077.
- [84] N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, Designing solid optical sensors for in situ passive discrimination of volatile amines based on a new one-step hydrophilic PDMS preparation, *Sensors Actuators, B Chem.* 223 (2016) 333–342. doi:10.1016/j.snb.2015.09.097.
- [85] A. Argente-García, M. Muñoz-Ortuño, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, A solid device based on doped hybrid composites for controlling the dosage of the biocide N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine in industrial formulations, *Talanta*. 147 (2016) 147–154. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.051.
- [86] M. Muñoz-Ortuño, A. Argente-García, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Polydimethylsiloxane composites containing 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate as unique dispositive for estimation of casein in effluents from dairy industries, *Anal. Chim. Acta.* 873 (2015) 31–37. doi:10.1016/j.aca.2015.02.057.
- [87] N. Lopez-Ruiz, V.F. Curto, M.M. Erenas, F. Benito-Lopez, D. Diamond, A.J. Palma, L.F. Capitan-Vallvey, Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices., *Anal. Chem.* 86 (2014) 9554–9562. doi:10.1021/ac5019205.
- [88] B. Kuswandi, J. Huskens, W. Verboom, Optical sensing systems for microfluidic devices : A review, *Anal. Chim. Acta.* 601 (2007) 141–155. doi:10.1016/j.aca.2007.08.046.

-
- [89] N. a Rakow, K.S. Suslick, A colorimetric sensor array for odour visualization., *Nature*. 406 (2000) 710–713. doi:10.1038/35021028.
- [90] 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. doi:10.1021/ac052111s.
- [91] S.H. Lim, S. Mix, Z. Xu, B. Taba, I. Budvytiene, A.N. Berliner, N. Queralto, Y.S. Churi, R.S. Huang, M. Eiden, R.A. Martino, P. Rhodes, N. Banaei, Colorimetric sensor array allows fast detection and simultaneous identification of sepsis-causing bacteria in spiked blood culture, *J. Clin. Microbiol.* 52 (2014) 592–598. doi:10.1128/JCM.02377-13.
- [92] M.J. Kangas, R.M. Burks, J. Atwater, R.M. Lukowicz, P. Williams, A.E. Holmes, Colorimetric Sensor Arrays for the Detection and Identification of Chemical Weapons and Explosives, *Crit Rev Anal Chem.* 47 (2016) 1–16. doi:10.1080/10408347.2016.1233805.
- [93] 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. doi:10.1021/ac1020886.
- [94] J.R. Askim, K.S. Suslick, Hand-Held Reader for Colorimetric Sensor Arrays, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7810–7816. doi:10.1021/acs.analchem.5b01499.
- [95] B.A. Suslick, L. Feng, K.S. Suslick, Discrimination of Complex Mixtures by a Colorimetric Sensor Array: Coffee Aromas, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2067–2073. doi:10.1124/dmd.107.016501.CYP3A4-Mediated.
- [96] J. Long, J. Xu, Y. Yang, J. Wen, C. Jia, A colorimetric array of metalloporphyrin derivatives for the detection of volatile organic compounds, *Mater. Sci. Eng. B Solid-State Mater. Adv. Technol.* 176 (2011) 1271–1276. doi:10.1016/j.mseb.2011.07.015.
- [97] C. Zhang, K.S. Suslick, Colorimetric sensor array for soft drink analysis, *J. Agric. Food Chem.* 55 (2007) 237–242. doi:10.1021/jf0624695.
- [98] N.A. Rakow, A. Sen, M.C. Janzen, J.B. Ponder, K.S. Suslick, Molecular recognition and discrimination of amines with a colorimetric array, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 44 (2005) 4528–4532. doi:10.1002/anie.200500939.

- [99] X.W. Huang, X.B. Zou, J.Y. Shi, Y. Guo, J.W. Zhao, J. Zhang, L. Hao, Determination of pork spoilage by colorimetric gas sensor array based on natural pigments, *Food Chem.* 145 (2014) 549–554. doi:10.1016/j.foodchem.2013.08.101.
- [100] M.E. Stewart, C.R. Anderton, L.B. Thompson, J. Maria, S.K. Gray, J.A. Rogers, R.G. Nuzzo, Nanostructured plasmonic sensors, *Chem. Rev.* 108 (2008) 494–521. doi:10.1021/cr068126n.
- [101] K. Su, Q. Wei, X. Zhang, Interparticle Coupling Effects on Plasmon Resonances of Nanogold Particles, *Nano Lett.* 3 (2003) 1087–1090.
- [102] S. Eustis, M. a el-Sayed, Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes., *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 209–217. doi:10.1039/b514191e.
- [103] J. Homola, Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species, *Chem. Rev.* 108 (2008) 462–93. doi:10.1021/cr068107d.
- [104] I. Caelen, A. Kalman, L. Wahlström, Biosensor-Based Determination of Riboflavin in Milk Samples, *Anal. Chem.* 76 (2004) 137–143. doi:10.1021/ac034876a.
- [105] A.D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, S. Jiang, Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2006) 752–758. doi:10.1016/j.bios.2006.03.012.
- [106] G.A.J. Besselink, R.P.H. Kooyman, P.J.H.J. Van Os, G.H.M. Engbers, R.B.M. Schasfoort, Signal amplification on planar and gel-type sensor surfaces in surface plasmon resonance-based detection of prostate-specific antigen, *Anal. Biochem.* 333 (2004) 165–173. doi:10.1016/j.ab.2004.05.009.
- [107] P.P. Dillon, S.J. Daly, B.M. Manning, R. O’Kennedy, Immunoassay for the determination of morphine-3-glucuronide using a surface plasmon resonance-based biosensor, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2002) 217–227. doi:10.1016/S0956-5663(02)00182-3.
- [108] Y. Li, H.J. Lee, R.M. Corn, Detection of protein biomarkers using RNA

- aptamer microarrays and enzymatically amplified surface plasmon resonance imaging., *Anal. Chem.* 79 (2007) 1082–1088. doi:10.1021/ac061849m.
- [109] N. Jornet-Martínez, M. González-Béjar, Y. Moliner-Martínez, P. Campíns-Falcó, J. Pérez-Prieto, Sensitive and selective plasmonic assay for spermine as biomarker in human urine, *Anal. Chem.* 86 (2014) 1347–1351. doi:10.1021/ac404165j.
- [110] H. Kawazumi, K.V. Gobi, K. Ogino, H. Maeda, N. Miura, Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors Actuators, B Chem.* 108 (2005) 791–796. doi:10.1016/j.snb.2004.11.069.
- [111] E. Mauriz, A. Calle, J.J. Manclús, A. Montoya, A.M. Escuela, J.R. Sendra, L.M. Lechuga, Single and multi-analyte surface plasmon resonance assays for simultaneous detection of cholinesterase inhibiting pesticides, *Sensors Actuators, B Chem.* 118 (2006) 399–407. doi:10.1016/j.snb.2006.04.085.
- [112] E. Mauriz, A. Calle, L.M. Lechuga, J. Quintana, A. Montoya, J.J. Manclús, Real-time detection of chlorpyrifos at part per trillion levels in ground, surface and drinking water samples by a portable surface plasmon resonance immunosensor, *Anal. Chim. Acta.* 561 (2006) 40–47. doi:10.1016/j.aca.2005.12.069.
- [113] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Chemical sensors: definitions and classification, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250. doi:10.1351/pac199163091247.
- [114] S. Chah, M.R. Hammond, R.N. Zare, Gold nanoparticles as a colorimetric sensor for protein conformational changes, *Chem. Biol.* 12 (2005) 323–328. doi:10.1016/j.chembiol.2005.01.013.
- [115] D.A. Jose, S. Mishra, A. Ghosh, A. Shrivastav, S.K. Mishra, A. Das, Colorimetric sensor for ATP in aqueous solution, *Org. Lett.* 9 (2007) 1979–1982. doi:10.1021/ol0705797.
- [116] D. Zhang, M. Zhang, Z. Liu, M. Yu, F. Li, T. Yi, C. Huang, Highly selective colorimetric sensor for cysteine and homocysteine based on azo derivatives, *Tetrahedron Lett.* 47 (2006) 7093–7096. doi:10.1016/j.tetlet.2006.07.080.

- [117] D.D. Liana, B. Raguse, J. Justin Gooding, E. Chow, Recent advances in paper-based sensors, *Sensors*. 12 (2012) 11505–11526. doi:10.3390/s120911505.
- [118] W. Zhao, M.M. Ali, S.D. Aguirre, M.A. Brook, Y. Li, Paper-Based Bioassays Using Gold Nanoparticle Colorimetric Probes, 80 (2008) 8431–8437. doi:10.1002/cbic.200-800282.Analytical.
- [119] S. Chaiyo, W. Siangproh, A. Apilux, O. Chailapakul, Highly selective and sensitive paper-based colorimetric sensor using thiosulfate catalytic etching of silver nanoplates for trace determination of copper ions, *Anal. Chim. Acta*. 866 (2015) 75–83. doi:10.1016/j.aca.2015.01.042.
- [120] T. Eaidkong, R. Mungkarndee, C. Phollookin, G. Tumcharern, M. Sukwattanasinitt, S. Wacharasindhu, Polydiacetylene paper-based colorimetric sensor array for vapor phase detection and identification of volatile organic compounds, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 5970–5977. doi:10.1039/c2jm16273c.
- [121] T. Soga, Y. Jimbo, K. Suzuki, D. Citterio, Inkjet-printed paper-based colorimetric sensor array for the discrimination of volatile primary amines, *Anal. Chem.* 85 (2013) 8973–8978. doi:10.1021/ac402070z.
- [122] J. Chang, H. Li, T. Hou, F. Li, Paper-based fluorescent sensor for rapid naked-eye detection of acetylcholinesterase activity and organophosphorus pesticides with high sensitivity and selectivity, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 971–977. doi:10.1016/j.bios.2016.07.022.
- [123] C. Sicard, C. Glen, B. Aubie, D. Wallace, S. Jahanshahi-Anbuhi, K. Pennings, G.T. Daigger, R. Pelton, J.D. Brennan, C.D.M. Filipe, Tools for water quality monitoring and mapping using paper-based sensors and cell phones, *Water Res.* 70 (2015) 360–369. doi:10.1016/j.watres.2014.12.005.
- [124] J.A.O. Saraz, I. de F.F. Tinoco, R.S. Gates, K.S.O. Rocha, L.Z. Marín, A simple methodology to measure ammonia flux generated in naturally ventilated poultry houses, *Rev. Colomb. Ciencias Pecu.* 28 (2015) 3–12.
- [125] N.E. Stankova, P.A. Atanasov, R.G. Nikov, R.G. Nikov, N.N. Nedyalkov, T.R. Stoyanchov, N. Fukata, K.N. Kolev, E.I. Valova, J.S. Georgieva, S.A. Armyanov, Optical properties of polydimethylsiloxane (PDMS) during nanosecond laser processing, *Appl. Surf. Sci.* 374 (2015) 96–103. doi:10.1016/j.apsusc.2015.10.016.

- [126] A.M. Nazari, A.K. Miri, D.M. Shinozaki, Mechanical characterization of nanoclay-filled PDMS thin films, *Polym. Test.* 52 (2016) 85–88. doi:10.1016/j.polymertesting.2016.04.006.
- [127] A. Argente-García, N. Jornet-Martínez, R. Herráez-Hernández, P. Campins-Falcó, A solid colorimetric sensor for the analysis of amphetamine-like street samples, *Anal. Chim. Acta.* 943 (2016) 123–130. doi:10.1016/j.aca.2016.09.020.
- [128] M.M.M. Elnashar, Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology, *J. Biomater. Nanobiotechnol.* 1 (2010) 61–77. doi:10.4236/jbnb.2010.11008.
- [129] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45. doi:10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x.
- [130] N. Miletić, A. Nastasović, K. Loos, Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 126–135. doi:10.1016/j.biortech.2011.11.054.
- [131] N.R. Mohamad, N.H.C. Marzuki, N.A. Buang, F. Huyop, R.A. Wahab, An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 29 (2015) 205–220. doi:10.1080/13102818.2015.1008192.
- [132] T. Xie, A. Wang, L. Huang, H. Li, Z. Chen, Q. Wang, Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization, *African J. Biotechnol.* 8 (2009) 4724–4733.
- [133] B. Krajewska, Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review, *Enzyme Microb. Technol.* 35 (2004) 126–139. doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.013.
- [134] K. Alizadeh, R. Parooi, P. Hashemi, B. Rezaei, M.R. Ganjali, A new Schiff's base ligand immobilized agarose membrane optical sensor for selective monitoring of mercury ion, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 1794–1800. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.12.067.
- [135] M.M. Abolghasemi, M. Sobhi, M. Piryaeei, Preparation of a novel green

- optical pH sensor based on immobilization of red grape extract on bioorganic agarose membrane, *Sensors Actuators, B Chem.* 224 (2016) 391–395. doi:10.1016/j.snb.2015.10.038.
- [136] B. Brena, P. González-Pombo, F. Batista-Viera, Immobilization of enzymes: a literature survey., *Methods Mol. Biol.* 1051 (2013) 15–31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- [137] I.M. El-Sherbiny, A. Hefnawy, E. Salih, New core-shell hyperbranched chitosan-based nanoparticles as optical sensor for ammonia detection, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 782–788. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.118.
- [138] R. Raghunandhan, L.H. Chen, H.Y. Long, L.L. Leam, P.L. So, X. Ning, C.C. Chan, Chitosan/PAA based fiber-optic interferometric sensor for heavy metal ions detection, *Sensors Actuators, B Chem.* 233 (2016) 31–38. doi:10.1016/j.snb.2016.04.020.
- [139] M.S. Khan, G. Thouas, W. Shen, G. Whyte, G. Garnier, Paper diagnostic for instantaneous blood typing, *Anal. Chem.* 82 (2010) 4158–4164. doi:10.1021/ac100341n.
- [140] S. Bagherbaigi, E.P. Córcoles, D.H.B. Wicaksono, Cotton fabric as an immobilization matrix for low-cost and quick colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), *Anal. Methods.* 6 (2014) 7175. doi:10.1039/C4AY01071J.
- [141] F.Y. Li, Y.J. Xing, X. Ding, Immobilization of papain on cotton fabric by sol-gel method, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2007) 1692–1697. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.09.007.
- [142] N. Jornet-Martínez, P. Campíns-Falcó, E.A.H. Hall, Zein as biodegradable material for effective delivery of alkaline phosphatase and substrates in biokits and biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 86 (2016) 14–19. doi:10.1016/j.bios.2016.06.016.
- [143] F.H. Isgrove, R.J.H. Williams, G.W. Niven, A.T. Andrews, Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support, *Enzyme Microb. Technol.* 28 (2001) 225–232. doi:10.1016/S0141-0229(00)00312-4.
- [144] D. Liu, R.K. Perdue, L. Sun, R.M. Crooks, Immobilization of DNA onto Poly (

- dimethylsiloxane) Surfaces and Application to a Microelectrochemical Enzyme-Amplified DNA Hybridization Assay, *Langmuir*. 20 (2004) 5905–5910.
- [145] W. Zhao, P.Y. Ge, J.J. Xu, H.Y. Chen, Selective detection of hypertoxic organophosphates pesticides via PDMS composite based acetylcholinesterase-inhibition biosensor, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6724–6729. doi:10.1021/es900841n.
- [146] C.A. Marquette, L.J. Blum, Direct immobilization in poly(dimethylsiloxane) for DNA, protein and enzyme fluidic biochips, *Anal. Chim. Acta.* 506 (2004) 127–132. doi:10.1016/j.aca.2003.11.015.
- [147] A. Kreider, K. Richter, S. Sell, M. Fenske, C. Tornow, V. Stenzel, I. Grunwald, Functionalization of PDMS modified and plasma activated two-component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes, *Appl. Surf. Sci.* 273 (2013) 562–569. doi:10.1016/j.apsusc.2013.02.080.
- [148] Y. Wang, F. Caruso, Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization, *Chem. Mater.* 17 (2005) 953–961.
- [149] R.M. Blanco, P. Terreros, M. Fernández-Pérez, C. Otero, G. Díaz-González, Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 30 (2004) 83–93. doi:10.1016/j.molcatb.2004.03.012.
- [150] K. Mukhopadhyay, S. Phadtare, V.P. Vinod, A. Kumar, M. Rao, R. V Chaudhari, M. Sastry, Gold Nanoparticles Assembled on Amine-Functionalized Na-Y Zeolite: A Biocompatible Surface for Enzyme Immobilization, *Langmuir*. 19 (2003) 3858–3863. doi:10.1021/la0268202.
- [151] F. Yagiz, D. Kazan, A.N. Akin, Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites, *Chem. Eng. J.* 134 (2007) 262–267. doi:10.1016/j.cej.2007.03.041.
- [152] J. Zhang, J. Zhang, F. Zhang, H. Yang, X. Huang, H. Liu, S. Guo, Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization, *Langmuir*. 26 (2010) 6083–6085. doi:10.1021/la904014z.
- [153] M.N. Gupta, B. Mattiasson, Unique applications of immobilized proteins in bioanalytical systems, 1992. doi:10.1002/9780470110577.ch1.

- [154] U. Hanefeld, L. Gardossi, E. Magner, Understanding enzyme immobilisation, *Chem Soc Rev.* 38 (2009) 453–468. doi:10.1039/b711564b.
- [155] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.003.
- [156] S. Datta, L.R. Christena, Y.R.S. Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, 3 *Biotech.* (2012) 1–9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7.
- [157] C.-J. Chiang, L.-T. Hsiau, W.-C. Lee, Immobilization of cell-associated enzymes by entrapment in polymethacrylamide beads, *Biotechnol. Tech.* 11 (1997) 121–125.
- [158] M. Arroyo, Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones, *Ars Pharm.* 39 (1998) 23–39.
- [159] R.A. Sheldon, Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts., *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 1583–1587. doi:10.1042/BST0351583.
- [160] S.K. Vashist, T. van Oordt, E.M. Schneider, R. Zengerle, F. von Stetten, J.H.T. Luong, A smartphone-based colorimetric reader for bioanalytical applications using the screen-based bottom illumination provided by gadgets, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2014) 248–255. doi:10.1016/j.bios.2014.08.027.
- [161] D.C. Christodouleas, A. Nemiroski, A.A. Kumar, G.M. Whitesides, Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9170–9178. doi:10.1021/acs.analchem.5b01612.
- [162] A. Roda, E. Michellini, M. Zangheri, M. Di Fusco, D. Calabria, P. Simoni, Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 317–325. doi:10.1016/j.trac.2015.10.019.
- [163] L.F. Capitán-Vallvey, N. López-Ruiz, A. Martínez-Olmos, M.M. Erenas, A.J. Palma, Recent developments in computer vision-based analytical chemistry: A tutorial review, *Anal. Chim. Acta.* 899 (2015) 23–56. doi:10.1016/j.aca.2015.10.009.
- [164] C.A. Chaplan, H.T. Mitchell, A.W. Martinez, Paper-based standard addition

- assays, *Anal. Methods*. 6 (2014) 1296. doi:10.1039/c4ay00205a.
- [165] K. Su, Q. Zou, N. Hu, P. Wang, High-sensitive and high-efficient biochemical analysis method using a bionic electronic eye in combination with a smartphone-based colorimetric reader system, *Sensors Actuators B Chem.* 216 (2015) 134–140. doi:10.1109/EMBC.2015.7320181.
- [166] O. Hosu, A. Ravalli, G.M. Lo Piccolo, C. Cristea, R. Sandulescu, G. Marrazza, Smartphone-based immunosensor for CA125 detection, *Talanta*. 166 (2017) 234–240. doi:10.1016/j.talanta.2017.01.073.
- [167] K. Su, X. Qiu, J. Fang, Q. Zou, P. Wang, An improved efficient biochemical detection method to marine toxins with a smartphone-based portable system-Bionic e-Eye, *Sensors Actuators, B Chem.* 238 (2017) 1165–1172. doi:10.1016/j.snb.2016.02.092.
- [168] M.Y. Jia, Q.S. Wu, H. Li, Y. Zhang, Y.F. Guan, L. Feng, The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 1029–1037. doi:10.1016/j.bios.2015.07.072.
- [169] V. Oncescu, D. O’Dell, D. Erickson, Smartphone based health accessory for colorimetric detection of biomarkers in sweat and saliva, *Lab Chip*. 13 (2013) 3232–8. doi:10.1039/c3lc50431j.
- [170] V. V. Apyari, S.G. Dmitrienko, Using a digital camera and computer data processing for the determination of organic substances with diaotized polyurethane foams, *J. Anal. Chem.* 63 (2008) 530–537. doi:10.1134/S1061934808060038.
- [171] B. Berg, B. Cortazar, D. Tseng, H. Ozkan, S. Feng, Q. Wei, R.Y.L. Chan, J. Burbano, Q. Farooqui, M. Lewinski, D. Di Carlo, O.B. Garner, A. Ozcan, Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays, *ACS Nano*. 9 (2015) 7857–7866. doi:10.1021/acs.nano.5b03203.
- [172] K.D. Ong, H. Yu, B.T. Cunningham, Smartphone instrument for portable enzyme-linked immunosorbent assays., *Biomed. Opt. Express*. 5 (2014) 3792–3806. doi:10.1364/BOE.5.003792.
- [173] S. Yu, W. Xiao, Q. Fu, Z. Wu, C. Yao, *Analytical Methods A portable*

- chromium ion detection system based on a smartphone readout device, *Anal. Methods*. 8 (2016) 6877–6882. doi:10.1039/C6AY01994C.
- [174] T. Ogirala, A. Eapen, K.G. Salvante, T. Rapaport, P.A. Nepomnaschy, A.M. Parameswaran, Smartphone-based colorimetric ELISA implementation for determination of women's reproductive steroid hormone profiles, *Med. Biol. Eng. Comput.* (2017). doi:10.1007/s11517-016-1605-7.
- [175] S.K. Vashist, E. Marion Schneider, R. Zengerle, F. von Stetten, J.H.T. Luong, Graphene-based rapid and highly-sensitive immunoassay for C-reactive protein using a smartphone-based colorimetric reader, *Biosens. Bioelectron.* 66 (2015) 169–176. doi:10.1016/j.bios.2014.11.017.
- [176] J. Gabrielson, M. Hart, A. Jarelöv, I. Kühn, D. McKenzie, R. Möllby, Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates, *J. Microbiol. Methods*. 50 (2002) 63–73. doi:10.1016/S0167-7012(02)00011-8.
- [177] J. Gabrielson, I. Kühn, P. Colque-Navarro, M. Hart, A. Iversen, D. McKenzie, R. Möllby, Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals, *Anal. Chim. Acta*. 485 (2003) 121–130. doi:10.1016/S0003-2670(03)00404-5.
- [178] A. Soni, S.K. Jha, A paper strip based non-invasive glucose biosensor for salivary analysis, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2015) 763–768. doi:10.1016/j.bios.2014.09.042.
- [179] H. Parastar, H. Shaye, MVC app: A smartphone application for performing chemometric methods, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 147 (2015) 105–110. doi:10.1016/j.chemolab.2015.08.010.
- [180] N. Cimetiere, J. De Laat, Henry's law constant of N,N-dichloromethylamine: Application to the contamination of the atmosphere of indoor swimming pools, *Chemosphere*. 77 (2009) 465–470. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.07.056.
- [181] J. De Laat, N. Boudiaf, F. Dossier-Berne, Effect of dissolved oxygen on the photodecomposition of monochloramine and dichloramine in aqueous solution by UV irradiation at 253.7 nm, *Water Res.* 44 (2010) 3261–3269. doi:10.1016/j.watres.2010.03.009.

- [182] K. Nikolaev, S. Ermakov, Y. Ermolenko, E. Averyaskina, A. Offenhäusser, Y. Mourzina, A novel bioelectrochemical interface based on in situ synthesis of gold nanostructures on electrode surfaces and surface activation by Meerwein's salt. A bioelectrochemical sensor for glucose determination, *Bioelectrochemistry*. 105 (2015) 34–43. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.05.004.
- [183] H. Tao, Z.L. Chen, X. Li, Y.L. Yang, G.B. Li, Salicylate-spectrophotometric determination of inorganic monochloramine, *Anal. Chim. Acta*. 615 (2008) 184–190. doi:10.1016/j.aca.2008.04.005.
- [184] A. Adachi, K. Matsushita, Y. Yata, T. Okano, Effect of Rice Bran on the Growth Inhibition of *Selenastrum Capricornutum* by Chlorine and Monochloramine, 50 (2004) 613–618.
- [185] A. Bernard, S. Carbonnelle, X. Dumont, M. Nickmilder, Infant swimming practice, pulmonary epithelium integrity, and the risk of allergic and respiratory diseases later in childhood., *Pediatrics*. 119 (2007) 1095–1103. doi:10.1542/peds.2006-3333.
- [186] S. Kinani, B. Richard, Y. Souissi, S. Bouchonnet, Analysis of inorganic chloramines in water, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 33 (2012) 55–67. doi:10.1016/j.trac.2011.10.006.
- [187] J. Li, E.R. Blatchley, UV photodegradation of inorganic chloramines, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 60–65. doi:10.1021/es8016304.
- [188] P.J. Vikesland, K. Ozekin, R.L. Valentine, Monochloramine Decay in Model and Distribution System Waters, 35 (2001) 1766–1776.
- [189] K.M. Thickett, J.S. McCoach, J.M. Gerber, S. Sadhra, P.S. Burge, Occupational asthma caused by chloramines in indoor swimming-pool air, *Eur. Respir. J.* 19 (2002) 827–832. doi:10.1183/09031936.02.00232802.
- [190] J. Parrat, G. Donzé, C. Iseli, D. Perret, C. Tomicic, O. Schenk, G. Donz??, C. Iseli, D. Perret, C. Tomicic, O. Schenk, Assessment of occupational and public exposure to trichloramine in swiss indoor swimming pools: A proposal for an occupational exposure limit, *Ann. Occup. Hyg.* 56 (2012) 264–277. doi:10.1093/annhyg/mer125.
- [191] V. Bessonneau, M. Derbez, M. Clément, O. Thomas, Determinants of

- chlorination by-products in indoor swimming pools, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 215 (2011) 76–85. doi:10.1016/j.ijheh.2011.07.009.
- [192] C. Bogatu, D. Leszczynska, L. Beqa, G. Mosoarca, L. Cocheci, Trichloramine Formation and Decay during Breakpoint Process, *Chem. Bull. "POLITEHNICA" Univ. (Timisoara).* 55 (2010) 99–102.
- [193] H. Ge, G.G. Wallace, R.A.J. O'Halloran, Determination of trace amounts of chloramines by liquid chromatographic separation and amperometric detection, *Anal. Chim. Acta.* 237 (1990) 149–153. doi:10.1016/S0003-2670(00)83912-4.
- [194] A. Public Health Association, APHA Method 4500-CL: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 552 (n.d.).
- [195] M. Brunetto, C. Colin, R. Rosset, Chromatographie en phase liquide des chloramines, *Analysis.* 13 (1987) 393–398.
- [196] G.A. Gagnon, H. Baribeau, S.O. Rutledge, R. Dumancic, A. Oehmen, C. Chauret, S. Andrews, Disinfectant efficacy in distribution systems: A pilot-scale assessment, *J. Water Supply Res. Technol. - AQUA.* 57 (2008) 507–518. doi:10.2166/aqua.2008.103.
- [197] K. Kosaka, K. Seki, N. Kimura, Y. Kobayashi, M. Asami, Determination of trichloramine in drinking water using headspace gas chromatography/mass spectrometry, *IWA Publ.* 10 (2010) 23–29. doi:10.2166/ws.2010.042.
- [198] S. Kinani, S. Layousse, B. Richard, A. Kinani, S. Bouchonnet, A. Thoma, F. Sacher, Selective and trace determination of monochloramine in river water by chemical derivatization and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis, *Talanta.* 140 (2015) 189–197. doi:10.1016/j.talanta.2015.03.043.
- [199] C. Shang, E.R. Blatchley, Differentiation and quantification of free chlorine and inorganic chloramines in aqueous solution by MIMS, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2218–2223. doi:10.1021/es9812103.
- [200] R.A. Gimeno, C. Aguilar, R.M. Marcé, F. Borrull, Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 915 (2001) 139–147. doi:10.1016/S0021-

- 9673(01)00619-7.
- [201] L. Piedra, A. Tejedor, M.D. Hernando, A. Aguera, D. Barcelo, A. Fernández-Alba, Screening of antifouling pesticides in sea water samples at low ppt levels by GC-MS and LC-MS, *Chromatographia*. 52 (2000) 631–638. doi:10.1007/BF02789763.
- [202] G. Gatidou, A. Kotrikla, N.S. Thomaidis, T.D. Lekkas, Determination of the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector, *Anal. Chim. Acta*. 528 (2005) 89–99. doi:10.1016/j.aca.2004.10.012.
- [203] A.Q. Zhang, K.M.Y. Leung, K.W.H. Kwok, V.W.W. Bao, M.H.W. Lam, Toxicities of antifouling biocide Irgarol 1051 and its major degraded product to marine primary producers, *Mar. Pollut. Bull.* 57 (2008) 575–586. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.01.021.
- [204] M.A. Sheikh, F.S. Juma, P. Staehr, K. Dahl, R.J. Rashid, M.S. Mohammed, A.M. Ussi, H.R. Ali, Occurrence and distribution of antifouling biocide Irgarol-1051 in coral reef ecosystems, Zanzibar, *Mar. Pollut. Bull.* 109 (2015) 586–590. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.05.035.
- [205] S.J. Lambert, K. V. Thomas, A.J. Davy, Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macrophytes, *Chemosphere*. 63 (2006) 734–743. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.08.023.
- [206] K. Bester, X. Lamani, Determination of biocides as well as some biocide metabolites from facade run-off waters by solid phase extraction and high performance liquid chromatographic separation and tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 5204–5214. doi:10.1016/j.chroma.2010.06.020.
- [207] F. Gallucci, I.B. De Castro, F.C. Perina, D.M. De Souza Abessa, A. De Paula Teixeira, Ecological effects of Irgarol 1051 and Diuron on a coastal meiobenthic community: A laboratory microcosm experiment, *Ecol. Indic.* 58 (2015) 21–31. doi:10.1016/j.ecolind.2015.05.030.
- [208] M.V. Fernandez, P.R. Gardinali, Risk assessment of triazine herbicides in surface waters and bioaccumulation of Irgarol and M1 by submerged

- aquatic vegetation in Southeast Florida, *Sci. Total Environ.* 541 (2016) 1556–1571. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.035.
- [209] A. Saleh, S. Molaei, N. Sheijooni Fumani, E. Abedi, Antifouling paint booster biocides (Irgarol 1051 and diuron) in marinas and ports of Bushehr, Persian Gulf, *Mar. Pollut. Bull.* 105 (2016) 367–372. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.037.
- [210] B.B. Calado, S.M. Ahmad, C. Almeida, N. da R. Neng, J.M.F. Nogueira, Determination of Trace Levels of Irgarol in Estuarine Water Matrices by Bar Adsorptive Microextraction, *J. Chromatogr. Sci.* 54 (2016) 1453–1459. doi:10.1093/chromsci/bmw076.
- [211] I. Ferrer, D. Barceló, Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography – mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 854 (1999) 197–206.
- [212] I. Ferrer, D. Barceló, Identification of a new degradation product of the antifouling agent Irgarol 1051 in natural samples, *J. Chromatogr. A.* 926 (2001) 221–228. doi:10.1016/S0021-9673(01)01068-8.
- [213] I. Giraldez, E. Chaguaceda, M. Bujalance, E. Morales, Determination of five booster biocides in seawater by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1271 (2013) 17–26. doi:10.1016/j.chroma.2012.11.017.
- [214] L.C. Marube, S.S. Caldas, K.L. Soares, E.G. Primel, Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products, *Microchim. Acta.* 182 (2015) 1765–1774. doi:10.1007/s00604-015-1507-7.
- [215] H. Singer, S. Jaus, I. Hanke, A. Lück, J. Hollender, A.C. Alder, Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3054–3064. doi:10.1016/j.envpol.2010.06.013.
- [216] A. Sánchez-Rodríguez, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments., *Chemosphere.*

- 82 (2011) 96–102. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.064.
- [217] Á. Sánchez-Rodríguez, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, An evaluation of antifouling booster biocides in Gran Canaria coastal waters using SPE-LC MS / MS, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (2011) 1166–1177. doi:10.1080/03067310903524848.
- [218] D.A. Lambropoulou, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, Determination of antifouling compounds in marine sediments by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography – mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1010 (2003) 1–8. doi:10.1016/S0021-9673(03)01022-7.
- [219] G. Gatidou, A. Kotrikla, N.S. Thomaidis, T.D. Lekkas, Determination of two antifouling booster biocides and their degradation products in marine sediments by high performance liquid chromatography-diode array detection, *Anal. Chim. Acta.* 505 (2004) 153–159. doi:10.1016/S0003-2670(03)00412-4.
- [220] H. Harino, M. Ohji, G. Wattayakorn, T. Arai, S. Rungsupa, N. Miyazaki, Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51 (2006) 400–407. doi:10.1007/s00244-005-0246-x.
- [221] V.W.H. Tsang, N.Y. Lei, M.H.W. Lam, Determination of Irgarol-1051 and its related s-triazine species in coastal sediments and mussel tissues by HPLC-ESI-MS/MS, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 1462–1471. doi:10.1016/j.marpolbul.2009.06.011.
- [222] Z. Zhang, Z. Chen, S. Wang, C. Qu, L. Chen, On-site visual detection of hydrogen sulfide in air based on enhancing the stability of gold nanoparticles., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6 (2014) 6300–6307. doi:10.1021/am500564w.
- [223] M.N. Hughes, M.N. Centelles, K.P. Moore, Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: A review, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1346–1353. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.018.
- [224] A. Sen, J.D. Albarella, J.R. Carey, P. Kim, W.B. McNamara, Low-cost colorimetric sensor for the quantitative detection of gaseous hydrogen sulfide, *Sensors Actuators, B Chem.* 134 (2008) 234–237.

doi:10.1016/j.snb.2008.04.046.

- [225] J. Sarfraz, D. Tobjork, R. Osterbacka, M. Linden, Low-cost hydrogen sulfide gas sensor on paper substrates: Fabrication and demonstration, *IEEE Sens. J.* 12 (2012) 1973–1978. doi:10.1109/JSEN.2011.2181498.
- [226] N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, Analytical strategies for the detection of sulfide: A review, *Talanta.* 52 (2000) 771–784. doi:10.1016/S0039-9140(00)00421-5.
- [227] K.J. Wallace, S.R. Cordero, C.P. Tan, V.M. Lynch, E. V. Anslyn, A colorimetric response to hydrogen sulfide, *Sensors Actuators, B Chem.* 120 (2007) 362–367. doi:10.1016/j.snb.2006.02.031.
- [228] S.M. Rosolina, T.S. Carpenter, Z.L. Xue, Bismuth-Based, Disposable Sensor for the Detection of Hydrogen Sulfide Gas, *Anal. Chem.* 88 (2016) 1553–1558. doi:10.1021/acs.analchem.5b04489.
- [229] Y. Tanaka, T. Nakamoto, T. Moriizumi, Study of highly sensitive smell sensing system using gas detector tube combined with optical sensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 119 (2006) 84–88. doi:10.1016/j.snb.2005.11.068.
- [230] H.P. Ninh, Y. Tanaka, T. Nakamoto, K. Hamada, A bad-smell sensing network using gas detector tubes and mobile phone cameras, *Sensors Actuators, B Chem.* 125 (2007) 138–143. doi:10.1016/j.snb.2007.01.049.
- [231] A.P. Jarosz, T. Yep, B. Mutus, Microplate-based colorimetric detection of free hydrogen sulfide, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3638–3643. doi:10.1021/ac303543r.
- [232] Z. Yuan, F. Lu, M. Peng, C.-W. Wang, Y.-T. Tseng, Y. Du, N. Cai, C.-W. Lien, H.-T. Chang, Y. He, E.S. Yeung, Selective Colorimetric Detection of Hydrogen Sulfide Based on Primary Amine-Active Ester Cross-Linking of Gold Nanoparticles, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7267–7273. doi:10.1021/acs.analchem.5b01302.
- [233] H. Fu, X. Duan, Highly sensitive and colorimetric detection of hydrogen sulphide by in situ formation of Ag₂S@Ag nanoparticles in polyelectrolyte multilayer film, *RSC Adv.* 5 (2015) 3508–3511. doi:10.1039/C4RA11526K.
- [234] M. Ariza-Avidad, M. Agudo-Acemel, A. Salinas-Castillo, L.F. Capitán-Vallvey,

- Inkjet-printed disposable metal complexing indicator-displacement assay for sulphide determination in water, *Anal. Chim. Acta.* 872 (2015) 55–62. doi:10.1016/j.aca.2015.02.045.
- [235] G. Fang, Z. Liu, C. Liu, K. Yao, Room temperature H₂S sensing properties and mechanism of CeO₂-SnO₂ sol-gel thin films, *Sensors Actuators B Chem.* 66 (2000) 46–48.
- [236] A. Chowdhuri, V. Gupta, K. Sreenivas, Fast response H₂S gas sensing characteristics with ultra-thin CuO islands on sputtered SnO₂, *Sensors Actuators, B Chem.* 93 (2003) 572–579. doi:10.1016/S0925-4005(03)00226-0.
- [237] L.A. Patil, D.R. Patil, Heterocontact type CuO-modified SnO₂ sensor for the detection of a ppm level H₂S gas at room temperature, *Sensors Actuators, B Chem.* 120 (2006) 316–323. doi:10.1016/j.snb.2006.02.022.
- [238] J.M. Lee, B.U. Moon, C.H. Shim, B.C. Kim, M.B. Lee, D.D. Lee, J.H. Lee, H₂S microgas sensor fabricated by thermal oxidation of Cu/Sn double layer, *Sensors Actuators, B Chem.* 108 (2005) 84–88. doi:10.1016/j.snb.2005.01.037.
- [239] M. V. Vaishampayan, R.G. Deshmukh, P. Walke, I.S. Mulla, Fe-doped SnO₂ nanomaterial: A low temperature hydrogen sulfide gas sensor, *Mater. Chem. Phys.* 109 (2008) 230–234. doi:10.1016/j.matchemphys.2007.11.024.
- [240] Z. Zhang, H. Jiang, Z. Xing, X. Zhang, A highly selective chemiluminescent H₂S sensor, *Sensors Actuators, B Chem.* 102 (2004) 155–161. doi:10.1016/j.snb.2004.04.015.
- [241] D.M. Han, Q. Matthew Zhang, M.J. Serpe, Poly (N-isopropylacrylamide)-co-(acrylic acid) microgel/Ag nanoparticle hybrids for the colorimetric sensing of H₂O₂, *Nanoscale.* 7 (2015) 2784–2789. doi:10.1039/C4NR06093H.
- [242] N.A. Burmistrova, R.J. Meier, S. Schreml, A. Duerkop, Reusable optical sensing microplate for hydrogen peroxide using a fluorescent photoinduced electron transfer probe (HP Green), *Sensors Actuators B Chem.* 193 (2014) 799–805. doi:10.1016/j.snb.2013.12.025.
- [243] J.D. Gaynor, A.S. Karakoti, T. Inerbaev, S. Sanghavi, P. Nachimuthu, V.

- Shutthanandan, S. Seal, S. Thevuthasan, Enzyme-free detection of hydrogen peroxide from cerium oxide nanoparticles immobilized on poly(4-vinylpyridine) self-assembled monolayers, *J. Mater. Chem. B.* 1 (2013) 3443. doi:10.1039/c3tb20204f.
- [244] D. Jin, K. Sakthivel, S. Gandhi, B.T. Huy, Y.-I. Lee, An improved non-enzymatic hydrogen peroxide sensor based on europium functionalized inorganic hybrid material—Evaluation of optical and electrochemical properties, *Sensors Actuators B Chem.* 237 (2016) 81–89. doi:10.1016/j.snb.2016.06.078.
- [245] G.J. Zhou, G. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Reagentless chemiluminescence biosensor for determination of hydrogen peroxide based on the immobilization of horseradish peroxidase on biocompatible chitosan membrane, *Sensors Actuators B Chem.* 81 (2002) 334–339. doi:10.1016/S0925-4005(01)00978-9.
- [246] L.H. Zhu, Q. Chang, K.J. Deng, G.D. Jiang, C. Yu, H.Q. Tang, Determination of hydrogen peroxide with the aid of peroxidase-like Fe(3)O(4) magnetic nanoparticles as the catalyst, *Microchim. Acta.* 165 (2009) 299–305. doi:10.1007/s00604-008-0133-z.
- [247] P. Ciaurriz, E. Bravo, K. Hamad-Schifferli, Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates, *J. Colloid Interface Sci.* 414 (2014) 73–81. doi:10.1016/j.jcis.2013.09.039.
- [248] A.K. Dutta, S. Das, S. Samanta, P.K. Samanta, B. Adhikary, P. Biswas, CuS nanoparticles as a mimic peroxidase for colorimetric estimation of human blood glucose level, *Talanta.* 107 (2013) 361–367. doi:10.1016/j.talanta.2013.01.032.
- [249] X. Chen, B. Su, Z. Cai, X. Chen, M. Oyama, PtPd nanodendrites supported on graphene nanosheets: A peroxidase-like catalyst for colorimetric detection of H₂O₂, *Sensors Actuators B Chem.* 201 (2014) 286–292. doi:10.1016/j.snb.2014.04.067.
- [250] J. Sun, J. Ge, W. Liu, M. Lan, H. Zhang, P. Wang, Y. Wang, Z. Niu, Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor., *Nanoscale.* 6 (2014) 255–62. doi:10.1039/c3nr04425d.

- [251] H. Liu, C. Gu, W. Xiong, M. Zhang, A sensitive hydrogen peroxide biosensor using ultra-small CuInS₂ nanocrystals as peroxidase mimics, *Sensors Actuators B Chem.* 209 (2015) 670–676. doi:10.1016/j.snb.2014.12.052.
- [252] S. Teerasong, T. Sonsa-Ard, C. Vimolkajana, N. Choengchan, A. Chompoosor, D. Nacapricha, Colorimetric Sensor Using Silver Nanoparticles for Determination of Hydrogen Peroxide Based on a Flow Injection System, *J. Nanoelectron. Optoelectron.* 8 (2013) 446–449. doi:10.1166/jno.2013.1506.
- [253] J. Liu, L. Lu, A. Li, J. Tang, S. Wang, S. Xu, L. Wang, Simultaneous detection of hydrogen peroxide and glucose in human serum with upconversion luminescence, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 204–209. doi:10.1016/j.bios.2014.12.053.
- [254] Q. Chang, H. Tang, Optical determination of glucose and hydrogen peroxide using a nanocomposite prepared from glucose oxidase and magnetite nanoparticles immobilized on graphene oxide, *Microchim. Acta.* 181 (2014) 527–534. doi:10.1007/s00604-013-1145-x.
- [255] D. Lan, B. Li, Z. Zhang, Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 934–938. doi:10.1016/j.bios.2008.07.064.
- [256] Y. Fan, X. Tan, X. Liu, X. Ou, S. Chen, S. Wei, A novel non-enzymatic electrochemiluminescence sensor for the detection of glucose based on the competitive reaction between glucose and phenoxy dextran for concanavalin A binding sites, *Electrochim. Acta.* 180 (2015) 471–478. doi:10.1016/j.electacta.2015.08.153.
- [257] B. Haghghi, B. Karimi, M. Tavahodi, H. Behzadnia, Fabrication of a nonenzymatic glucose sensor using Pd-nanoparticles decorated ionic liquid derived fibrillated mesoporous carbon, *Mater. Sci. Eng. C.* 52 (2015) 219–224. doi:10.1016/j.msec.2015.03.045.
- [258] M. Honda, K. Kataoka, T. Seki, Y. Takeoka, Confined stimuli-responsive polymer gel in inverse opal polymer membrane for colorimetric glucose sensor, *Langmuir.* 25 (2009) 8349–8356. doi:10.1021/la804262b.
- [259] H. Jang, D.-H. Min, Highly precise plasmonic and colorimetric sensor based

- on enzymatic etching of nanospheres for the detection of blood and urinary glucose, *RSC Adv.* 5 (2015) 14330–14332. doi:10.1039/C4RA15485A.
- [260] H. Choi, J. Naylor, S. Luzio, J. Beutler, J. Birchall, C. Martin, A. Porch, Design and In Vitro Interference Test of Microwave Noninvasive Blood Glucose Monitoring Sensor, *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 63 (2015) 3016–3025.
- [261] R. Li, M. Zhen, M. Guan, D. Chen, G. Zhang, J. Ge, P. Gong, C. Wang, C. Shu, A novel glucose colorimetric sensor based on intrinsic peroxidase-like activity of C60-carboxyfullerenes, *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 502–507. doi:10.1016/j.bios.2013.03.057.
- [262] X.D. Wang, H.X. Chen, T.Y. Zhou, Z.J. Lin, J. Bin Zeng, Z.X. Xie, X. Chen, K.Y. Wong, G.N. Chen, X.R. Wang, Optical colorimetric sensor strip for direct readout glucose measurement, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3702–3705. doi:10.1016/j.bios.2009.05.018.
- [263] Y. Nakabayashi, Y. Hirosaki, O. Yamauchi, Dipolar ruthenium-ammine complexes with 4,4'-bipyridinium ions accessible for both amperometric and colorimetric glucose sensors, *Inorg. Chem. Commun.* 9 (2006) 935–938. doi:10.1016/j.inoche.2006.05.024.
- [264] M.M. Farid, L. Goudini, F. Piri, A. Zamani, F. Saadati, Molecular imprinting method for fabricating novel glucose sensor: Polyvinyl acetate electrode reinforced by MnO₂/CuO loaded on graphene oxide nanoparticles, *Food Chem.* 194 (2016) 61–67. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.128.
- [265] A.Y. Khan, S.B. Noronha, R. Bandyopadhyaya, Impact of structural features of SBA-15 host particles on activity of immobilized glucose oxidase enzyme and sensitivity of a glucose sensor, *J. Porous Mater.* 22 (2015) 369–378. doi:10.1007/s10934-014-9905-5.
- [266] R. Sedghi, Z. Pezeshkian, Fabrication of non-enzymatic glucose sensor based on nanocomposite of MWCNTs-COOH-Poly(2-aminothiophenol)-Au NPs, *Sensors Actuators B Chem.* 219 (2015) 119–124. doi:10.1016/j.snb.2015.04.097.
- [267] S. Yang, G. Li, G. Wang, J. Zhao, X. Gao, L. Qu, Synthesis of Mn₃O₄ nanoparticles/nitrogen-doped graphene hybrid composite for nonenzymatic glucose sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 221 (2015) 172–178. doi:10.1016/j.snb.2015.06.110.

- [268] A. Chen, Y. Ding, Z. Yang, S. Yang, Constructing heterostructure on highly roughened caterpillar-like gold nanotubes with cuprous oxide grains for ultrasensitive and stable nonenzymatic glucose sensor, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 967–973. doi:10.1016/j.bios.2015.07.074.
- [269] R. Prasad, B.R. Bhat, Multi-wall carbon nanotube–NiO nanoparticle composite as enzyme-free electrochemical glucose sensor, *Sensors Actuators B Chem.* 220 (2015) 81–90. doi:10.1016/j.snb.2015.05.065.
- [270] Y. Shen, X. Zhang, X. Huang, Y. Zhang, C. Zhang, J. Jin, X. Liu, H. Li, S. Yao, A new fluorescence and colorimetric sensor for highly selective and sensitive detection of glucose in 100% water, *RSC Adv.* 5 (2015) 63226–63232. doi:10.1039/C5RA11116A.
- [271] F. Hu, Y. Huang, G. Zhang, R. Zhao, D. Zhang, A highly selective fluorescence turn-on detection of hydrogen peroxide and d-glucose based on the aggregation/deaggregation of a modified tetraphenylethylene, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 1471–1474. doi:10.1016/j.tetlet.2014.01.056.
- [272] Y. Yi, J. Deng, Y. Zhang, H. Li, S. Yao, Label-free Si quantum dots as photoluminescence probes for glucose detection, *Chem. Commun. (Camb).* 49 (2013) 612–614. doi:10.1039/c2cc36282a.
- [273] K. Wannajuk, M. Jamkatoke, T. Tuntulani, B. Tomapatanaget, Highly specific-glucose fluorescence sensing based on boronic anthraquinone derivatives via the GOx enzymatic reaction, *Tetrahedron.* 68 (2012) 8899–8904. doi:10.1016/j.tet.2012.08.037.
- [274] X. Xia, Y. Long, J. Wang, Glucose oxidase-functionalized fluorescent gold nanoclusters as probes for glucose, *Anal. Chim. Acta.* 772 (2013) 81–86. doi:10.1016/j.aca.2013.02.025.
- [275] Y.F. Huan, Q. Fei, H.Y. Shan, B.J. Wang, H. Xu, G.D. Feng, A novel water-soluble sulfonated porphyrin fluorescence sensor for sensitive assays of H₂O₂ and glucose, *Analyst.* 140 (2015) 1655–1661. doi:10.1039/C4AN02142H.
- [276] Q. Liu, Y. Ding, Y. Yang, L. Zhang, L. Sun, P. Chen, C. Gao, Enhanced peroxidase-like activity of porphyrin functionalized ceria nanorods for sensitive and selective colorimetric detection of glucose, *Mater. Sci. Eng. C.* 59 (2016) 445–453. doi:10.1016/j.msec.2015.10.046.

- [277] K. Mitra, A.B. Ghosh, A. Sarkar, N. Saha, A.K. Dutta, Colorimetric estimation of human glucose level using γ -Fe 2O₃ nanoparticles: An easily recoverable effective mimic peroxidase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451 (2014) 30–35. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.028.
- [278] M. Ornatska, E. Sharpe, D. Andreescu, S. Andreescu, Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes, *Anal. Chem.* 83 (2011) 4273–4280. doi:10.1021/ac200697y.
- [279] A.S.L. Mendez, V. Weisheimer, T.P. Oppe, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 649–653. doi:10.1016/j.jpba.2004.11.030.
- [280] K.M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M.A. Taracila, R.A. Bonomo, Carbapenems: Past, present, and future, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 4943–4960. doi:10.1128/AAC.00296-11.
- [281] L. Huang, J. Haagensen, D. Verotta, P. Lizak, F. Aweeka, K. Yang, Determination of meropenem in bacterial media by LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 961 (2014) 71–76. doi:10.1016/j.jchromb.2014.05.002.
- [282] S. Bompadre, L. Ferrante, M. De Martinis, L. Leone, Determination of meropenem in serum by high-performance liquid chromatography with column switching, *J. Chromatogr. A.* 812 (1998) 249–253. doi:10.1016/S0021-9673(98)00249-0.
- [283] M. Carlier, M. Noë, J.A. Roberts, V. Stove, A.G. Verstraete, J. Lipman, J.J. de Waele, Population pharmacokinetics and dosing simulations of cefuroxime in critically ill patients: Non-standard dosing approaches are required to achieve therapeutic exposures, *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (2014) 2797–2803. doi:10.1093/jac/dku195.
- [284] M. Beumier, G. Casu, M. Hites, L. Seyler, F. Cotton, J.-L. Vincent, F. Jacobs, F. Taccone, B-Lactam Antibiotic Concentrations During Continuous Renal Replacement Therapy, *Crit. Care.* 18 (2014) R105. doi:10.1186/cc13886.
- [285] R. Denooz, C. Charlier, Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B.* 864 (2008) 161–167.

doi:10.1016/j.jchromb.2008.01.037.

- [286] F. Mattioli, C. Fucile, V. Del Bono, V. Marini, A. Parisini, A. Molin, M.L. Zuccoli, G. Milano, R. Danesi, A. Marchese, M. Polillo, C. Viscoli, P. Pelosi, A. Martelli, A. Di Paolo, Population pharmacokinetics and probability of target attainment of meropenem in critically ill patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 72 (2016) 839–848. doi:10.1007/s00228-016-2053-x.
- [287] M.A. Pfaller, R.N. Jones, A review of the in vitro activity of meropenem and comparative antimicrobial agents tested against 30,254 aerobic and anaerobic pathogens isolated world wide, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (1997) 157–163. doi:10.1016/S0732-8893(97)00065-5.
- [288] S.C. Sweetman, Dose adjustment in renal impairment: response from AHFS Drug Information., *BMJ.* 331 (2005) 293. doi:10.1136/bmj.331.7511.293.
- [289] A.S.. Mendez, M. Steppe, E.E.. Schapoval, Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 947–954. doi:10.1016/S0731-7085(03)00366-2.
- [290] J.M. Serrano, M. Silva, Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1117 (2006) 176–183. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.086.
- [291] K. Ikeda, K. Ikawa, N. Morikawa, M. Miki, S.I. Nishimura, M. Kobayashi, High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma, *J. Chromatogr. B.* 856 (2007) 371–375. doi:10.1016/j.jchromb.2007.05.043.
- [292] Y. Chou, Y.- Yang, J. Chen, C.- Kuo, S. Chen, Quantification of meropenem in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic capillary chromatography and application in bacterial meningitis patients., *J. Chromatogr. B.* 856 (2007) 294–301. doi:10.1016/j.jchromb.2007.06.015.
- [293] S.G. Wicha, C. Kloft, Simultaneous determination and stability studies of linezolid, meropenem and vancomycin in bacterial growth medium by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.* 1028 (2016) 242–248. doi:10.1016/j.jchromb.2016.06.033.

- [294] M. Carlier, V. Stove, J.J. De Waele, A.G. Verstraete, Ultrafast quantification of b-lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 978–979 (2015) 89–94. doi:10.1016/j.jchromb.2014.11.034.
- [295] E.Ç. Demiralay, D. Koç, Y.D. Daldal, G. Alsancak, S.A. Ozkan, Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 660–666. doi:10.1002/bmc.3085.
- [296] S.E. Briscoe, B.C. McWhinney, J. Lipman, J.A. Roberts, J.P.J. Ungerer, A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B.* 907 (2012) 178–184. doi:10.1016/j.jchromb.2012.09.016.
- [297] E. Dailly, R. Bouquié, G. Deslandes, P. Jolliet, R. Le Floch, A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 1137–1142. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.038.
- [298] M. Cohen-Wolkowicz, N.R. White, A. Bridges, D.D. Benjamin, A.D.M. Kashuba, Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Assay of Six Antimicrobials in Plasma for Pharmacokinetic Studies in Premature Infants, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 3497–3506. doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.031.
- [299] B.C. McWhinney, S.C. Wallis, T. Hillister, J.A. Roberts, J. Lipman, J.P.J. Ungerer, Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 2039–2043. doi:10.1016/j.jchromb.2010.05.027.
- [300] T. Ohmori, A. Suzuki, T. Niwa, H. Ushikoshi, K. Shirai, S. Yoshida, S. Ogura, Y. Itoh, Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1038–1042. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.001.
- [301] K. Kameda, K. Ikawa, K. Ikeda, N. Morikawa, A. Nakashima, H. Ohge, T. Sueda, HPLC method for measuring meropenem and biapenem concentrations in human peritoneal fluid and bile: application to

- comparative pharmacokinetic investigations., *J. Chromatogr. Sci.* 48 (2010) 406–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20515537>.
- [302] Reglamento (CE) No 1272/2008 Del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas, 2007.
- [303] J.G. Ibanez, P. Balderas-Hernandez, E. Garcia-Pintor, L. Espinosa-Marvan, R.M. Ruiz-Martin, J.J. Arrieta, M.T. Ramirez-Silva, N. Casillas, *Microscale environmental chemistry. Part 8: Properties, preparation and characterization of chloramines*, *Chem. Educ.* 11 (2006) 402–405. <http://www.chemeducator.org/papers/0011006/11060402ji.pdf>.
- [304] L.M. Schurter, P.P. Bachelor, D.W. Margerum, *Nonmetal Redox Kinetics Mono-Di-Trichloramine Rxns with Cyanide Ion*, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 1127–1134.
- [305] J.S. Nakai, R. Poon, P. Lecavalier, I. Chu, A. Yagminas, V.E. Valli, *Effects of Subchronic Exposure of Rats to Dichloramine and Trichloramine in Drinking Water*, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31 (2000) 200–209. doi:10.1006/rtph.2000.1376.
- [306] J.A. Switzer, V. V. Rajasekharan, S. Boonsalee, E.A. Kulp, E.W. Bohannon, *Evidence that monochloramine disinfectant could lead to elevated Pb levels in drinking water*, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3384–3387. doi:10.1021/es052411r.
- [307] J. Xu, K. Feng, M. Weck, *Free chlorine sensing using an interferometric sensor*, *Sensors Actuators, B Chem.* 156 (2011) 812–819. doi:10.1016/j.snb.2011.02.045.
- [308] Y.H. Chuang, A. Lin, X.H. Wang, H.H. Tung, *The contribution of dissolved organic nitrogen and chloramines to nitrogenous disinfection byproduct formation from natural organic matter.*, *Water Res.* 47 (2013) 1308–16. doi:10.1016/j.watres.2012.11.046.
- [309] M. Gazda, K. Kumar, D.W. Margerum, *Non-metal redox kinetics: Oxidation of bromide ion by nitrogen trichloride*, *Inorg. Chem.* 34 (1995) 3536–3542. doi:10.1021/ic00117a024.
- [310] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, R. Herráez-

- Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez, 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.* 1217 (2010) 2695–2702. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.018.
- [311] Health and Ecological Criteria Division, Drinking Water Criteria Document for Chloramines, 1994. doi:January 1985.
- [312] World Health Organization, Guidelines for Drinking-Water Quality - 4th edition, 2011. doi:10.1016/S1462-0758(00)00006-6.
- [313] Environmental Protection Agency, National primary drinking water regulations, 2009. <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi?Dockey=P100C8XW.txt>.
- [314] International Maritime Organization, Status of multilateral Conventions and instruments in respect of which the International Maritime Organization or its Secretary-General performs depositary or other functions, 2017.
- [315] Diario Oficial de la Unión Europea, Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de agosto de 2013 por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, 2013.
- [316] B.N. Taylor, C. Kuyatt, Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results, 1994.
- [317] D.A. Lambropoulou, V.A. Sakkas, T.A. Albanis, Headspace solid phase microextraction for the analysis of the new antifouling agents Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in natural waters, *Anal. Chim. Acta.* 468 (2002) 171–180. doi:10.1016/S0003-2670(02)00600-1.
- [318] A. Saleh, N. Sheijooni Fumani, S. Molaei, Microfunnel-supported liquid-phase microextraction: Application to extraction and determination of Irgarol 1051 and diuron in the Persian Gulf seawater samples., *J. Chromatogr. A.* 1356 (2014) 32–37. doi:10.1016/j.chroma.2014.06.057.
- [319] A. Vertes, V. Hitchins, K.S. Phillips, Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3858–3866. doi:10.1021/ac2029997.

-
- [320] J.N. Wilking, V. Zaburdaev, M. De Volder, R. Losick, M.P. Brenner, D. a Weitz, Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 848–52. doi:10.1073/pnas.1216376110.
- [321] P. Ramírez, M. Gordón, A. Soriano, S. Gil-Perotin, V. Marti, E.M. Gonzalez-Barbera, M.T. Sanchez-Aguilar, J.A. Simal, J. Bonastre, Assessment of the in vivo formation of biofilm on external ventricular drainages, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32 (2013) 1437–1443. doi:10.1007/s10096-013-1895-8.
- [322] A. Taraszkievicz, G. Fila, M. Grinholc, J. Nakonieczna, Innovative strategies to overcome biofilm resistance, *Microb. Pathog. Strateg. Combat. Them Sci. Technol. Educ.* (2013) 179–187. doi:10.1155/2013/150653.
- [323] O. Rendueles, J.M. Ghigo, Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors, *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2012) 972–989. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- [324] N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35 (2010) 322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- [325] K.L. Credito, L.M. Ednie, P.C. Appelbaum, Comparative antianaerobic activities of doripenem determined by MIC and time-kill analysis, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 365–373. doi:10.1128/AAC.00910-07.
- [326] S. Bigas, P.A. Eloi, M.P. Joaquim, S.A. Audingintraesa, Evaluación de los problemas de olores en las instalaciones de tratamiento de aguas residuales: causas, efectos y soluciones., (n.d.).
- [327] J.M. Morgan, S. Revah, A. Noyola, Malos Olores En Plantas De Tratamiento De Aguas Residuales: Su Control a Través De Procesos Biotecnológicos, (n.d.) 12. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [328] Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR 1926 Safety and Health Regulations for Construction, (n.d.).
- [329] Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR 1915 Occupational Safety and Health Standards for Shipyard Employment, (n.d.).

- [330] Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR 1910 Occupational Safety and Health Standards, (n.d.).
- [331] National Institute for Occupational Safety and Health, Niosh Pocket Guide To Chemical Hazards, (2007).
- [332] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, Límites de Exposición Profesional para Agentes Químicos en España, (2017). www.mdpi.com/journal/sensors.
- [333] M. Okumura, Y. Naoaki, K. Fujinaga, Y. Seike, S. Matsuo, In situ Preconcentration Method for Trace Dissolved Sulfide in Environmental Water Samples using Solid-Phase Extraction Followed by Spectrophotometric Determination, *Anal. Sci.* 15 (1999) 427–431. doi:10.2116/analsci.15.427.
- [334] R.W. Bally, T.C. Gribnau, Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27 (1989) 791–796. doi:10.1515/cclm.1989.27.10.791.
- [335] L. Michaelis, M. Menten, Die kinetic der invertinwirkung, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333–369. doi:10.1021/bi201284u.
- [336] H. Lineweaver, D. Burk, The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658–666. doi:10.1021/ja01318a036.
- [337] C. Liu, Y. Sheng, Y. Sun, J. Feng, S. Wang, J. Zhang, J. Xu, D. Jiang, A glucose oxidase-coupled DNAzyme sensor for glucose detection in tears and saliva, *Biosens. Bioelectron.* 70 (2015) 455–461. doi:10.1016/j.bios.2015.03.070.
- [338] Organizació Mundial de la Salut, Informe Mundial de la diabetes, (n.d.). <http://www.idf.org/node/26452?language=es>.
- [339] D. Li, Y. Sun, S. Yu, C. Sun, H. Yu, K. Xu, A single-loop fiber attenuated total reflection sensor enhanced by silver nanoparticles for continuous glucose monitoring, *Sensors Actuators B Chem.* 220 (2015) 1033–1042. doi:10.1016/j.snb.2015.06.028.
- [340] Q. Fu, Z. Wu, X. Li, C. Yao, S. Yu, W. Xiao, Y. Tang, Biosensors and Bioelectronics Novel versatile smart phone based Microplate readers for on-site diagnoses, *81* (2016) 524–531. doi:10.1016/j.bios.2016.03.049.

-
- [341] H.J. Bright, M. Appleby, The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction The pH Dependence of the Individual Glucose Oxidase Reaction *, 244 (1969) 3625–3634.
- [342] D. Schomberg, M. Salzmann, D. Stephan, Enzyme Handbook, Springer-Verlag, Heidelberg, 1993. doi:10.1007/978-3-642-58903-4.
- [343] J. Pla-Tolós, Y. Moliner-Martinez, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó, Colorimetric biosensing dispositive based on reagentless hybrid biocomposite: Application to hydrogen peroxide determination, Sensors Actuators B Chem. 231 (2016) 837–846. doi:10.1016/j.snb.2016.03.094.
- [344] M. ElKaoutit, I. Naranjo-Rodriguez, M. Domínguez, M.P. Hernández-Artiga, D. Bellido-Milla, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion-Sonogel-Carbon composite, Electrochim. Acta. 53 (2008) 7131–7137. doi:10.1016/j.electacta.2008.04.086.

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

| | |
|---------------------|---|
| ACGIH | American Conference of Governmental Industrial Hygienists |
| APCI | Ionización química a presión atmosférica |
| APHA | American Public Health Association |
| BA μ E | Microextracción por adsorción en barra agitadora |
| CapLC | Cromatografía líquida capilar |
| CIM | Concentración inhibitoria mínima |
| CFP | Huella de Carbono |
| CLP | Clasificación, etiquetado y envasado |
| CMYK | Cian, magenta, amarillo, negro |
| Col. | Colaboradores |
| CPE | Electrodo de pasta de carbono |
| DAD | Detector de fila de diodos |
| DBPs | Subproductos de desinfección |
| DCA | Dicloramina |
| DCAn | 3,4-dicloroanilina |
| DCPMU | 1-(3,4 diclorofenil)-3 metil urea |
| DCPU | 1-(3,4-diclorofenil)urea |
| DePD | N,N-Dietil-p-fenilendiamina |
| DLLME | Microextracción liquido-líquido dispersiva |
| DmPD | N,N-Dimetil-p-fenilendiamina |
| DSPE | Extracción en fase sólida dispersiva |
| e.g. | Por ejemplo (del latín <i>exempli gratia</i>) |
| EDAR | Estación depuradora de aguas residuales |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EPA | Agencia de Protección Ambiental |
| ESI | Sonda de electrospray |
| GC | Cromatografía de gases |
| GHG | Gases de efecto invernadero |
| GL | Grados de libertad |
| GNS | Nanohojas de grafeno |
| GOx | Glucosa oxidasa |
| H ₂ TCPP | 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxil fenil)-porfirina |

| | |
|-----------------------|---|
| H ₂ TEHPPS | Porfirina sulfonada |
| HAQB | Ácido borónico antraquinona |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficacia |
| HRP | Peroxidasa del rábano |
| HSV | Matiz, saturación, brillo |
| i.d. | Diámetro interno |
| i.e. | Es decir (del latín <i>id est</i>) |
| ICP | Plasma acoplado inductivamente |
| IDLH | Inmediatamente peligroso para la salud y la vida |
| INSHT | Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo |
| IT-SPME | Microextracción en fase sólida en tubo |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| K _m | Constante de Michaelis-Menten |
| LC | Cromatografía líquida |
| LD | Límite de detección |
| LED | Diodo emisor de luz |
| LQ | Límite de cuantificación |
| LVI | Gran volumen de inyección |
| LLE | Extracción líquido-líquido |
| M1 | 2- metiltio-4-tert-butilamino-s-triazina |
| MAE | Extracción asistida por microondas |
| MCA | Monocloramina |
| MEPS | Microextracción mediante adsorbentes empaquetados |
| MIMS | Espectrometría de masas de membrana |
| MIP | Método de impronta molecular |
| MNPs | Nanopartículas magnéticas |
| MRM | Monitoreo de reacciones múltiples |
| MS | Espectrometría de masas |
| MWCNTs | Nanotubos de carbono de pared múltiple |
| NDs | Nanodendritas |
| NIOSH | National Institute for Occupational Safety and Health |
| NPs | Nanopartículas |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

| | |
|------------------|--|
| OSHA | Occupational Safety and Health Administration |
| OTT | Columna tubular abierta de atrapamiento |
| PAHs | Compuestos policíclicos aromáticos |
| PDMS | Polidimetilsiloxano |
| PEG | Polietilenglicol |
| PEL | Permissible limit value |
| PLDz | Pistola de DNAzyme |
| ppm | Partes por millón |
| ppm _v | Partes por millón en volumen |
| PVA | Acetato polivinílico |
| PVC | Policloruro de vinilo |
| PVP | Polivinilpirrolidona |
| QDs | Puntos cuánticos |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| REL | Valor límite de exposición recomendado |
| RGB | Rojo, verde, azul |
| RSD | Desviación estándar relativa |
| S/N | Señal/ruido |
| SBA-15 | Partículas de sílice mesoporoso |
| SBSE | Extracción por absorción en barra agitadora |
| SBSDME | Microextracción dispersiva por adsorción sobre barra agitadora |
| SD | Desviación estándar |
| SFO | Solidificación de gotas orgánicas flotantes |
| SGA | Sistema Globalmente Armonizado |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| SPME | Microextracción en fase sólida |
| SWCNTs | Nanotubos de carbono de pared simple |
| TAC | Capacidad antioxidante total |
| TBT | Tributilestaño |
| TCA | Tricloramina |
| TCMTB | 2-(tiocianometiltio)benzotiazol |

| | |
|----------|---|
| TD | Desorción térmica |
| TE | Tubos endotraqueales |
| TEOS | Tetraetilortosilicato |
| TLV-STEL | Valor límite ambiental-Exposición corta |
| TLV-TWA | Valor límite ambiental-Exposición diaria |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzina |
| TMOS | Trietoximetilsilano |
| TOAFMA | Acetato de tetraoctilamonio fluoresceína Hg(II) |
| UCNPs | Nanopartículas de conversión ascendente |
| UV | Ultravioleta |
| Vmax | Velocidad máxima |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Evolución de los métodos de análisis..... | 4 |
| Figura 2. Evolución del número citas sobre la Química Verde en los últimos años. Fuente: Web of Science..... | 7 |
| Figura 3. Representación esquemática del sistema IT-SPME ideado por Eisert y Pawliszyn..... | 13 |
| Figura 4. Evolución del número de citas sobre IT-SPME en los últimos años. Fuente: Web of Science. | 14 |
| Figura 5. Representación esquemática del sistema IT-SPME en la modalidad de carga/expulsión. | 16 |
| Figura 6. Representación esquemática del sistema IT-SPME en válvula. | 17 |
| Figura 7. Representación esquemática de un sistema con dos válvulas en la modalidad de circulación..... | 18 |
| Figura 8. Estructura química del polidimetilsiloxano..... | 26 |
| Figura 9. Evolución del número de publicaciones sobre teléfonos inteligentes usados con aplicaciones analíticas. Fuente: Web of Science. | 33 |
| Figura 10. Estructura química del diurón, irgarol-1051 y sus principales productos de degradación. | 41 |
| Figura 11. Estructura química del meropenem. | 51 |
| Figura 12. Pictogramas de peligro introducidos por el “Reglamento (CE) 1272/2008 de 16 de diciembre de 2008 sobre clasificación, etiquetado y envasado de sustancias y mezclas” conforme al SGA. | 65 |
| Figura 13. Esquema de IT-SPME en válvula acoplado a un sistema de cromatografía líquida capilar. A) Posición de “carga”, B) Posición de “inyección”. | 70 |
| Figura 14: Montaje utilizado para el muestreo pasivo de patrones gaseosos. | 75 |
| Figura 15: Montaje utilizado para el muestreo activo de patrones gaseosos..... | 75 |
| Figura 16. Representación esquemática del montaje utilizado para obtener las imágenes de la placa de 96 pocillos..... | 77 |
| Figura 17. Etapas involucradas en la cloración de las aguas. | 87 |
| Figura 18. Espectro UV-vis del producto de oxidación de la N,N-dietil-p-fenilendiamina. A: Cloro libre, B: Cloro libre + MCA, C: Cloro libre + MCA + DCA. | 90 |
| Figura 19. Variación de la concentración de MCA en función del tiempo. | 91 |
| Figura 20. Variación de la respuesta analítica (área de pico) para la MCA (0.5 mg/L) en función del volumen de muestra procesado. | 93 |

| | |
|---|-----|
| Figura 21. Cromatogramas obtenidos para una disolución de 2 mg/L de MCA usando fases móviles a diferentes pH. | 94 |
| Figura 22. Cromatogramas correspondientes a diferentes disoluciones: blanco, disoluciones patrón, muestras de agua de piscina, muestras de agua de piscina fortificadas y agua de grifo (Volumen procesado: 100 µL)..... | 97 |
| Figura 23. Cromatogramas obtenidos a diferentes longitudes de onda de una disolución de TCA (6 mg/L) a pH=3.5, utilizando una fase móvil MeOH:Tampón pH 3.5. | 99 |
| Figura 24. Variación de la respuesta analítica (área de pico) para el irgarol-1051 (2.5 µg/L) y diurón (12.5 µg/L) en función del porcentaje de grupos difenilo en la fase extractante, para un volumen procesado de 1mL..... | 103 |
| Figura 25. Variación de la respuesta analítica (área de pico) para el irgarol-1051 (2.5 µg/L) y diurón (12.5 µg/L) en función del volumen de muestra procesado. (Fase extractante de TRB-35 y longitud del capilar de 100 cm). | 104 |
| Figura 26. Cromatograma obtenido en condiciones experimentales óptimas para una mezcla de diurón (12.5 µg/L) e irgarol-1051 (2.5 µg/L)..... | 105 |
| Figura 27. Zonas seleccionadas para el muestreo de irgarol-1051 y diurón. | 107 |
| Figura 28. Cromatograma obtenido en la muestra 1. En el recuadro se representa el espectro UV-vis del pico $t_r = 8.7$ minutos, correspondiente al irgarol-1051. | 108 |
| Figura 29. Variación de la respuesta analítica (área de pico) obtenida para el irgarol-1051 (2.5 µg/mL) y diurón (10 µg/mL) después de ser sometidos a un proceso de fotoalteración. | 110 |
| Figura 30: Proceso de formación de un biofilm. 1: Transporte y adhesión, 2: Adhesión irreversible, 3: Formación de la microcolonia, 4: Maduración del biofilm, 5: Dispersión de las células. | 116 |
| Figura 31. Respuesta analítica obtenida en función del volumen de muestra procesado. | 118 |
| Figura 32. Representación esquemática de las diferentes etapas implicadas en el análisis de los tubos endotraqueales. 1: Muestreo, 2: Extracción, 3: Centrifugación, 4: Filtrado, 5: Inyección en el sistema IT-SPME-CapLC-DAD. | 120 |
| Figura 33. Cromatogramas obtenidos para la muestra TE010 y una disolución patrón de meropenem. En el recuadro se muestra el espectro UV del meropenem. | 121 |
| Figura 34. Reacción entre el sulfuro de hidrógeno, N,N-dimetil-p-fenilendiamina y Fe (III) para formar el azul de metileno. | 125 |
| Figura 35. Esquema del método propuesto para la determinación de sulfuro de hidrógeno y ácido sulfhídrico..... | 125 |
| Figura 36. Portafiltros utilizado para inmovilizar el soporte de celulosa. | 126 |
| Figura 37. Aspecto del sensor en las diferentes etapas del proceso: (A) reactivos inmovilizados, (B) después de ser expuesto a H ₂ S, (C) después del lavado..... | 127 |

| | |
|---|-----|
| Figura 38. Coloración presentada por los sensores después de ser expuestos a diferentes concentraciones S^{2-} en agua..... | 129 |
| Figura 39. Espectros de reflectancia difusa obtenidos después de exponer los sensores a diferentes concentraciones de sulfhídrico en agua..... | 130 |
| Figura 40. Variación de la respuesta analítica obtenida en función del tiempo de muestreo. | 132 |
| Figura 41. Mecanismo de acción del sensor propuesto..... | 140 |
| Figura 42. Reacción de oxidación del TMB con el peróxido de hidrógeno, catalizada por la HRP. | 140 |
| Figura 43. Espectros UV-vis obtenidos en el rango de 5-50 μ M, transcurridos 15 minutos desde la adición del sensor. En color azul se representa el producto de oxidación del TMB ($\lambda=653$ nm) a pH 5.0; El color amarillo después de detener la reacción mediante la adición de H_2SO_4 ($\lambda=450$ nm) a pH 1.0. | 141 |
| Figura 44. Fotografías de los colores obtenidos como consecuencia de la oxidación del TMB. A: color azul ($\lambda=653$ nm), B: color amarillo ($\lambda=450$ nm) y C: blanco. | 142 |
| Figura 45. Curva cinética de la oxidación del TMB en diferentes condiciones a) Todos los reactivos en disolución b) TMB atrapado en PDMS c) TMB atrapado en PDMS-TEOS- SiO_2 NPs. Absorbancia registrada a 653 nm. Condiciones: H_2O_2 : 0.18mM, HRP: 18 ng/mL, TMB: 0.2 mg/sensor (atrapado) y 0.06 mg/mL (en disolución). | 143 |
| Figura 46. Variación de la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. | 147 |
| Figura 47. Ensayo cinético de los diferentes tipos de biosensores desarrollados. A) HPR atrapado, B) HRP adsorbido. Condiciones: la concentración de TMB se fijó en 0.05 mg/ml, mientras que la de H_2O_2 varió; la concentración de H_2O_2 se mantuvo en 0.3 mg/ml y la de TMB se modificó. Los recuadros representan los gráficos de Lineweaver-Burk. | 149 |
| Figura 48. Representación esquemática de los métodos desarrollados para la determinación de glucosa..... | 158 |
| Figura 49. Reacción enzimática en cascada para la determinación de glucosa..... | 159 |
| Figura 50. Influencia del pH en el valor de la respuesta analítica. | 160 |
| Figura 51. Comparación entre dos calibrados obtenidos antes y después de acidificar la disolución..... | 163 |
| Figura 52. Ejemplo de señales obtenidas con distintas concentraciones de glucosa. | 164 |
| Figura 53. Concentración de glucosa obtenida mediante tres procedimientos diferentes en cinco voluntarios..... | 167 |
| Figura 54. Concentración de glucosa obtenida en tres pacientes mediante dos métodos distintos. | 168 |

LISTADO DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Principales características de los métodos de análisis in situ más habituales..... | 22 |
| Tabla 2. Clasificación de los soportes utilizados para la inmovilización de enzimas. | 28 |
| Tabla 3. Características de los principales métodos de inmovilización de enzimas. | 31 |
| Tabla 4. Descripción de los parámetros de los principales modelos de color. | 35 |
| Tabla 5: Métodos analíticos para la determinación de monocloramina..... | 39 |
| Tabla 6. Métodos analíticos para la determinación de biocidas. | 42 |
| Tabla 7. Métodos analíticos para la determinación de sulfuro de hidrógeno..... | 45 |
| Tabla 8. Métodos analíticos para la determinación de peróxido de hidrógeno. | 47 |
| Tabla 9. Métodos analíticos para la determinación de glucosa. | 49 |
| Tabla 10. Métodos analíticos para la determinación de meroperem. | 52 |
| Tabla 11. Listado de reactivos utilizados durante la Tesis y sus pictogramas de peligro (Los pictogramas GHR1 y GHR2 se han omitido debido a que ningún reactivo los incluía en su etiqueta). | 66 |
| Tabla 12. Condiciones experimentales utilizadas en los análisis de compuestos mediante IT-SPME-Cap-DAD. | 71 |
| Tabla 13. Muestras analizadas con sus respectivos analitos. | 81 |
| Tabla 14. Diferentes métodos de síntesis de MCA descritos en la bibliografía. | 88 |
| Tabla 15. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de MCA utilizando diferentes volúmenes de inyección. | 95 |
| Tabla 16. Concentraciones de MCA determinadas en diferentes muestras, mediante el método colorimétrico con DPD y IT-SPME-CapLC..... | 96 |
| Tabla 17. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de diurón e irgaron-1051. | 106 |
| Tabla 18. Concentraciones de irgarol-1051 y diurón obtenidas en las diferentes muestras de agua analizadas mediante el método IT-SPME-CapLC-DAD..... | 109 |
| Tabla 19: Parámetros analíticos y huella de carbono para diferentes métodos propuestos para el análisis de biocidas. | 112 |
| Tabla 20. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de meropenem mediante IT-SPME-CapLC-DAD. | 119 |
| Tabla 21. Concentración de meropenem obtenida en los diferentes tubos endotraqueales analizados..... | 121 |
| Tabla 22. Efectos sobre la salud causados por la exposición a diferentes concentraciones de sulfuro de hidrógeno..... | 123 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 23. Valores límite para el sulfuro de hidrógeno propuestos por distintas organizaciones. | 124 |
| Tabla 24. Parámetros analíticos obtenidos mediante reflectancia difusa. | 133 |
| Tabla 25. Parámetros analíticos obtenidos mediante CMYK. | 134 |
| Tabla 26. Concentraciones de S^{2-} obtenidas en diferentes zonas de EDAR. | 135 |
| Tabla 27. Concentraciones de sulfuro de hidrógeno obtenidas en diferentes zonas de una EDAR. 1: decantador, 2: tanque de homogeneización, 3: desbaste, 4: rebosador, 5: digestor. | 137 |
| Tabla 28. Parámetros cinéticos relativos a la actividad de la HRP en diferentes configuraciones. | 150 |
| Tabla 29. Parámetros analíticos obtenidos en las diferentes configuraciones ensayadas. | 151 |
| Tabla 30. Concentración de H_2O_2 obtenida en los distintos productos analizados mediante las diferentes conformaciones ensayadas. | 152 |
| Tabla 31. Concentraciones de glucosa en sangre en personas sanas y con diabetes. | 156 |
| Tabla 32. Parámetros analíticos obtenidos para los diferentes métodos de determinación de glucosa. M1: disolución, M2: biosensor individual (prototipo), M3: biosensor múltiple. | 165 |

ANEXOS

Selective and sensitive method based on capillary liquid chromatography with in-tube solid phase microextraction for the determination of monochloramine in water

Journal of Chromatography A 1388 (2015) 17-23



Selective and sensitive method based on capillary liquid chromatography with in-tube solid phase microextraction for determination of monochloramine in water



J. Pla-Tolós, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, Burjassot, Valencia) Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2014
Received in revised form 6 February 2015
Accepted 10 February 2015
Available online 16 February 2015

Keywords:

Monochloramine synthesis and determination
In-tube solid phase microextraction
Capillary liquid chromatography
Water samples

ABSTRACT

Due to the difficulties of working with chloramines, a critical examination of monochloramine standard preparation has been performed in order to select the best synthesis conditions. The analyte has been determined by in-tube solid phase extraction coupled to capillary liquid chromatography with UV detection (IT-SPME Capillary LC DAD). Potential factors affecting the response of monochloramine such as the pH of mobile phase and the volume of sample processed by IT-SPME Capillary LC DAD have been investigated and optimized. According to the results of the study, 0.1 mL or 4.0 mL of sample at neutral pH were loaded in the chromatographic system. A sensitive and selective method has been developed for the determination of monochloramine in water. Validation of the method has been performed. The linear range was 0.09–5 mg/L with linear regression coefficients (R^2) greater than 0.995. Method reproducibility expressed as relative standard deviation (RSD, %) was lower than 15%. The limits of detection (LODs) were 0.029 and 0.01 mg/L by processing 0.100 mL or 4 mL of the samples, respectively, being below the maximum residues levels allowed for this compound. The sensitivity achieved by the developed method was better than that obtained by the reference method. The developed method was applied to water samples (tap and swimming pool water).

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chloramines are nitrogen compounds with one, two or three chlorine atoms attached to a nitrogen atom [1]. Monochloramine is a weak disinfectant and a stable oxidant, so it can be used as a secondary disinfectant [2–4], while dichloramine and trichloramine are considered by-products [2] obtained after chlorine based treatment [3–8].

In aqueous solutions inorganic chloramines are formed according to the equations described below [3,5,8,10]:



The concentration of these chloramines depends on the pH, temperature and chlorine-to-nitrogen ratio [8,10,11]. The optimal pH

for monochloramine formation lies within the range 7.5–9 (the rate of its formation reaction reach the maximum at pH 8.3) and Cl/N mass ratio of 3:1–5:1 [2]. NHCl_2 presents its maximum kinetic at pH around 4.5, and at lower pHs only NCl_3 is formed. Under normal environmental conditions of pH (between 7 and 8) and 20 °C temperature, monochloramine is the predominant chloramine and it is relatively persistent, with half lives of 0.4–17.5 days in river water, and 2–9 days in drinking water [2,4]. However, for high chlorine-to-nitrogen ratios, breakpoint process takes place, which consists of chloramines and ammonia oxidation [7,10].

The study of chloramines is problematic because there are not standard solutions of inorganic chloramines commercially available, so they have to be prepared in aqueous solution and standardized by analytical methods [2]. The chloramine synthesis has strong dependence on the experimental conditions, so the concentrations obtained might vary depending on the reaction conditions.

Some of the methods proposed for the determination of NH_2Cl are standard analytical methods available to quantify chloramines and free chlorine [8]. Table 1 summarizes the main analytical properties of the methods proposed in the literature to determine monochloramine. Usually, most of these methods suffer from a lack

* Corresponding author. Tel.: +34 96 3543002; fax: +34 96 3544402.
E-mail address: pilar.campins@uv.es (P. Campíns-Falcó).

Table 1
Main analytical properties of different analytical methods proposed for monochloramine in the bibliography.

| Analysis method | Interferences | Pre-treatment | LOD | Ref. |
|--------------------------------------|---|-----------------------------|---|----------|
| Iodometric I | Oxidizing and reducing agents | Redox reaction with reagent | 0.040 mg Cl ₂ /L 1 mg/L cannot be determined accurately | [23] |
| Iodometric II | Oxidizing and reducing agents, organic chloramines and metals. | – | – | [23] |
| Low-Level Amperometric Titration | Nitrogen trichloride, chlorine dioxide, organic chloramines, or halogens. | – | 0.010 mg Cl ₂ /L | [23] |
| DPD Ferrous Titrimetric | Oxidized manganese | Redox reaction with reagent | 0.0 18 mg Cl ₂ /L | [23] |
| DPD Colorimetric Method | Sample colour and turbidity, organic contaminants, oxidizing agents | Redox reaction with reagent | 0. 025 mg Cl ₂ /L | [24] |
| Syringaldazine (FACTS) | Interferences common to other methods do not affect the FACTS procedure | Redox reaction with reagent | 0.1 mg Cl ₂ /L | [23] |
| Iodometric Electrode | Oxidizing agents | – | – | [23] |
| Monochlor F (Indophenol reaction) | – | Derivatization | 0.27 mg Cl ₂ /L | [20] |
| Salicylate-spectrophotometry | Aniline | Derivatization | – | [8] |
| HPLC without chemical derivatization | – | – | 0.08–0.43 mg Cl ₂ /L 0.33 mg Cl ₂ /L | [11][22] |
| HPLC with pre-column derivatization | – | Derivatization | 7.1 mg Cl ₂ /L | [12,14] |
| HPLC with post-column derivatization | – | Redox reaction | 0.01 mg Cl ₂ /L | [15] |
| Gas Chromatography | – | Derivatization | 0.001 mg Cl ₂ /L | [16] |
| MIMS | – | – | 0.1 mg Cl ₂ /L | [9] |

of specificity because many compounds, like organic chloramines, free halogens or oxidizing and reducing agents, can modify the result of the analysis and provide false positive signals [2,8,9]. To solve this problem, more specific methods based on techniques that use physicochemical properties of the analytes, have been developed. By using HPLC, the different compounds can be separated and detected using the natural properties (redox or absorption) of the chloramines, or after a pre- or post-column derivatization. Hilin Ge et al. [11] performed an HPLC procedure for the determination of trace amounts of chloramines and compared UV photometry and electrochemistry detection. Reagents such as 5-(dimethylamino)-naphthalene-1-sulfinic acid [12], sodium benzenesulfonate [13] and 2-mercapto-benzothiazole [14] have been proposed for pre-column derivatization. KI is to date the only chemical reagent used for post-column derivatization in HPLC analysis. The resulting triiodide ions (I₃[−]) are electrochemically detected or by spectrophotometry [15]. Gas chromatography (GC) has been used to determine trichloramine in drinking water using a quadrupole MS operating in selected-ion monitoring (SIM) mode, but this study did not include monochloramine [16]. To make it suitable for GC analysis, monochloramine must be transformed into a volatile derivative by a prior chemical derivatization. Thereby, these methods are complex, time consuming and subject to the risk of sample contamination or monochloramine losses [17,18]. Finally, membrane introduction MS allows the detection and quantitation of inorganic chloramines in water samples without prior sample treatment [9,19].

Concerning to NH₂Cl (Table 1), some procedures have been established for the direct determination of NH₂Cl based on the Berthelot's method [20].

After a revision of the proposed methods for NH₂Cl determination, it can be concluded that this determination presents certain limitations, which are the lack of agreement between different authors for the synthesis of monochloramine and, in many cases, the lack of selectivity of the used procedures for its determination.

The conditions proposed for the synthesis (Table 2) can affect the concentration of the chloramine in the initial solution and also its stability.

Considering these aspects, the main objectives of this study were, (i) to review and to perform a critical examination of monochloramine standard preparation method, and (ii) to develop a rapid and simple procedure to improve the sensitivity and selectivity. In order to achieve these goals, IT-SPME Capillary LC procedure has been developed. IT-SPME allows the preconcentration of the sample and, coupled with capillary chromatographic systems, improves the sensitivity. By using this approach, the analytes do not require derivatization nor any other treatment prior to analysis, and samples can be directly injected in the equipment. Finally, the proposed procedure has been applied to determine NH₂Cl in real water samples (tap and swimming pool water). This methodology provides high speed analysis with low solvent consumption and waste generation [21].

2. Experimental

2.1. Reagents and standard solutions

All reagents used in this study were of analytical grade. Nanopure water obtained using Nanopure II system (Barnstead, USA) was used for preparation and dilution of all solutions.

Ammonium stock standard solution was prepared from ammonium chloride (Probus, Barcelona, Spain).

Sodium hypochlorite solution was obtained by diluting commercially available NaOCl solution (Scharlau, Barcelona, Spain). Methanol was of HPLC grade (Romil-SpS super purity Solvent, Cambridge, UK). Potassium iodate, sodium oxalate and orthophosphoric acid were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Potassium permanganate, nitroprusside and sodium hydrogencarbonate were obtained from Probus (Barcelona, Spain). Sulphuric acid was purchased from Fluka Chemike (Buchs, Switzerland).

Table 2
Conditions used by different authors for monochloramine synthesis.

| Comp. N | Comp. Cl | Rel. Cl/N (mol) | pH | Buffer | Ref. |
|--------------------|-----------------|-----------------|-------|-------------|------|
| NH ₄ Cl | NaClO | 1: 1.25 | 8 | Phosphate | [8] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1: 1.03 | 10 | NaOH | [9] |
| NH ₃ | NaClO | 1:1.1 | – | – | [26] |
| NH ₄ OH | Cl ₂ | 1: 1 | 8.5 | Bicarbonate | [27] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1:1.25–50 | > 8.5 | – | [28] |
| NH ₄ OH | NaClO | – | 9 | Bicarbonate | [4] |
| NH ₄ OH | NaClO | – | 8 | Bicarbonate | [29] |
| NH ₃ | NaClO | 1:5 | 8.5 | – | [30] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1:1.03 | 10 | Phosphate | [31] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1:1 | – | – | [32] |
| NH ₄ Cl | NaClO | 1: 1.2 | 11 | Phosphate | [33] |
| NH ₃ | NaClO | 1:1 | – | – | [34] |

Thymol was obtained from Riedel-de Hæn (Seelze, Germany). Potassium iodide was purchased from Guinama (Valencia, Spain). Potassium hydrogen phosphate was acquired from Merk (Darmstadt, Germany). Sodium hydroxide from J.T. Baker (Deventer, Holland) was also used.

2.2. The standard preparation and stabilization studies

Monochloramine standard solutions were prepared daily by mixing a sodium hypochlorite solution with an ammonium chloride solution in which ammonia to chlorine molar ratio was 1.25:1; the pH of the mixture was adjusted to 8 with phosphate buffer 1 M. Then, these solutions were stored in aluminium foil-covered vials [8].

The monochloramine solutions were standardized by using the DPD colorimetric [23], iodimetric [25] or Berthelot's methods [20].

To study the stability of the solutions of monochloramine, a standard solution of this compound was prepared and the analytical signal (absorbance) obtained by applying the DPD colorimetric method at different times (between 1 min and 48 h) and at room temperature was measured. The kinetic data were obtained in order to test the stability of this solution.

Trichloramine standard solutions were prepared daily by mixing a sodium hypochlorite solution with an ammonium chloride solution at ammonia to chlorine molar ratio of 3:1 and pH 3.5. Then, the solutions were stored in aluminium foil-covered vials which were totally filled in order to avoid the presence of headspace [2,26].

2.3. Preconcentration step

To study the preconcentration process, different volumes of a solution containing 0.5 mg/L of monochloramine were processed by IT-SPME Capillary LC. In addition different volumes ranging from 0.025 mL to 4 mL containing the same amount of NH₂Cl (0.16 µg) were tested.

The results were compared with those obtained through the direct injection of (25 µL) of standards solutions with concentration ranging (from 2 to 16 mg/L).

2.4. Apparatus and chromatographic conditions

The capillary liquid chromatographic system consisted of a LC isocratic capillary pump (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) and a UV–vis diode array detector (Agilent 1200 series, Waldbronn Germany), equipped with an 80 nL flow cell, and coupled to a data system (Agilent, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation.

Samples were loaded via a six-port injection valve (Rheodyne model 7725) equipped in which the stainless steel loop replaced by a segment a GC capillary column (20 cm × 0.32 mm). The coating 5% diphenyl 95% polydimethylsiloxane (GC TRB-5 from Teknokroma,

Barcelona, Spain) with 3 µm film thickness. The analytical column employed for separation was a Zorbax SB C₁₈ (150 mm × 0.5 mm, 5 µm particle sizes, Agilent).

The chromatographic separation was carried out under isocratic elution mode, using a mobile phase consisting of methanol-phosphate buffer 0.1 M of pH 7 (60:40, v/v) at a flow rate of 3 µL/min. Before use, all solvents were filtered through 0.45 µm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain).

The monochloramine absorbance signals were detected at 240 nm for obtaining the chromatograms. Spectra between 200 and 400 nm were detected for identification purposes. To monitor dichloramine and trichloramine the selected wavelengths were 280 nm and 220, respectively.

Water samples (100 µL) were injected using a 100 µL precision Hamilton syringe.

In order to study the influence of the pH in the behaviour of NH₂Cl, mobile phases with different pH were assayed: methanol-0.1 M phosphate buffer at pHs 10, 7 and 3 (60:40 v/v). On the other hand, different wavelengths were selected to monitorize monochloramine (240 nm), dichloramine (280 nm) and trichloramine (220 nm). For this study, the analytical column employed was a Zorbax SB C₁₈ (35 mm × 0.5 mm, 5 µm particle sizes, Agilent).

A Varian Cary 60 UV–vis (Agilent) spectrophotometer with the software Cary Win-UV was also used for the colorimetric methods.

2.5. Water samples

Water samples of different swimming pools in Comunidad Valenciana Region (Spain) were collected using brown glass bottles (250 mL) and stored at 4 °C before their analysis. Tap water samples were also collected. Water samples were directly analysed by the proposed IT-SPME Capillary LC method.

3. Results and discussion

3.1. Preparation of the standard solutions

The NH₂Cl synthesis is mainly dependent on the pH, temperature and the ratio Cl:N. Due to the critical importance of having an accurate standard, an extensive revision of the synthesis conditions described in the literature has been carried out (Table 2). As it can be seen, the standard solutions have been mainly prepared by mixing HClO and NH₄Cl, and stored in dark at 4 °C. The molar ratios Cl/N typically ranged from 1:1 to 1:50. In order to form achieve the maximum reaction yields, pH higher than 8 are recommended while molar ratios of HClO to ammonia are typically <1. Based on the results of Table 2 the conditions proposed by Tao et al. [8] were employed in this work (ammonia to chlorine molar ratio of 1.25:1 using a 1 M phosphate buffer of pH 8 as a reaction medium).

Due to the instability of monochloramine solutions, the decay rate was calculated, and a value of 0.0091 h⁻¹ was obtained at

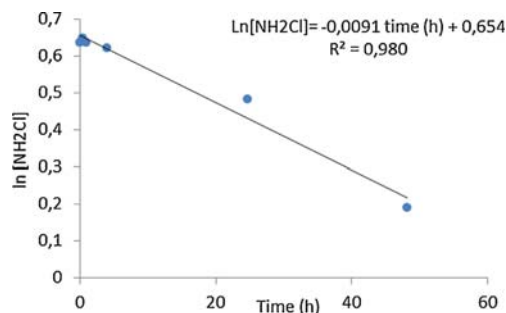


Fig. 1. Graph of Ln [NH₂Cl] vs time (min). Conditions: room temperature and [NH₂Cl] solutions stored in aluminum foil-covered vials. Results obtained by using the DPD colorimetric method.

room temperature. As it can be seen in Fig. 1, these solutions were stable in dark and room temperature during one working day.

In order to determine the concentration of NH₂Cl obtained after the synthesis, the standard solutions were standardized prior to each experiment using three different methods: the DPD colorimetric method [23], Berthelot's method [20] and iodometric method [25]. Statistical analyses of the results obtained by these methods were carried out using SPSS (v. 19.0). By applying Levene's test it was observed that the variances were statistically equivalent (Table 3). Moreover, one-factor ANOVA was used to verify whether the means obtained by the different methods were statistically different ($\alpha < 0.05$) (Table 3). Therefore, an analysis of the results using the t-test for independent samples was applied. The latter test showed that the DPD- Berthelot's method, were statistically equivalent, as well as the DPD- and iodine methods; however, the mean values calculated by the Berthelot's–Iodine methods were statistically different. Based on these results, both the DPD and the Berthelot methods can be used for NH₂Cl standardization. According to the results obtained by the different quantification methods applied, the formation of monochloramine reached near 100% rate conversion in less than one minute.

Table 3
Statistical parameters obtained by comparison of the different standardization methods.

| Levene statistic | gl1 | gl2 | Significance | | |
|--------------------------------|-----|--------|--------------|-------|--------------|
| 2.457 | 2 | 5 | 0.181 | | |
| One-factor ANOVA | | | | | |
| Method | N | Mean | Deviation | F | Significance |
| DPD | 3 | 2.41 | 0.05 | 7.466 | 0.032 |
| Berthelot | 3 | 2.33 | 0.05 | | |
| Iodine | 3 | 2.5 | 0.1 | | |
| t-Test for independent samples | | | | | |
| Method | N | t | Significance | | |
| DPD/Iodine | 3 | -2.054 | 0.132 | | |
| | 3 | | | | |
| DPD/Berthelot | 3 | 2.325 | 0.085 | | |
| | 3 | | | | |
| Berthelot/Iodine | 3 | -3.437 | 0.041* | | |
| | 3 | | | | |

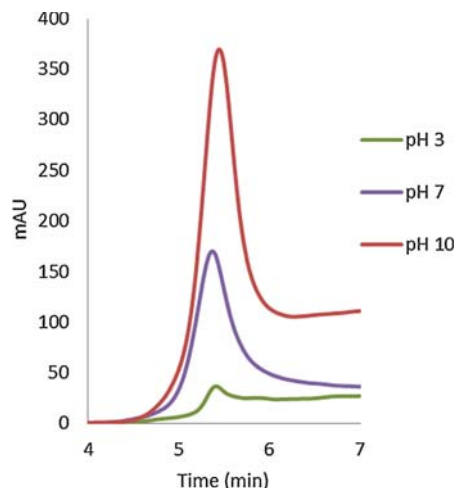


Fig. 2. Chromatograms obtained for NH₂Cl solution (2 mg/L) by using mobile phases at different pHs. For more details see Section 2.

3.2. IT-SPME-Capillary LC

3.2.1. Study of the influence of the mobile phase

As the synthesis and stability of NH₂Cl was dependent on the pH, the influence of the mobile phase pH on the chromatographic signal was studied (Fig. 2). Three mobile phases, prepared at different pHs (3, 7 and 10) with methanol: 0.1 M phosphate buffer (60:40) (v/v), were tested. In all assay the concentration of monochloramine 2.32 mg/L was constant. The results obtained showed that pH of the mobile phase had an important role not only in the formation but also in the determination of the monochloramine. The lower signal was obtained at pH 3 while the highest one was obtained at pH 10. By decreasing the mobile phase pH, the instability of monochloramine increased.

It should be noted that the same procedure could be used to determine NCl₃ by adjusting the mobile phase pH at pH 3.5. Fig. 3 shows the chromatogram obtained for a NCl₃ standard solution. As it can be seen, the highest peak corresponds to the NCl₃ and small

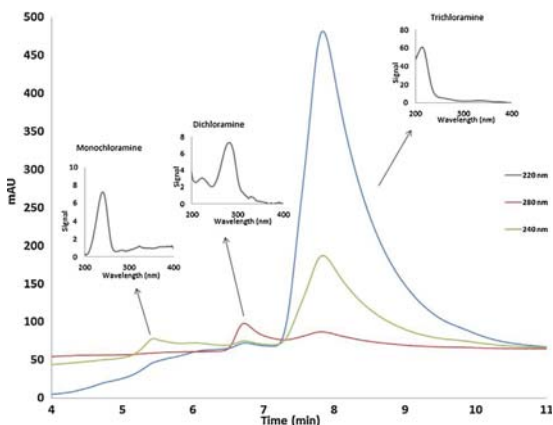


Fig. 3. Chromatograms obtained for NCl₃ (6 mg/L) synthesized at pH=3.5 and mobile phase at pH 3.5. For more details see Section 2.

Table 4
Figure of merit for determination of NH_2Cl by using two different sample volumes.

| Injection volume (μL) | N | Linearity ($y = a + bx$) | | | | Reproducibility RDS (%) | | LOD (mg/L) |
|------------------------------------|---|----------------------------|---------------|-------|------------------------|-------------------------|-----------------|------------|
| | | $a \pm s_a$ | $b \pm s_b$ | R^2 | Linear interval (mg/L) | | | |
| | | | | | | Intraday (n=3) | Interday (n=6) | |
| 100 | 6 | -11 ± 7 | 515 ± 8 | 0.995 | 0.09–5 | 3 ^a | 13 ^b | 0.029 |
| 4000 | 6 | -45 ± 30 | 1057 ± 33 | 0.995 | 0.03–5 | – | – | 0.010 |

^a Established at 0.25 mg L^{-1} .

^b Established at 2 mg L^{-1} .

traces of other chloramines (NHCl_2 and NH_2Cl) were observed. When this solution was injected at higher pHs a decrease in the NCl_3 concentration was also observed. These results were in concordance with those reported by Brunetto et al. [22]. For relatively high concentrations, the retention time and the spectra UV of each chloramine will allow the identification. However, at concentrations approaching the LODs the identification would be based only on the retention time.

Based on the previous results, it can be concluded that chloramines signal is pH dependent, thus the mobile phase needs to be adjusted to the pH of the samples. The sample pH (tap water samples or swimming pools) are normally in the range between 6.5 and 7, thus a mobile phase of pH 7 was used for further studies. Under these conditions the chloramines are present as monochloramine.

3.2.2. Study of the preconcentration step

With the in-tube SPME technique, organic compounds in aqueous samples are directly extracted into the internal coated surface of a capillary; after extraction, the analytes are usually desorbed by the stream of the mobile phase. In this technique, the amount of analyte extracted is dependent on factors such as nature of capillary coating, the sample volume processed and the sample pH. A segment of a GC chromatographic column of TRB-5 was used as the injection loop with an internal volume of $25 \mu\text{L}$. Different sample volumes containing the same amount of analyte ($0.16 \mu\text{g}$) and different volumes of a standard solution containing monochloramine at a concentration of 0.5 mg/L were also assayed. In both instances the volumes tested ranged from 0.025 to 4 mL . When keeping the amount of monochloramine constant, a decrease in the analytical signal was observed by processing increasing volumes of the standard solutions. However, when increasing volumes of standard solution (0.5 mg/L) were passed an increment on the analytical signal (peak area) was observed (see Fig. 4). These results are in accordance with the fundamentals of IT-SPME [35]. Generally, the sample volume processed is high relative to the extracting phase, so the analyte(s) extraction is(are) not exhaustive. However an increment of the sample volume leads to a higher response

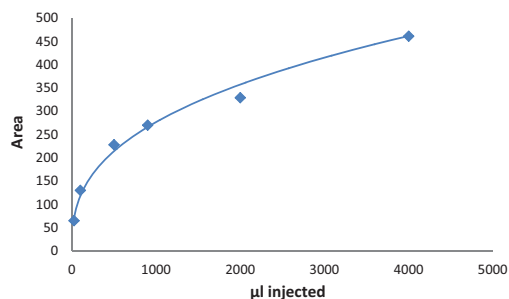


Fig. 4. Graph of the analytical signal (peak area) vs injected volume in the IT-SPME-Capillary LC system (injecting different volumes of the standard solution at concentration level of 0.5 mg/L). For more details see Section 2.

because the absolute amount of analyte extracted at the capillary coating is higher.

The efficiencies of the in-tube SPME step were calculated by comparing the amount of the analyte extracted, which is the amount of the analyte transferred to the analytical column, with the total amount of analyte loaded in the IT-SPME capillary. The amount of analyte extracted was established from the peak areas in the resulting chromatograms and the calibration equations constructed through the direct injection of $25 \mu\text{L}$ of standard solution of the analyte. The absolute recoveries obtained were dependent on the volume processed; as expected for a volume of $100 \mu\text{L}$ the recovery was over 50% while for $4000 \mu\text{L}$ was nearly 10%. However, when processing high volumes, the absolute amount of analyte extracted were higher, and then the signals were higher, even though the recoveries were lower. By processing higher volumes the absolute amount of analyte processed is higher. These results are in accordance with previously published results [36]. In addition, a clean-up step was effected after sample loading in order to check by introducing 0.1 mL of nanopure water before changing the valve position, but a significant loss of analyte was observed. Therefore in further experiments no clean-up was applied.

3.2.3. Analytical parameters

The linear range, sensitivity, precision and accuracy of the method were evaluated. The calibration equations are presented in Table 4. The obtained values indicate that this procedure provides adequate linearity in the working concentration interval (0.09 – 5 mg/L). The repeatability and reproducibility were obtained by calculating the intra- and inter-day (RSD,%), respectively. The RSD% values obtained were 3 and 13, respectively.

The LOD was experimentally determined as the analyte concentration that provided a signal-to-noise ratio of 3, being 0.029 mg/L . The low LOD achieved is a clear advantage of the proposed procedure making unnecessary any other preconcentration step. A threshold limit value for chloramines in water has not been set in the European legislation [37]. However, the World Health Organization (WHO) recommends a limit value of 3 mg/L of monochloramine in drinking water [38], and the Environmental Protection Agency (EPA) establishes a limit value of 4 mg/L , expressed as Cl_2 [39].

Considering the above values $100 \mu\text{L}$ was the sample volume selected for further work. However, if a lower detection limit needs to be reached, a higher sample volume could be used (e.g. by using $4000 \mu\text{L}$, the detection limit was 0.010 mg/L).

When comparing the analytical properties of the proposed method with those achieved by other methods described in the literature (Table 1) it can be concluded that it is a selective method with very low LOD (0.01 mg/L of NH_2Cl or $14 \mu\text{g Cl}_2/\text{L}$). In addition, the proposed procedure does not require any off line sample treatment, and high sample volumes can be directly processed.

3.2.4. Analysis of water samples

Several real samples collected from different swimming-pools located at the Comunidad Valenciana area (Spain) were processed by using the optimized procedure. In order to check the accuracy

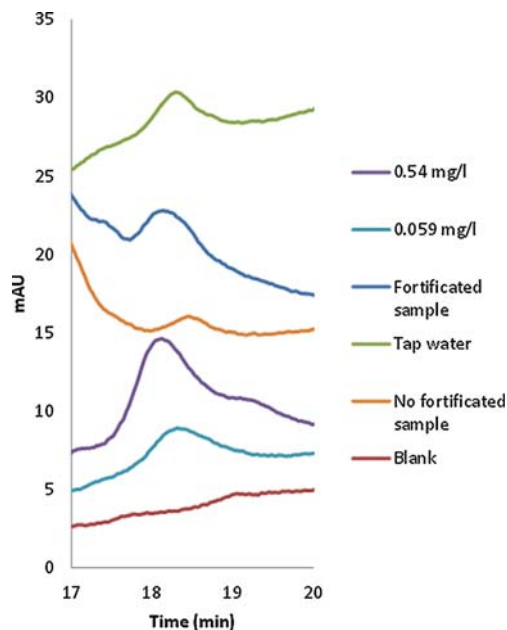


Fig. 5. Chromatograms corresponding to several solutions: blank, standard solutions, swimming pool water sample, fortified swimming pool water sample and tap water sample. Conditions: processed volume of 100 μ l in the IT-SPME Capillary LC DAD. For more details see Section 2.

Table 5

Found concentrations in water samples by the IT-SPME Capillary LC method.

| Sample | IT-SPME Capillary LC (mg $\text{NH}_2\text{Cl}/\text{L}$) |
|-----------------|--|
| Swimming pool 1 | 0.090 \pm 0.011 |
| Swimming pool 2 | 0.069 \pm 0.004 |
| Swimming pool 3 | 0.094 \pm 0.007 |
| Swimming pool 4 | 0.098 \pm 0.009 |
| Tap water | 0.084 \pm 0.012 |

of the method, blank and samples were fortified at a concentration level of 0.3 mg/L. For swimming pool waters, the mean recovery obtained was (81 \pm 6%). The proposed procedure provided good repeatability with RSD% coefficients lower than 15% for spiked samples.

As an example Fig. 5 shows the chromatogram obtained for the standard solution, one swimming pool sample, and such sample fortified with 0.3 mg/L of NH_2Cl .

The concentrations found in the samples are shown in Table 5. ANOVA statistical analysis of the results obtained for the different samples indicated that the results were not statistically equivalent (Fcal 6.068, α = 0.019). These samples were also processed by the DPD colorimetric method; however NH_2Cl could not be quantified.

4. Conclusions

In this work it has been established that the conditions for the synthesis of monochloramine are important in determining the yield of monochloramine formed, as depending on the selected conditions (pH, ratio Cl/N) different types of chloramines (mono-, di- or trichloramine) are synthesized. Therefore, it is essential to have a method that can be used for the standardization in order to determine the concentration of chloramines. The pH dependence of chloramines is important for the selection of the mobile phase

if a chromatographic method is used. A modification of the chloramine signal is observed by modifying the pH of the mobile phase. According to these results, the pH of the mobile phase has to be adjusted to the pH of the sample.

Based on the results, a combination of IT-SPME Capillary LC with diode array detection allows a selective determination of monochloramine at low concentration levels in water samples has been established. The proposed methodology resulted in satisfactory linearity within the working concentration range with satisfactory LOD.

Acknowledgements

The authors thank to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Grant CTQ2011-26760) and to the Generalitat Valenciana (Grants PROMETEO Program 2012/045 and ACOMP/2013/155) for financial support.

References

- [1] Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 84. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Lyon, 2004.
- [2] S. Kinani, B. Richard, Y. Souissi, S. Bouchonnet, Analysis of inorganic chloramines in water, *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 33 (2012) 55–67.
- [3] J. Li, E.R. Blatchley, UV photodegradation of inorganic chloramines, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 60–65.
- [4] P.J. Vikesland, K. Ozeking, R.L. Valentine, Monochloramine decay in model and distribution system waters, *Water. Res.* 35 (2001) 1766–1776.
- [5] K.M. Thickett, J.S. McCoach, J.M. Gerber, S. Sandhra, P.S. Burge, Occupational asthma caused by chloramines in indoor swimming-pool air, *Eur. Respir. J.* 19 (2002) 827–832.
- [6] J. Parrat, G. Donzé, Ch. Iseli, D. Perret, C. Tomicic, O. Schenk, Assessment of occupational and public exposure to trichloramine in swiss indoor swimming pools: a proposal for an occupational exposure limit, *Ann. Occup. Hyg.* 56(2012) 264–277.
- [7] V. Bessonneau, M. Derbez, M. Clément, O. Thomas, Determinants of chlorination by-products in indoor swimming pools, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 215 (2011) 76–85.
- [8] H. Tao, Z.L. Chen, X. Li, Y.L. Yang, G.B. Li, Salicylate-spectrophotometric determination of inorganic monochloramine, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 184–190.
- [9] S. Shang, E.R. Blatchley, Differentiation and quantification of free chlorine and inorganic chloramines in aqueous solution by MIMS, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 2218–2223.
- [10] C. Bogatu, D. Leszczynska, L. Beqa, G. Mosarca, L. Cocheci, Trichloramine formation and decay during breakpoint process, *Chem. Bull. POLITEHNICA Univ (Timisoara)* 55 (2010) 99–102.
- [11] H.L. Ge, G.G. Wallace, R.A.J. Ohalloran, Determination of trace amounts of chloramines by liquid chromatographic separation and amperometric detection, *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 149–153.
- [12] F.E. Scully, J.P. Yang, K. Mazina, F.B. Daniel, Derivatization of organic and inorganic N-chloramines for high-performance liquid-chromatographic analysis of chlorinated water, *Environ. Sci. Technol.* 18 (1984) 787–792.
- [13] F.E. Scully, M.A. Bempong, Organic N-chloramines: chemistry and toxicology, *Environ. Health Persp.* 46 (1982) 111–116.
- [14] M.T. Lukaszewicz, C.M. Bieringer, R.J. Luukkonen, M.E. Fitzsimmons, H.F. Corcoran, S.H. Lin, R.M. Carlson, Analysis of inorganic and organic chloramines: derivatization with 2-mercaptobenzothiazole, *Environ. Sci. Technol.* 23 (1989) 196–199.
- [15] G.A. Gagnon, H. Baribeau, S.O. Rutledge, R. Dumancic, A. Oehmen, C. Chauvet, S. Andrews, Disinfectant efficacy in distribution systems: a pilot-scale assessment, *J. Water Supply Res. T.* 57 (2008) 507–518.
- [16] K. Kosaka, K. Seki, N. Kimura, Y. Kobayashi, M. Asami, Determination of trichloramine in drinking water using headspace gas chromatography/mass spectrometry, *Water. Sci. Technol.* 10 (2010) 23–29.
- [17] D.R. Clark, T.W. Fileman, I. Joint, Determination of ammonium regeneration rates in the oligotrophic ocean by gas chromatography/mass spectrometry, *Mar. Chem.* 98 (2006) 121–130.
- [18] O. Koster, F. Juttner, NH_4^+ utilization and regeneration rates in freshwater lakes determined by GC-MS of derivatised dihydroindophenol, *J. Microbiol. Meth.* 37 (1999) 65–76.
- [19] W. Lee, P. Westerhoff, X. Yang, C. Shang, Comparison of colorimetric and membrane introduction mass spectrometry techniques for chloramine analysis, *Water Res.* 41 (2007) 3097–3102.
- [20] J.D. Laat, N. Budiaf, D. Dossier-Berne, Effect of dissolved oxygen on the photodecomposition of monochloramine and dichloramine in aqueous solution by UV irradiation at 253.7 nm, *Water Res.* 44 (2010) 3261–3269.

- [21] Y. Vitta, Y. Moliner, P. Campins, A. Fernández, An in-tube SPME device for the selective determination of chlorophyll a in aquatic systems, *Talanta* 82 (2010) 952–956.
- [22] M. Brunetto, C. Colin, R. Rosset, *Chromatographie en phase liquide des chloramines*, *Analysis* 15 (1987) 393–398.
- [23] A.E. Greenberg, L.S. Clesceri, A.E. Eaton, *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 18th ed., American Public Health Association, New York, 1992.
- [24] F.E. Scully, A.C. Hartman, A. Rule, N. Leblanc, Disinfection interference in wastewaters by natural organic nitrogen-compounds, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 1465–1471.
- [25] I. Santa María, J. Ibarluze, M. Basterrechea, F. Goñi, E. Ulibarrena, J. Artieda, I. Orruño, Contaminación del aire interior y del agua de baño en piscinas cubiertas de Guipúzcoa, *Gac. Sanit.* 23 (2009) 115–120.
- [26] M.L. Schurtera, P.P. Bachelor, D.W. Margerum, Nonmetal redox kinetics: mono-, di-, and trichloramine reactions with cyanide ion, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 1127–1134.
- [27] J.S. Nakai, R. Poon, P. Lecavalier, I. Chu, A. Yagminas, V. Valli, Effects of subchronic exposure of rats to dichloramine and trichloramine in drinking water, *Regul. Toxicol. Pharm.* 31 (2000) 200–209.
- [28] J. De Laat, N. Boudiaf, F. Dossier-Berne, Effect of dissolved oxygen on the photodecomposition of monochloramine and dichloramine in aqueous solution by UV irradiation at 253.7 nm, *Water Res.* 44 (2010) 3261–3269.
- [29] A. Adachi, K. Matsushita, Y. Yata, T. Okano, Effect of rice bran on the growth inhibition of *selenastrum capricornutum* by chlorine and monochloramine, *J. Health. Sci.* 50 (2004) 613–618.
- [30] J.A. Switzer, V.V. Rajasekharan, S. Boonsalee, E.A. Kulp, E.W. Bohannon, Evidence that monochloramine disinfectant could lead to elevated Pb levels in drinking water, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3384–3387.
- [31] J. Xu, K. Feng, M. Weck, Free chlorine sensing using an interferometric sensor, *Sensors Actuators*. 156 (2011) 812–819.
- [32] J.G. Ibáñez, P. Balderas, E. García, L. Espinosa, R.M. Ruiz, J.J. Arrieta, M.T. Ramírez, N. Casillas, *Microscale environmental chemistry. Part 8: properties, preparation and characterization of chloramines*, *Chem. Educator*. 11 (2006) 402–405.
- [33] Y.H. Cuang, A.Y. Lin, X.H. Wang, H.H. Tung, The contribution of dissolved organic nitrogen and chloramines to nitrogenous disinfection by-products formation from natural organic matter, *Water Res.* 47 (2013) 1308–1316.
- [34] M. Gazda, K. Kumar, D.W. Margerum, Non-metal redox kinetics: oxidation of bromide ion by nitrogen trichloride, *Inorg. Chem.* 34 (1995) 3536–3542.
- [35] H. Kataoka, Automated sample preparation using in-tube solid-microextraction and its application- a review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 31–45.
- [36] P. Campins-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevilano-Cabeza, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martínez, 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*. 1217 (2010) 2695–2702.
- [37] Council Directive 98/83/CE of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of European Communities* (5-12-98) pp. 330–354.
- [38] World Health Organization, *Guidelines for drinking-water quality*, fourth ed., 2011.
- [39] Environmental Protection Agency. *National primary drinking water regulations*. 2009.

A sustainable on-line CapLC method for quantifying antifouling agents like irgarol-1051 and diuron in water samples: Estimation of the carbon footprint

Science of the Total Environment 569-570 (2016) 611-618



A sustainable on-line CapLC method for quantifying antifouling agents like irgarol-1051 and diuron in water samples: Estimation of the carbon footprint



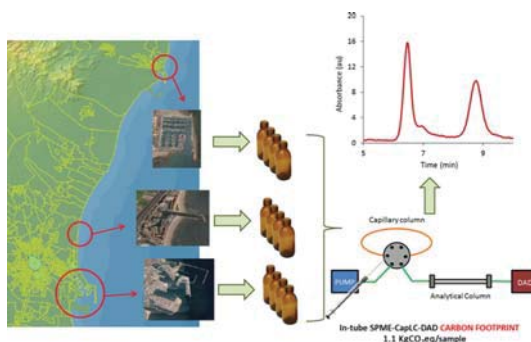
J. Pla-Tolós, P. Serra-Mora, L. Hakobyan, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez*, P. Campins-Falcó*

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de València, C/ Doctor Moliner 50, E46100 Burjassot, Valencia, Spain

HIGHLIGHTS

- Irgarol and diuron are considered priority pollutants due to their harmful effects.
- In-tube SPME-CapLC-DAD has been proposed to determine these compounds.
- The analytical performance was satisfactory to meet the EQS (EU Commission).
- A rather small carbon footprint (1.1 kgCO₂eq) was estimated for the method.
- The proposed procedure is a sustainable and operational efficient methodology.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 May 2016

Received in revised form 21 June 2016

Accepted 22 June 2016

Available online xxxx

Keywords:

Antifouling agents

Capillary LC

Carbon footprint

ABSTRACT

In this work, in-tube solid phase microextraction (in-tube SPME) coupled to capillary LC (CapLC) with diode array detection has been reported, for on-line extraction and enrichment of booster biocides (irgarol-1051 and diuron) included in Water Frame Directive 2013/39/UE (WFD). The analytical performance has been successfully demonstrated. Furthermore, in the present work, the environmental friendliness of the procedure has been quantified by means of the implementation of the carbon footprint calculation of the analytical procedure and the comparison with other methodologies previously reported.

Under the optimum conditions, the method presents good linearity over the range assayed, 0.05–10 µg/L for irgarol-1051 and 0.7–10 µg/L for diuron. The LODs were 0.015 µg/L and 0.2 µg/L for irgarol-1051 and diuron, respectively. Precision was also satisfactory (relative standard deviation, RSD < 3.5%). The proposed methodology

Abbreviations: CapLC, capillary liquid chromatography; DLL-ME-HPLC-MS/MS, dispersive liquid-liquid microextraction-high resolution liquid chromatography-mass spectrometry; EQS, environmental quality standards; GHG, greenhouse gases; HS-SPME, headspace solid phase microextraction; MAC, maximum allowable concentrations; MAE-SPE, microwave assisted solid phase microextraction; MF-LPME, microfunnel liquid phase microextraction; PDMS, polydimethylsiloxane; SBSE-(TD)-GC-MS, stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry; SD-SPME, single drop solid phase microextraction; SPME-CapLC-DAD, solid phase microextraction-capillary liquid chromatography-diode array detection; WFD, Water Framework Directive.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: yolanda.moliner@uv.es (Y. Moliner-Martinez), pilar.campins@uv.es (P. Campins-Falcó).

In-tube solid phase microextraction
Screening
Water samples

was applied to monitor water samples, taking into account the EQS standards for these compounds. The carbon footprint values for the proposed procedure consolidate the operational efficiency (analytical and environmental performance) of in-tube SPME-CapLC-DAD, in general, and in particular for determining irgarol-1051 and diuron in water samples.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The updates of the List of priority pollutants included in the Water Framework Directive (WFD) (European Commission, 2013) have essentially gone in two different directions: to revise the maximum permitted concentrations of some compounds in water and to include new substances considering their potential risks according to adverse effects, total production and environmental exposure levels. One of the new substances included in the list is irgarol-1051. This compound, along with diuron, has been widely employed as booster biocides in antifouling paints to prevent the fouling in surfaces submerged in water (Lam et al., 2005). However, both compounds show high harmful effects to the marine ecosystem (Lam et al., 2006). Additionally, these compounds can be degraded to different transformation products that are potential contaminants as secondary pollution (Fernandez and Gardinali, 2016; Ferrer and Barceló, 2001; Giacomazzi and Cochet, 2004).

The environmental quality standards (EQS) expressed as maximum allowable concentrations (MAC) for irgarol-1051 and diuron are 0.016 µg/L and 1.8 µg/L, respectively (European Commission, 2013). Consequently, the determination of these compounds in water involves extraction, clean-up and preconcentration before the chromatographic analysis. Solid phase extraction (SPE) coupled with HPLC-UV detection or HPLC-MS detection have been reported to determine booster biocides in environmental matrices (Kaonga et al., 2015; Maragou et al., 2011; Piedra et al., 2000; Sánchez-Rodríguez et al., 2011). Fully automated procedures such as SPE coupled on-line with LC-MS have also been investigated (Ferrer and Barceló, 1999; Gimeno et al., 2001; Singer et al., 2010). These systems showed high sensitivity, reproducibility and selectivity not only for biocides but also for multiresidue analysis. Giraldez et al. evaluated stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption (TD)-GC-MS to determine these compounds in sea water with successful results (Giraldez et al., 2013). In addition, microwave assisted extraction followed by SPE (MAE-SPE) and combined with LC-MS/MS has also been proposed to estimate booster biocide in environmental matrices (Sánchez-Rodríguez et al., 2011).

Microextraction based techniques are other alternatives as pretreatment step to extract and preconcentrate booster biocides from environmental samples. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME), SPME and single drop solid phase microextraction (SDSPME) were first utilized (Lambropoulou and Albanis, 2004; Lambropoulou et al., 2002, 2003). More recently, microfunnel-supported liquid-phase microextraction (MF-LPME) coupled to HPLC-UV detection has been described to determine irgarol-1051 and diuron in water samples (Saleh et al., 2014). Moreover, dispersive liquid-liquid microextraction (DLL-ME)-HPLC-MS/MS has also been proposed for these biocides (Marube et al., 2015). In all cases, these techniques are carried out in off-line mode, which yield to long analysis times, especially if the number of samples is high. Therefore, in this context, the use of on-line SPME techniques, such as in-tube solid phase microextraction (in-tube SPME), can be advantageous compared with off-line SPME modalities since it extraction, preconcentration, injection, separation and detection are carried out in a single step. Thus, analysis time is reduced and sensitivity and precision can be improved. In-tube SPME is based on the extraction and preconcentration of the analytes by adsorption or absorption in the inner surface of a capillary column, coated internally with a thin film of

extractive phase, which in turn, is on-line coupled with a chromatographic system. In addition, the coupling of in-tube SPME with miniaturized chromatographic techniques has become a commonly used approach in several applications. The main goals of these couplings are the improvement of column efficiency, enhancement of the sensitivity and reduction of solvents consumption, and so it yield to an environmental friendly procedure (Gou and Pawliszyn, 2000; Moliner-Martínez et al., 2015a; Sun et al., 2015).

In the scenario of environmental friendliness, Green Analytical Chemistry (GAC) emerged in order to mitigate the negative environmental impacts of the analytical procedure (Gałuszka et al., 2013). The sustainability of an analytical method is governed by minimization of toxic solvents, reduction of wastes, employment of energy-efficient and cost-effective methodologies, but maintaining the reliability of the performance parameters, such as sensitivity, precision and accuracy (Turner, 2013). In most of the reported green analytical methodologies the greenness of the procedure is justified by the use of less hazardous solvents or reagents and the reduction of solvents, reagents and wastes. But an analytical process is comprised by different steps influencing each other and so, most of the methods requires at least one reagent, generates waste and, of course, energy is consumed depending on the instrumentation used. However, the energy consumption is neglected in the vast majority of these works. It should be noted that energy consumption is directly related with the emission of greenhouse gases (GHG). Therefore, Analytical Chemistry itself is a GHG emitter contributing to anthropogenic climate change, since these methodologies imply the use of chemicals, waste generation and use of energy depending on the instrumentation. Thus, the assessment of environmental impacts of all the analytical procedure's life, as an actual emitter, is a challenge that must be addressed in order to develop sustainable and green analytical methodologies and to reduce emissions. So, the question is if there is any parameter to quantify the environmental impact of an analytical procedure in order to categorize them as a function of their environmental performance. And the answer could be found in the carbon footprint estimation (MacCuspie et al., 2014; Schmitz et al., 2004) as a metric tool to evaluate the environmental negative impact of a methodology. It is important to remark, that the quantification of the environmental performance is a demand both for routinely analytical procedures and new developments in materials, methodologies or instrumentation.

In this work, we propose an on-line procedure to determine irgarol-1051 and diuron in water samples based on in-tube SPME-CapLC-DAD. The reliability of the proposed method has been demonstrated through the analysis of real water samples. The proposed procedure is an alternative method to determine irgarol-1051 and diuron in water samples according to water quality legislation. The operational efficiency of the proposed methodology has been successfully demonstrated not only estimating the analytical performance but also quantifying the environmental impact by means of the calculation and comparison of the carbon footprint. The main advantages are the elimination of the sample pretreatment step, minimization of analysis time and wastes, reduction of the analysis costs and so, improvement of the analytical and environmental performance. To our knowledge this work represents the first estimation of the analytical methodologies carbon footprints in order to categorize them in terms of GHG emissions.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All reagents were of analytical grade. Irgarol-1051 and diuron were obtained from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Germany). Acetonitrile and methanol were of HPLC grade (Scharlau, Barcelona, Spain).

The stock solutions of the analytes (100 mg/L) were prepared in acetonitrile. Working solutions were prepared by dilution of the stock solutions with water.

2.2. Equipment and chromatographic conditions

The capillary chromatographic system consisted of a LC capillary pump (Agilent 1100 series, Waldbronn, Germany) and a UV–vis diode array detector (Agilent, 1200 series) equipped with a 80-nL flow cell. The wavelength was set at 226 and 254 nm for irgarol-1051 and diuron, respectively. Spectra were recorded between 190 and 400 nm. An injection valve with an internal loop of 2 μ L was used for direct injection of the analytes into the chromatographic system. In the in-tube SPME-CapLC configuration, samples were injected via a six-port injection valve equipped with a GC capillary column which acted as injection loop. Different diphenyl-polydimethylsiloxane (PDMS) based capillary columns (0.32 mm i.d.) with variable percentage of diphenyl groups (50, 35, 20 and 5%, 3- μ m coating thickness) and different lengths (30, 60 and 100 cm) were tested for the in-tube SPME procedure (Teknokroma, Barcelona, Spain).

For the separation of the analytes a Zorbax SB C18 35 mm \times 0.5 mm i.d., 5 μ m column (Agilent) was used. The mobile-phase used was water:acetonitrile 30:70 and the flow-rate was 20 μ L/min. All solvents were filtered through 0.45-mm nylon membranes (Teknokroma) before use.

2.3. In-tube SPME procedure

The capillary column (TRB-50, TRB-35, TRB-20 or TRB-5, with diphenyl percentages of 50, 35, 20 and 5%, respectively) was connected to a conventional six-port injection valve and used as the injection loop. Fig. 1 depicts the schematic diagram of the in-tube SPME-CapLC-DAD device. Capillary connections to valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeves of 1/16 in. PEEK tubing; 1/16-in. PEEK nuts and ferrules were used to complete the connections. 4 mL of standards or samples were manually processed into the system by means of a 1.0-mL

precision syringe. After sample loading, the valve was rotated, so the analytes were desorbed from the extractive phase of the capillary column with the mobile-phase, and transferred to the analytical column for separation and detection (Moliner-Martínez et al., 2010; Pla-Tolós et al., 2015). All the experiments were carried out in triplicate and at room temperature.

2.4. Quality assurance and quality control

The analytes 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 occurred during analysis. Solvent blanks were prepared to run after every five samples. Duplicate matrix spikes were prepared for the water samples.

The limits of detection (LODs) were determined from standards on the basis of a signal-to-noise ratio of 3 ($S/N = 3$). LOQ (limit of quantification) was established considering the criteria: signal-to noise ratio at least 10 and bias from the calibration curve <30%. The six-point standard calibration was conducted before and after each analysis. The lowest point of the calibration curve was the LOQ. 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 <15% for all individual calibration points. The calibration curve was not forced to zero.

As no certified reference materials were available for the analytes and matrices of interest, the recovery from fortified water samples was measured as an alternative to trueness. Briefly, ten samples were independently spiked and analysed. Precision was evaluated ($n = 5$) and expressed as reproducibility by using the relative standard deviation (RSD) (Sanchís et al., 2013).

The quantified concentrations are given as mean \pm expanded uncertainty with $K = 2$ and using the standard deviation of the replicates according to National Institute of Standards and Technology (NIST) (Taylor and Kuyatt, 1994).

2.5. Carbon footprint calculation

The carbon footprint calculations have been based on scope 2 (GHG protocol), using the equation:

$$\text{kg CO}_{2\text{eq}} = \Sigma(\text{quantity of electricity consumed (kWh)} \times \text{emission factor for electricity (kg CO}_2\text{/kWh)})$$

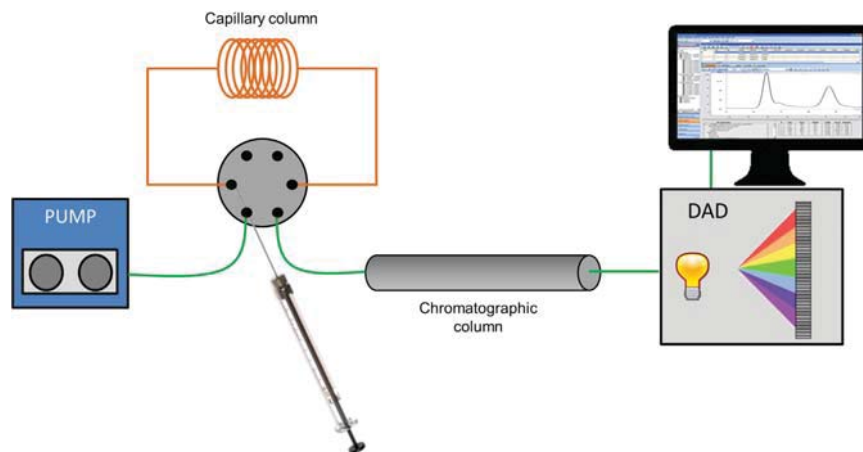


Fig. 1. Schematic diagram of the in-tube SPME-CapLC-DAD system.

The calculation has been carried out considering the energy consumption of each procedure per 100 samples taking into account the analysis times reported in each reference. The reference emission factor 0.247 kg CO₂/kWh has been used (Jiménez et al., 2011). The electricity consumed has been obtained from the apparatus and instruments used in each case (see Table S1 and S2 of the Supporting information).

2.6. Water samples

Sampling was carried out monthly during the period from March to June 2014 in the following ports of the Region of Valencia: Port of Valencia (Valencia, 39° 39.6' N; 18.1' W), marina Port Saplaya (Alboraya, 39° 30' 05" N; 0° 16' 05" W) and marina of Siles (Canet d'En Berenguer, 39° 40' 08" N; 0° 11' 54" W).

Water samples were collected in brown glass flasks previously cleaned with ultrapure water at a depth of 1 m. After the arrival to the laboratory, samples were filtered through 0.45 mm nylon membranes and stored in the dark at 4 °C until analysis. Storage time was less than one week after the sampling. Each sample was analysed by triplicate at room temperature.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the in-tube SPME procedure

In this work, in-tube SPME was performed following the flow-through configuration, where the capillary column was used as the loop of the injection valve and the analytes were extracted during sample loading. After, the analytes were transferred to the analytical column with the mobile phase by changing the valve position. This configuration is especially advantageous for the determination of irgarol-1051 and diuron in water samples since relatively large sample volumes (up to 4 mL) can be processed, and so, the required LODs can be achieved (Moliner-Martínez et al., 2015a).

Herein, initial assays were aimed to optimize the extraction step. The nature of the sorbent phase, the length of the capillary column and the volume of sample processed were evaluated. PDMS based capillary columns with different percentages of diphenyl groups (5, 20, 35 and 50) were investigated. Fig. 2A compares the analytical response (peak area) for irgarol-1051 (2.5 µg/L) and diuron (25 µg/L) with the different sorbent phases when the volume of standard processed was 1 mL. As can be seen, the increase on the diphenyl content gave rise to an increase on the analytical response. However, the sorbent with a 50% of diphenyl groups provided a significant decrease on the peak area. This effect can be attributed to the increment on the polarity of the sorbent phase and so, a decrease in the affinity towards the target analytes. Thus, the sorbent phase TRB-35 was selected for further experiments.

In the following step, the length of the capillary column for in-tube SPME was also studied. For this aim, 1 mL of a working standard solution containing irgarol-1051 (2.5 µg/L) and diuron (25 µg/L) were processed in capillary columns of 30, 60 and 100 cm. As it was expected, the analytical response increased with the length of the capillary column. The analytical response for irgarol-1051 was improved in an 18% and a 57% with the capillary columns of 60 and 100 cm, respectively, compared with the response with the capillaries of 30 cm. In the case of diuron, that improvement was of 36% and 75% with capillary columns of 60 and 100 cm, respectively. However, higher lengths did not improve the analytical response; thus, 100 cm was chosen as the optimal capillary column length.

Sample volumes processed in the manifold up to 4 mL were studied. Fig. 2B shows the results obtained. As can be seen the analytical response for irgarol-1051 increased as a function of the sample volume up to 4 mL. A different behavior was observed for diuron. In this case, the signal increased very slightly from 0.5 to 4 mL more likely due to the co-elution of diuron with the sample in the processing through the capillary column (Campins-Falcó et al., 2010). However, taking into account the EQS standards and the required LOD for regulatory purposes, 4 mL was chosen as the optimum sample volume for further experiments.

In-tube SPME is a flow-through and non-exhaustive microextraction technique, thus low extraction efficiencies (absolute recoveries) can be achieved. However, the improvement in the analytical response is high owing to the large volumes of sample that can be processed through the capillary column (Pawliszyn, 2012). The extraction efficiencies for diuron and irgarol-1051 with the proposed methodology were estimated. These values were calculated by comparing the amount of analyte extracted, which is the amount of the analyte transferred to the analytical column, with the total amount of analyte passed through the TRB-35 extraction capillary. The amount of analyte extracted was established from the peak areas in the resulting chromatograms and from the calibration equations constructed through the direct injection of 2 µL of standard solutions of the analytes. The extraction efficiencies obtained were 3 and 19% for diuron and irgarol-1051, respectively. These values are in accordance with the technique (Campins-Falcó et al., 2010). Fig. 3 shows the chromatogram obtained for a mixture of irgarol-1051 and diuron under the optimum conditions. Retention times and UV-vis spectra were used for the screening and the quantification of the target analytes in water samples.

3.2. Analytical performance

Calibration equations, linear working range, LOD, LOQ and precision data are shown in Table 1 for irgarol-1051 and diuron at 226 and 254 nm, respectively. The results indicated satisfactory analytical performance in the lineal interval 0.05–15 µg/L and 0.7–15 µg/L for

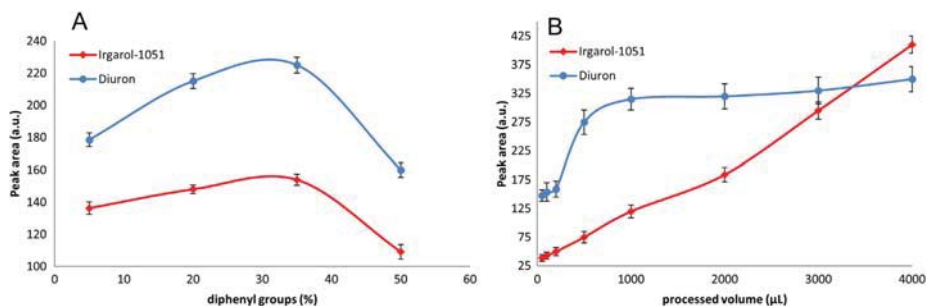


Fig. 2. Variation of the analytical response (peak area) for irgarol-1051 (2.5 µg/L) and diuron (12.5 µg/L) as function of: A) the percentage of diphenyl groups in the polydimethylsiloxane extractive phase. Volume processed 1 mL and capillary length 60 cm; and B) Volume of processed samples, extractive phase TRB-35 and capillary length 60 cm.

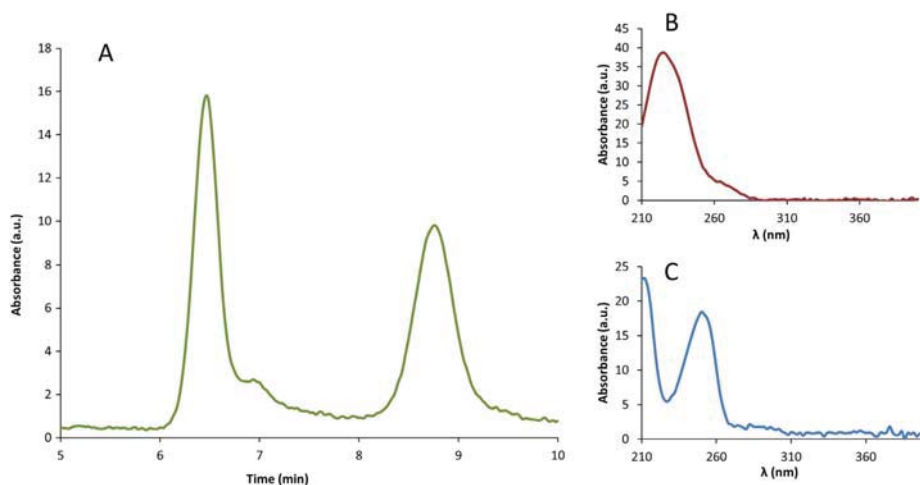


Fig. 3. Chromatogram obtained under the optimum experimental conditions for: A) a mixture of irgarol-1051 (2.5 µg/L) and diuron (12.5 µg/L) under the optimized conditions; B) UV-vis spectra of diuron and C) UV-vis spectra of irgarol-1051.

irgarol-1051 and diuron, respectively. LOD and LOQ for irgarol-1051 were 0.015 and 0.05 µg/L, respectively. In the case of diuron, LOD was 0.2 µg/L and LOQ was 0.7 µg/L. These results showed that the sensitivity reached with the proposed procedure is adequate for regulatory purposes because the LODs are below the maximum levels fixed by the European regulations for irgarol-1051 and diuron in water samples (Directive 2013/39/EU). The precision of the proposed method was evaluated in terms of reproducibility, expressed as relative standard deviation (RSD). The precision for retention times was estimated, and the RSD values for diuron and irgarol-1051 were 0.3 and 0.5%, respectively. The precision of the analytical response was also calculated. As can be seen in Table 1, the intraday RSDs were up to 4% ($n = 3$), which are acceptable values at the working concentration levels.

Table 2 summarizes some experimental details and analytical parameters of previously reported procedures and compares them with the proposed procedure. As can be seen, precision of in-tube SPME-CapLC-DAD is better than that achieved by the other methodologies more likely due to the elimination of off-line sample pretreatment steps. As expected, sensitivity of the proposed procedure is lower than that achieved with SBSE-TD-GC-MS or with on-line-SPE based procedures. The analysis time for the proposed procedure was 10 min. For on-line SPE based methodologies the analysis times were lower than 30 min. Off-line modalities were, in general, more time consuming. Sample volumes were also variable as a function of the extraction technique. Thus, the selection of an analytical procedure depends on the analysis requirements. In-tube SPME-CapLC-DAD is suitable for regulatory purposes in environmental water samples. However, more sensitive approaches would be necessary if the concentration levels are below the LOD of in-tube SPME-CapLC-DAD, i.e. drinking waters.

Table 1

Parameters of the calibration curves and figures of merit for the determination of irgarol-1051 and diuron by in-tube SPME-CapLC-DAD.

| Analytes | Lineal interval (µg/L) | Calibration curve $y = a + bx$ | | R^2 | LOD (µg/L) | LOQ (µg/L) | RSD (%) |
|--------------|------------------------|--------------------------------|--------------|-------|------------|------------|---------|
| | | a | b (µg/L) | | | | |
| Irgarol-1051 | 0.05–10 | 7 ± 70 | 188 ± 14 | 0.995 | 0.015 | 0.05 | 3.2 |
| Diuron | 0.7–15 | 6 ± 4 | 11 ± 1 | 0.998 | 0.200 | 0.70 | 1.5 |

3.3. Carbon footprint and environmental performance

Carbon footprint represents the amount GHG emissions produced by an activity and it is expressed as kg CO₂eq. From a qualitative point of view, in-tube SPME-CapLC-DAD is environmentally friendly since reduces the solvent consumption and the use of toxic reagents (Moliner-Martínez et al., 2015b). However, the lack of a quantitative environmental indicator prevents the real estimation of the environmental impact and the comparison with other methodologies.

In this work, we have implemented the carbon footprint calculation as a quantitative parameter to evaluate in-tube SPME-CapLC-DAD environmental performance and to compare it with different procedures proposed for antifouling agents. Table 2 summarizes previously reported methodologies for the determination of these analytes and includes the calculated carbon footprints of these methodologies. The results indicated that the carbon footprint significantly varies as a function of the sample pretreatment and the separation/detection technique. The lowest carbon footprint (1.10 kgCO₂eq) was achieved with in-tube SPME-CapLC-DAD. The carbon footprints for SPE-HPLC-DAD were 2.20 and 1.8 kgCO₂eq. These values are higher than the in-tube SPME-CapLC-DAD carbon footprint because SPE based procedures requires an additional preconcentration step (evaporation) to reach the LODs, and so the energy consumption increased. Moreover, analysis times, and especially solvents and wastes significantly increased with SPE based procedures, approximately 200–300 mL/100 samples in the sample pretreatment. Meanwhile, in-tube SPME completely eliminates the solvent consumption in this step. On-line SPE based methodologies show higher carbon footprint than in-tube SPME approach, mainly due to the use of MS detection. GC-MS combined with SBSE and HS-SPME were the procedures which provided a high amount of emissions, especially HS-SPME-GC-MS due to the need of fiber conditioning, water bath and stirrers during the sample pretreatment. MF-SPME coupled to SPE also provided a higher value of carbon footprint, and also due to long sample pretreatment time and lack of multi-sample pretreatment. For the aim of this work, the most sustainable analytical procedure is in-tube SPME CapLC-DAD not only because the analytical parameters are adequate but also because the environmental performance is also improved. The success of in-tube SPME-CapLC-DAD is maintaining the reliability of the performance parameters, such as sensitivity, precision and accuracy but reducing the environmental impact

Table 2Estimation of carbon footprints Kg CO₂/100 samples of different analytical procedures proposed for antifouling biocides in water samples.

| Analyte | Sample pretreatment | | Sample Volume (mL) | Separation/Detection | Analysis time (min) | Carbon footprint KgCO ₂ | Analytical performance | | | Reference |
|--|---------------------|-----------------|--------------------|----------------------|---------------------|------------------------------------|------------------------|---------|--------------|---------------------------------|
| | Off-line | On-line | | | | | LOD (µg/L) | RSD (%) | Recovery (%) | |
| Irgarol-1051 Diuron Chlorothalonil Dichlofluanid TCMTB Thiram | SPE | – | 100 | HPLC-DAD | 17 | 1.80 | 0.007–0.415 | <11 | 68–103 | Sánchez-Rodríguez et al. (2011) |
| Irgarol-1051 Diuron Derivates | SPE | – | 500 | HPLC-DAD | 60 | 2.30 | 0.005–0.011 | <14 | 97–116 | Gatidou et al. (2005) |
| Chlorothalonil Dichlofluanid Sea-Nine 211 Irgarol-1051 TCMTB | SBSE | – | 10 | TD-GC-MS | 110 | 16.90 | 0.005–0.900 | <30 | 82–118 | Giraldez et al. (2013) |
| Chlorothalonil Dichlofluanid Sea Nine 211 | SDE | – | 10 | GC-ECD | 55 | 26.30 | 0.0002–0.003 | <8.5 | 78–104 | Lambropoulou and Albanis (2004) |
| Irgarol-1051 Sea Nine 211 | HS-SPME | – | 15 | GC-MS | 80 | 220.00 | 0.010–0.030 | <9 | 82–118 | Lambropoulou et al. (2002) |
| Irgarol-1051 Diuron TCMTB | MF-SPME | – | 300 | HPLC-DAD | 100 | 23.80 | 0.0014–0.0048 | <12 | – | Saleh et al. (2014) |
| Irgarol-1051 Chrothalonil Diuron | SPE | 100 | 100 | LC-APCI-MS | 25 | 19.60 | 0.005–0.01 | 5–10 | 96–111 | Ferrer and Barceló (1999) |
| Irgarol-1051 Folpet Dichlofluanid | SPE | 100 | 100 | LC-APCI-MS | 21 | 17.80 | 0.005–0.2 | <8 | 88–92 | Gimeno et al. (2001) |
| Multiresidue: Biocidal pesticides and Pharmaceuticals | SPE | 20 | 20 | LC-ESI-MS/MS | 26 | 41.10 | 0.003–0.1 | <32 | 62–104 | Singer et al. (2010) |
| Irgarol-1051 Diuron | – | In-tube SPME | 4 | CapLC-DAD | 10 | 1.10 | 0.015 0.200 | <4 | 92–113 | Proposed procedure |

of the analytical methodology. Nevertheless, the particular requirements of each analytical problem will determine the methodology that must be used to solve it. By way of example, if higher sensitivity is required, on-line SPE based methodologies will be preferred although these techniques showed high kg CO_{2eq} values.

3.4. Analysis of water samples

The optimized in-tube SPME-CapLC-DAD procedure was applied to analyze water samples collected in different ports of the region of Valencia at different periods. Retention times, as well as UV-vis spectra, were used to screen the samples. Finally, if necessary, quantification of the positive samples was also carried out. Table 3 shows the samples screened and the quantification results determined by the proposed

procedure. As shown in Table 3, the concentration of diuron was below the LOD in all the ports at any sampling period. Therefore, these sampling points satisfied the European standards regarding with diuron. As can be seen in Table 3, irgarol-1051 was below the LODs except in the case of samples 1 and 2 in Port of Valencia, where the concentrations were 0.02 mg/L, which was near to the value of the LODs for this compound (Fig. 4 shows the chromatogram obtained for sample 1). However, in all cases, it can be considered that these waters met the European standards. The presence of irgarol-1051 at these water samples can be understood taking into account the Port of Valencia is the main port in the Region of Valencia and in Spain, which handles traffic of practically all types of goods from every sector of the economy. In addition, it has regular passenger traffic to and from different points of Spain and Italy. Therefore, this port handles a large maritime traffic. On the

Table 3

Samples screened, quantification results and recoveries from water samples determined by in-tube SPME-CapLC-DAD.

| | | | Concentration (µg/L) | | Recovery (%) | |
|----------------------|-----------|-------|----------------------|--------|--------------|---------|
| | | | Irgarol-1051 | Diuron | Irgarol-1051 | Diuron |
| Port of Valencia | Sample 1 | March | 0.02 | <LOD | 102 ± 9 | 96 ± 4 |
| | Sample 2 | April | 0.02 | <LOD | 110 ± 5 | 100 ± 5 |
| | Sample 3 | June | <LOD | <LOD | 104 ± 6 | 105 ± 6 |
| | Sample 4 | July | <LOD | <LOD | 102 ± 4 | 99 ± 7 |
| Marina Port Saplanya | Sample 5 | March | <LOD | <LOD | 92 ± 5 | 99 ± 4 |
| | Sample 6 | April | <LOD | <LOD | 108 ± 3 | 103 ± 6 |
| | Sample 7 | June | <LOD | <LOD | 113 ± 3 | 96 ± 5 |
| | Sample 8 | July | <LOD | <LOD | 115 ± 6 | 100 ± 8 |
| Port of Siles | Sample 9 | March | <LOD | <LOD | 93 ± 5 | 92 ± 7 |
| | Sample 10 | April | <LOD | <LOD | 98 ± 4 | 105 ± 6 |
| | Sample 11 | June | <LOD | <LOD | 91 ± 8 | 94 ± 8 |
| | Sample 12 | July | <LOD | <LOD | 103 ± 5 | 98 ± 6 |

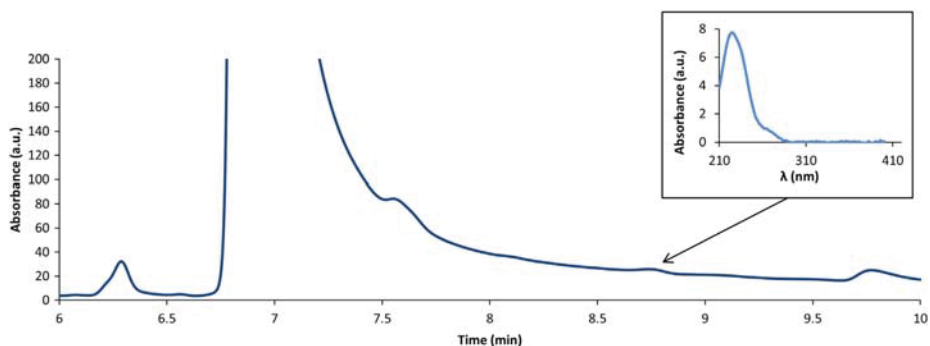


Fig. 4. Chromatogram obtained for sample 1. Inset: UV-vis spectra of peak $t_r = 8.7$ min corresponding to irgarol-1051.

other hand, in the case of Port Saplaya, and Port of Siles, they are marinas and the presence of the analytes would be, more likely, due to a high number of boats and the low recirculation of water.

In order to validate the results obtained, a recovery study was carried out. For these aim, samples were spiked with irgarol-1051 (0.2 $\mu\text{g/L}$) and diuron (1.5 $\mu\text{g/L}$) and analysed following the proposed procedure. Table 3 summarizes the recovery values obtained. The values were between 92 and 105% for all the samples. It should be remarked that these values are within the acceptable range for environmental analysis. These results indicated the absence of matrix effects.

4. Conclusions

In the present work, an alternative methodology consisting of in-tube SPME coupled to CapLC with DAD detection was successfully used to determine booster biocides, irgarol-1051 and diuron, in water samples. This new methodology proved to be effective for on-line extraction and preconcentration of irgarol-1051 and diuron in water samples. The LODs were 0.015 and 0.2 $\mu\text{g/L}$ for irgarol-1051 and diuron respectively and so, it can be used to achieve the quality standards established by the European regulations. In addition, precision was also satisfactory.

Moreover, in this work and for the first time, the carbon footprint of in-tube SPME-CapLC-DAD method has been calculated and compared with the carbon footprint of previously proposed procedures. This parameter has been proposed as a quantitative indicator of the environmental friendliness of a methodology. For regulatory purposes, the results indicated that the most sustainable methodology to determine irgarol-1051 and diuron is in-tube SPME-CapLC-DAD. Hence, in-tube SPME-CapLC-DAD can be an alternative methodology easily implementable and environmental friendly to estimate irgarol-1051 and diuron in environmental water samples. However, this is an ongoing project and further research is still necessary in order to develop metric tools to estimate scope 1 and scope 3 emissions in order to fully categorize analytical procedures.

The new methodology has been applied to evaluated water samples from different ports or marinas in the Region of Valencia. The results showed that irgarol-1051 and diuron were below the LODs and so, water samples met the European quality standards.

Acknowledgements

The authors thank the MINECO-FEDER of Spain (Project CTQ2014-53916-P) and to the Generalitat Valenciana (PROMETEO Program 2012/045). P. Serra Mora expresses his gratitude to the MINECO-FEDER for his FPI grant.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.181>.

References

- Camps-Falcó, P., Verdú-Andrés, J., Sevillano-Cabeza, A., Herráez-Hernández, R., Molins-Legua, C., Moliner-Martínez, Y., 2010. 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* 1217, 2695–2702. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.018>.
- European Commission, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the council of 12 august 2013 amending directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy text with EEA relevance.
- Fernandez, M.V., Gardinali, P.R., 2016. Risk assessment of triazine herbicides in surface waters and bioaccumulation of irgarol and M1 by submerged aquatic vegetation in Southeast Florida. *Sci. Total Environ.* 541, 1556–1571. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.035>.
- Ferrer, I., Barceló, D., 1999. Simultaneous determination of antifouling herbicides in marina water samples by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 854, 197–206.
- Ferrer, I., Barceló, D., 2001. Identification of a new degradation product of the antifouling agent irgarol 1051 in natural samples. *J. Chromatogr. A* 926, 221–228. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01068-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01068-8).
- Gatidou, G., Kotrikla, A., Thomaidis, N.S., Lekkas, T.D., 2005. Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography-diode array detector. *Anal. Chim. Acta* 528, 88–99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.10.012>.
- Gahuszka, A., Migaszewski, Z., Namieśnik, J., 2013. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* 50, 78–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021–1032. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.04.061>.
- Gimeno, R.A., Aguilar, C., Marcé, R.M., Borrull, F., 2001. Monitoring of antifouling agents in water samples by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 915, 139–147. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00619-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00619-7).
- Giraldez, I., Chaguaceda, E., Bujalance, M., Morales, E., 2013. Determination of five booster biocides in seawater by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1271, 17–26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.11.017>.
- Gou, Y., Pawliszyn, J., 2000. In-tube solid-phase microextraction coupled to capillary LC for carbamate analysis in water samples. *Anal. Chem.* 72, 2774–2779. <http://dx.doi.org/10.1021/ac990726h>.
- Jiménez, L., De la Cruz, J., Carballo, A., Domench, J., 2011. Enfoques metodológicos Para el cálculo de la Huella de Carbono. Observatorio de la sostenibilidad en España.
- Kaonga, C.C., Takeda, K., Sakugawa, H., 2015. Antifouling agents and Fenitrothion contamination in seawater, sediment, plankton, fish and selected marine animals from the Seto Inland Sea, Japan. *Geochem. J.* 49, 23–37.
- Lam, K.H., Cai, Z.W., Wai, H.Y., Tsang, V.W.H., Lam, M.H.W., Cheung, R.Y.H., Yu, H.X., Lam, P.K.S., 2005. Identification of a new Irgarol-1051 related s-triazine species in coastal waters. *Environ. Pollut.* 136, 221–230. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2005.01.014>.
- Lam, K.H., Wai, H.Y., Leung, K.M.Y., Tsang, V.W.H., Tang, C.F., Cheung, R.Y.H., Lam, M.H.W., 2006. A study of the partitioning behavior of Irgarol-1051 and its transformation products. *Chemosphere* 64, 1177–1184. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.006>.
- Lambropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2004. Application of solvent microextraction in a single drop for the determination of new antifouling agents in waters. *J. Chromatogr. A* 1049, 17–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.024>.

- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2002. Headspace solid phase microextraction for the analysis of the new antifouling agents Irgarol 1051 and Sea Nine 211 in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 468, 171–180. [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00600-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00600-1).
- Lambropoulou, D.A., Sakkas, V.A., Albanis, T.A., 2003. Determination of antifouling compounds in marine sediments by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography – mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1010, 1–8. [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01022-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01022-7).
- MacCuspie, R.I., Hyman, H., Yakymyshyn, C., Srinivasan, S.S., Dhau, J., Drake, C., 2014. A framework for identifying performance targets for sustainable nanomaterials. *Sustain. Mater. Technol.* 1–2, 17–25. <http://dx.doi.org/10.1016/j.susmat.2014.11.003>.
- Maragou, N.C., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A., 2011. Optimization and comparison of ESI and APCI LC-MS/MS methods: a case study of Irgarol 1051, Diuron, and their degradation products in environmental samples. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22, 1826–1838. <http://dx.doi.org/10.1007/s13361-011-0191-z>.
- Marube, L.C., Caldas, S.S., Soares, K.L., Primel, E.G., 2015. Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products. *Microchim. Acta* 182, 1765–1774. <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-015-1507-7>.
- Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P., 2015a. Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* 71, 205–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.02.020>.
- Moliner-Martínez, Y., Serra-Mora, P., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Campins-Falcó, P., 2015b. 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.* 407, 1485–1497. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-8366-7>.
- Moliner-Martínez, Y., Herráez-Hernández, R., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P., 2010. Improving analysis of apolar organic compounds by the use of a capillary titania-based column: application to the direct determination of faecal sterols cholesterol and coprostanol in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 4682–4687. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.001>.
- Pawliszyn, J., 2012. *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier Inc., Oxford.
- Piedra, L., Tejedor, A., Hernando, M.D., Aguera, A., Barceló, D., Fernández-Alba, A., 2000. Screening of antifouling pesticides in sea water samples at low ppt levels by GC-MS and LC-MS. *Chromatographia* 52, 631–638. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02789763>.
- Pla-Tolós, J., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Campins-Falcó, P., 2015. Selective and sensitive method based on capillary liquid chromatography with in-tube solid phase microextraction for determination of monochloramine in water. *J. Chromatogr. A* 1388, 17–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.02.024>.
- Saleh, A., Sheijooni Fumani, N., Molaei, S., 2014. Microfunnel-supported liquid-phase microextraction: application to extraction and determination of Irgarol 1051 and diuron in the Persian Gulf seawater samples. *J. Chromatogr. A* 1356, 32–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.06.057>.
- Sánchez-Rodríguez, A., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodríguez, J.J., 2011. Applicability of microwave-assisted extraction combined with LC-MS/MS in the evaluation of booster biocide levels in harbour sediments. *Chemosphere* 82, 96–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.064>.
- Sanchis, J., Martínez, E., Ginebreda, A., Farré, M., Barceló, D., 2013. Occurrence of linear and cyclic volatile methylsiloxanes in wastewater, surface water and sediments from Catalonia. *Sci. Total Environ.* 443, 530–538. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.10.047>.
- Schmitz, S., Dawson, B., Spannagle, M., Thomson, F., Koch, J., Eaton, R., 2004. The greenhouse gas protocol – a corporate accounting and reporting standard. Revised ed. The GHG Protocol Corporate Accounting and Reporting Standard 1-56973-568-9.
- Singer, H., Jaus, S., Hanke, I., Lück, A., Hollender, J., Alder, A.C., 2010. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environ. Pollut.* 158, 3054–3064. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.013>.
- Sun, M., Feng, J., Bu, Y., Luo, C., 2015. Highly sensitive copper fiber-in-tube solid-phase microextraction for online selective analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1408, 41–48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.024>.
- Taylor, B.N., Kuyatt, C.E., 1994. Guidelines for evaluating and expressing the uncertainty of NIST measurement results. National Institute of Standards and Technology.
- Turner, C., 2013. Sustainable analytical chemistry—more than just being green. *Pure Appl. Chem.* 85, 2217–2229. <http://dx.doi.org/10.1351/pac-con-13-02-05>.

Supporting information

A sustainable on-line CapLC method for quantifying antifouling agents like irgarol-1051 and diuron in water samples: estimation of the carbon footprint

J. Pla-Tolós, P. Serra-Mora, L. Hakobyan, C. Molins-Legua, Y. Moliner-Martinez*, Pilar Campins-Falcó*

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Valencia.
C/ Doctor Moliner 50, E46100- Burjassot, Valencia. Spain.

2. Material and methods

2.5. Carbon footprint calculation

Table S1 and Table S2 summarize the power of different apparatus and chromatographic systems used for the calculation of carbon footprint. A average power factor of 0.7 was used if necessary.

Table S1. Power of the apparatus.

| | Power (W) |
|---------------------|-----------|
| Centrifuge | 55 |
| Water bath | 1000 |
| Magnetic stirrer | 825 |
| Vacuum station | 230 |
| Nitrogen evaporator | 1750 |

Table S2. Power of the chromatographic systems.

| | | Power (VA) |
|----------------|-----------------------------|------------|
| LC | Autosampler HPLC | 200* |
| | Autosampler for on-line SPE | 200* |
| | Degasser | 30* |
| | Column oven | 220 |
| | Binary pump | 180 |
| | Isocratic pump | 180 |
| | Quaternary low mixing pump | 220 |
| | DAD detector (CapLC) | 160 |
| | HPLC (Degasser, pump, DAD) | 240 |
| | MS detector (HPLC or CapLC) | 2000 |
| Detector MS/MS | 3200* | |
| GC | Autosampler | 245* |
| | Thermal desorption | 264 |
| | GC-MS | 2250 |
| | GC-ECD | 2250* |

*: data in W

**In-tube solid phase microextraction as
preconcentration tool to determine antimicrobials in
invasive medical devices: application to endotracheal
tubes**

In-tube solid phase microextraction as preconcentration tool to determine antimicrobials in invasive medical devices: application to endotracheal tubes

J. Pla Tolós, L. Hakobyan, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campins-Falcó

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia,

Doctor Moliner 50, Burjassot (Valencia) Spain

ABSTRACT

The use of invasive medical devices, such as endotracheal tubes (ETT), for patients in intensive care unit is often necessary. However, the biofilm formation can result in ventilator associated infections and, therefore in such cases the treatment with antimicrobial agents is required. Meropenem is a widely used antimicrobial for the treatment of these infections. These treatments are not always effective, in fact, in-vitro studies have demonstrated the difficulty of antimicrobials to penetrate into the biofilm, however in-vivo studies of the effect of these compounds is a trend, mostly because of the complexity of pulmonary samples extracted from ETTs. Therefore, the objective of this work was to evaluate in-tube SPME coupled to capillary liquid chromatography (CapLC) with DAD to determine meropenem in ETTs in order to estimate the penetration capability into the biofilm. Firstly, the analytical performance of in-tube SPME coupled to CapLC-DAD showed satisfactory results for estimation of meropenem in terms of sensitivity ($LOD= 1 \mu\text{gL}^{-1}$) and precision ($RSD<10\%$). The extraction of meropenem from the ETTs was also studied. Direct extraction and Ultrasound extraction (UAE) extraction were tested. The results indicated similar recovery results, and thus, direct extraction was chosen for simplicity. Finally, samples from ETTs used for UCI patients with different antimicrobial treatments were analysed with successful results. The proposed methodology can be a potential alternative to determine meropenem in invasive medical devices, and in particular in ETTs, taking into account that the pulmonary antimicrobial concentrations for meropenem ($2\text{-}30 \text{ mgL}^{-1}$).

1. Introduction

The use of invasive medical devices, such as endotracheal tubes (ETTs), is an increasing source of healthcare-associated infections due to colonization of these appliances by microbes [1]. The surface of these medical dispositives acts as a substrate which allows the attachment of microorganisms, resulting in the formation of a dense multicellular communities of bacteria embedded in a self-produced extracellular matrix that imbibes and protects them, known as biofilm [2,3].

Infectious diseases for which microbial biofilm is held responsible include lung infections of cystic fibrosis patients, colitis, rhinosinusitis, urethritis, conjunctivitis, otitis, endocarditis and periodontitis [4,5]. Nevertheless, the formation of a biofilm in medical devices is of particular concern due, once the device is colonized, infection is such difficult to be eradicated that, in most clinical practice guidelines, the withdrawal of a device related to the infection is recommended. However, in many

occasions, the devices removal is not possible and the treatment with an antimicrobial therapy is needed, making the biofilm an object of great interest in many investigation fields.

The resistance against antimicrobial agents may be explained due to their failure to penetrate full depth in the biofilm. Polymeric substances like those that make up the matrix of a biofilm are known to retard the diffusion of antibiotics. However, depending on the particular agent and biofilm, antibiotics have been shown different ranges of effectiveness [6].

Although the structure and function of biofilms depends on the type of microorganism, several authors agree that five main stages may be observed in its formation (**Figure 1**): 1- transport and attachment of microbes, 2- irreversible attachment, 3- formation of the microcolony, 4- maturation of the biofilm and 5- dispersion of the cells [1,4,5,7]. In the first stage, planktonic bacteria are transported and adhered to the surface through weak, reversible adhesion. At this stage, cells are still susceptible to antimicrobial agents [5]. Next, in stage two, the irreversible binding of the cells to the surface is produced through an extracellular matrix which hold the biofilm together. In the third stage of colony formation, the attraction of other microorganisms and the division of existing cells produces the growth of the biofilm. In the fourth stage, the mature biofilm contains cavities which serve as transport channels of water and planktonic cells throughout the biofilm community, providing an optimum environment for nutrient absorption and waste disposal [4]. At that stage, the biofilm shows maximum resistance to antibiotics [5]. Finally, the biofilms detachment is produced, allowing the expansion of the infection due the microbial cells can colonize another location [4].

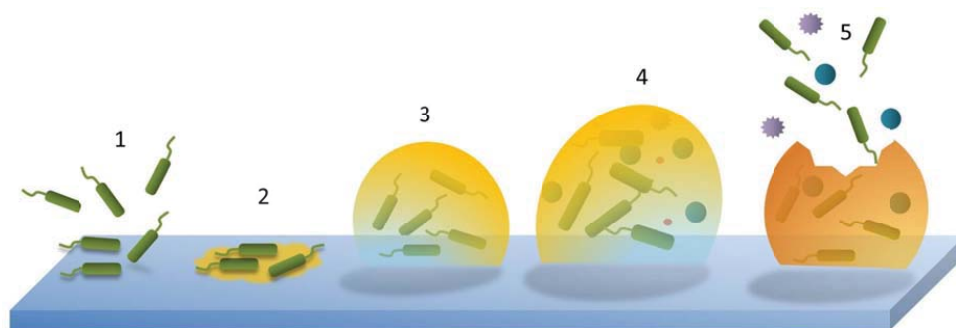


Figure 1: Different stages in the biofilm formation: (1) Transport and attachment of microbes, (2) irreversible adhesion, (3) formation of the microcolony, (4) maturation of the biofilm, (5) dispersion of the cells.

Currently, different anti-biofilm approaches have been proposed, including the design of coatings which release antimicrobial substances capable to inhibit the proliferation of the biofilm, the development of anti-adhesive materials or the modification of medical devices using chemical functional groups that prevent protein adsorption [4,8]. Nevertheless, traditional treatment with antimicrobials is generally used.

Meropenem (**Figure 2**), chemically (4R,5S,6S)-3-[(3S,5S)-5-(dimethylcarbamoyl)pyrrolidin-3-yl]sulfanyl-6-[(1R)-1-hydroxyethyl]-4-methyl-7-oxo-1-azabicyclo[3,2,0]hept-2-ene-2-carboxylic acid, is a carbapenem (β -lactam) antibiotic with broad-spectrum to a wide range of gram positive, gram negative and anaerobic bacteria. These type of β -lactams are often used as last resort when patients

with infections become gravely ill or are suspected of harboring resistant bacteria [9]. Carbapenems, like all β -lactam antibiotics, inhibit bacterial cell wall synthesis by inactivating penicillin-binding proteins [10–12]. Moreover, β -lactams are time-dependent antibiotic, which means that, to ensure a bactericidal effect, the concentration of free drug must be maintained above the minimum inhibitory concentration between two consecutive doses [13–16].

Meropenem has shown clinical efficacy in the treatment of a wide range of serious infections such as lower respiratory tract, intra-abdominal infection, obstetric/gynecological, urinary tract, meningitis, cystic fibrosis and in febrile neutropenia [17,18].

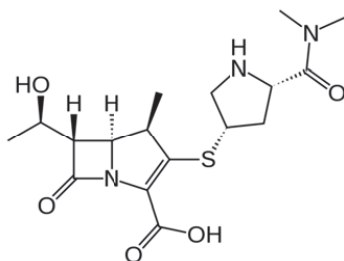


Figure 2. Chemical structure of meropenem.

Traditionally, the determination of antibiotics in biological fluids has been carried out using microbiological procedures [6]. Nevertheless, the literature survey reveals different analytical methods for quantitative estimation of antimicrobials in biological fluids and in pharmaceutical formulations, including high-performance liquid chromatography [12,19–22], capillary zone electrophoresis [23] or ultraviolet spectrophotometry [19], among others (**Table 1**).

Table 1: Main analytical properties of different analytical methods proposed for monochloramine in the bibliography.

| Analyte | Matrix | Method | LD | LQ | RSD (%) | Linear range | Ref. |
|--|--------------------------------|------------------------------|--|--|---------------------------------|---|------|
| Meropenem | Pharmaceutical dosage | HPLC-UV | 4.24 ng/mL | 12.85 ng/mL | 0.85 | 10-70 ng/mL | [19] |
| | | UV spectrophotometric method | 19.41 ng/mL | 59.09 ng/mL | 0.89 | 5-35 ng/mL | |
| Meropenem | Pharmaceutical dosage | Microbiological assay | | | 0.94 | 1.5-6 μ g/mL | [10] |
| Meropenem | Serum and bronchial secretions | HPLC-UV/vis | 0.5 μ g/mL | 0.5 μ g/mL | 6 | 0.5 to 40 μ g/mL | [20] |
| Amikacin Streptomycin Kanamycin B Paromomycin Neomycin B | Water | SCX- HPLC-CL | 0.7 μ g/L 7.5 μ g/L 10.0 μ g/L 1.0 μ g/L 1.5 μ g/L | | 3.1 4.9 5.4 2.7 3.6 | 2.5-50 μ g/L 25-500 μ g/L 30-750 μ g/L 3.5-75 μ g/L 5.0-100 μ g/L | [28] |
| Meropenem | plasma | HPLC-UV | 0.01 μ g/ml | 0.05 μ g/ml | 7.17 | 0.05-100 μ g/ml | [29] |
| Meropenem | Plasma | MEKC | 0.2 μ g/mL | | | 0.5–50 μ g/mL | [30] |
| | Cerebrospinal fluid | | 0.3 μ g/mL | | | | |
| Linezolid Meropenem Vancomycin | Bacterial growth medium | HPLC-DAD | | 0.5 μ g/mL 2 μ g/mL 0.5 μ g/mL | | | [31] |
| Amoxicilin Cefuroxime | Human plasma | UPLC-MS/MS | | 1.05 mg/L | 16.7 | 1-100 mg/L | [32] |
| | Bovine serum | | | 0.62 mg/L | 11.9 | 1-100 mg/L | |

| | | | | | | | |
|---|--------------------------------|-------------------|---|---|--|--|-----------------------|
| Ceftazidime Meropenem Piperacillin | | | | 0.81 mg/L 0.52 mg/L 1.09 mg/L | 7.1 11.4 8.1 | 0.5-80 mg/L 0.5-80 mg/L 1-150 mg/L | |
| Meropenem | Bacterial media | LC-MS/MS | | | 6.91 | 50-25,000 ng/mL | [11] |
| Ertapenem Meropenem Doripenem | Urine | LC-UV | 2.362 µg/mL 0.943 µg/mL 1.137 µg/mL | 7.156 µg/mL 2.858 µg/mL 3.445 µg/mL | 1.354 0.909 1.391 | 15-50 µg/mL 20-50 µg/mL 20-50 µg/mL | [33] |
| Meropenem + 10 β-lactams | Human plasma | HPLC-UV | | 0.1 µg/mL | 4.7 | 0.1- 50 µg/mL | [34] |
| Doripenem Ertapenem Imipenem Meropenem | Human plasma | UPLC-UV | | 0.50 mg/L 0.50 mg/L 0.50 mg/L 0.50 mg/L | 6.6 12.2 5.08 2.9 | | [35] |
| Ampicillin Piperacillin Tazobactam Meropenem Acyclovir Metronidazole | Human Plasma | LC-MS/MS | | 300 ng/mL 300 ng/mL 150 ng/mL 50 ng/mL 100 ng/mL 100 ng/mL | 6.97 8.20 7.02 7.81 9.06 9.44 | 0.3-150 µg/mL 0.3-150 µg/mL 0.15-75 µg/mL 0.1-50 µg/mL 0.1-50 µg/mL 0.05-25 µg/mL | [36] |
| Cefepim Ceftazidim Cefuroxim Meropenem Piperacillin | Human plasma | HPLC-UV | | 0.5, µg/mL 0.5, µg/mL 0.5, µg/mL 0.5, µg/mL 0.5, µg/mL | 6.8 8.4 12.2 3.5 5.6 | 2.5-60 µg/mL 2.5-60 µg/mL 2.5-60 µg/mL 2.5-60 µg/mL 2.5-60 µg/mL | [15] |
| Meropenem + 11 β-lactams | Human plasma | HPLC-UV | | 5 µg/mL | 1.4 | 5-250 µg/mL | [37] |
| Meropenem + 8 β-lactams | Human serum | HPLC-MS/MS | 0.05 µg/mL | 0.10 µg/mL | | 0.1-50 µg/mL | [38] |
| Meropenem Biapenem | Peritoneal fluid Human Bile | HPLC-UV | 0.01 µg/mL 0.02 µg/mL | 0.05 µg/mL 0.1 µg/mL | | 0.05-100 µg/mL 0.1-100 µg/mL | [39] |
| Meropenem | | IT-SPME-CapLC-DAD | 0.003 µg/mL | 0.01 µg/mL | 3.8 | 0.01-1 µg/mL | Proposed procedure |

As can be observed, the analysis by high performance liquid chromatography remains the main analytical technique for the determination of antimicrobials due its speed, specificity and the capability of analyze different antibiotics and metabolites simultaneously [12]. However, HPLC methods usually involve a sample pretreatment step before analysis which, generally, is the most time-consuming part of the chemical analysis. Therefore, on-line extraction procedures are particularly attractive due their capability to eliminate manual sample manipulation. In this sense, in-tube solid phase microextraction (IT-SPME), developed by Eisert and Pawliszyn [24], simplifies the analysis since the step of cleaning, extraction, preconcentration, separation and injection is carried out in a single step [25].

IT-SPME is based on the extraction and preconcentration of the analytes in the inner surface of a capillary column coated with a thin film of extractive phase. Furthermore, one of the several strengths of this technique is that can be coupled to a liquid chromatographic system by different modalities, being the most used the draw/eject and the flow through modes [26]. In the first configuration, the capillary column is generally placed between the needle and the loop of a programmable sample injector and the analytes are extracted by repeated draw/eject cycles of the sample through the capillary. On the other hand, in the second approach, the capillary column is used as the loop of an injector valve and the analytes are extracted during sample loading. The selection of the most appropriate configuration will depend on the characteristics of the sample.

In this context, the objective of this work is to propose a new methodology for the analysis of meropenem, consisting in the IT-SPME coupled to capillary liquid chromatography (CapLC) with DAD

detection. For this purpose, the analytical method proposed has been optimized and applied to real samples from ETTs used for ICU patients treated with this antimicrobial in order to estimate their penetration capability into the biofilm, obtaining successful results.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and solutions

Ultrapure water obtained using a Nanopure II system (Barnstead, USA) was employed for the preparation and dilution of all the solutions. Acetonitrile was purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Meropenem was supplied by the research team of the Intensive Care Unit of the hospital La Fe (Valencia, Spain).

2.2. Equipment and chromatographic conditions

The capillary chromatographic system consisted on a LC capillary pump (Agilent 1100 Series, Waldbronn, Germany) and a UV-vis diode array detector (Agilent, 1200 series), equipped with a 80-nL flow cell, linked to a data system (Agilent, HPLC ChemStation) for data acquisition and calculation. Absorption spectra were recorded between 190 and 400 nm and the meropenem absorbance signals were detected at 300 nm.

Samples were loaded via six-port injection valve (7725 Reodhyne, Rohnert Park, CA, USA), in which the stainless steel loop was replaced by a segment a gas chromatography capillary column TRB-35 (30cm x 0.32mm), with a coating composed by 35% diphenyl - 65% polydimethylsiloxane (Teknokroma, Barcelona, Spain).

For the separation of analytes, a Zorbax SB-C18 (150 mm x 0.5 mm i.d., 5 μ m) column was employed. The mobile phase used was a mixture of acetonitrile:water in gradient elution mode: the initial acetonitrile content was 10% during 10 min, increased to 15 % from 11 min to 13 min, and then from 14 min to 15 min -10% acetonitrile. The mobile phase flow rate was 8 μ L /min. Before use, all solutions were filtered through 0.45 μ m nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain).

A vortex mixer type ZX3 (40 Hz) from VELP Scientifica (Usmate Velate, Italy) and an ultrasonic bath (300 W, 40 kHz, Sonitech, Guarnizo, Spain) were employed for the extraction of meropenem from the samples of endotracheal tubes. Centrifuge EBA 20 from Hettich (Tuttlingen, Germany) and nylon filters (0.2 μ m pore diameter) were used for clean-up the biological fluids extracted.

2.3 In-tube solid-phase microextraction procedure

The IT-SPME device consisted in a conventional six-port injection valve in which the stainless steel injection loop was replaced by a segment of a gas chromatographic capillary column TRB-35 (30 cm). Capillary connections to valve were facilitated by the use of 2.5 cm sleeves of 1/16 in. PEEK tubing; 1/16-in. PEEK nuts and ferrules were used to complete the connections.

With the valve in load position, 500 μL of standards or samples were manually processed into the system employing a 1.0-mL precision syringe. After sample loading, the valve was rotated to the inject position, allowing the desorption of the compounds retained the internal coating of the extractive capillary by the mobile-phase and their subsequent transference to the analytical column for separation and detection [27].

2.5. Samples of endotracheal tubes

Samples of endotracheal tubes were provided by the research team of the Intensive Care Unit of the Hospital La Fe (Valencia, Spain). A section of 2 cm length of the tip region of the ETTs used in patients admitted to the Intensive Care Unit, and treated with meropenem, was cut by the staff of the hospital and frozen until analysis.

3. Results and discussion

3.1 Study of the preconcentration step

The IT-SPME technique allows the preconcentration of the analytes into the internal surface of the capillary column through the interactions established between the coating and the compounds of the sample. Next, analytes retained during the load step can be desorbed by the mobile phase and transferred to the analytical column. The amount of analyte extracted depends on several parameters, such as the nature of the capillary coating, the length of the extraction loop or the volume of sample processed.

First of all, the effect of the length of the capillary column in the analytical response was studied. For this purpose, segments of a capillary column TRB-35 (30, 40 and 60 cm) were used as an injection loop and 500 μL of meropenem (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were injected in the system. As could be expected, the analytical response increased with the length of the capillary column, due more surface of extractive phase was available. Nevertheless, when the length of the column was higher than 30 cm, the break of the capillary was observed. Therefore, it was decided to use a capillary column of 30 cm for further experiments.

Second of all, the effect of the processed volume was analyzed. Thus, different volumes of a solution containing the same amount of meropenem (0,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were processed by the IT-SPME-CapLC-DAD system, obtaining the results showed in **Figure 3**. As can be observed, an enhancement of the analytical signal was achieved by increasing the volume of sample processed. However, the injection of volumes higher than 500 μL did not improve the analytical response. These results are in accordance with the basis of the IT-SPME, due this technique is not an exhaustive extraction method. Generally, when the volume of sample processed is increased, an enhancement of the analytical signal is observed due the amount of analyte retained in the coating is higher. Nevertheless, when the equilibrium is reached, the injection of higher volumes did not improve the analytical response. Thus, an injection volume of 500 μL was used in further experiments.

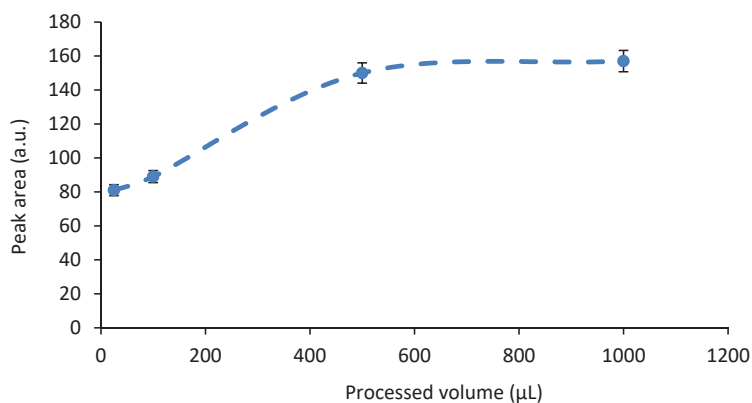


Figure 3: Analytical response (peak area) obtained as function of the processed volume (0,75 µg/mL).

3.2 Analytical performance

Calibration equation, linear working range, LOD, LOQ and precision data are shown in Table 2. The results indicated satisfactory analytical performance in the lineal range 0.01-1 µg/mL. The LOD and LOQ were experimentally determined as the analyte concentration that provided a signal-to-noise ratio of 3 and 10, respectively, obtaining values of 0,003 µg/mL for LOD and 0,01 µg/mL for LOQ. The precision was evaluated by the intra- and inter-day relative standard deviations (RSD%), being the intraday 1.05% and the interday 3.8% (n = 3).

Table 2: Figures of merit obtained for the determination of meropenem by in-tube SPME-CapLC-DAD.

| Analyte | Linear range (µg/mL) | Calibration curve $y = a + bx$ | | R^2 | LOD (µg/mL) | LOQ (µg/mL) | RSD% | |
|---------|-------------------------|-----------------------------------|-----------|-------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|
| | | a | b (µg/mL) | | | | Intraday (n=3) | Interday (n=3) |
| | | Meropenem | 0.01-1 | | | | 23±6 | 1627±13 |

3.3 Analysis of endotracheal tubes

First of all, the extraction of the antibiotic adhered in the endotracheal tube was optimized. For this purpose, the tip region of two different endotracheal tubes was cut in small pieces (2 cm length): an ETT which was not used previously (blank) and another one used in a patient, but with no meropenem treatment. Each segment was fortified by adding 20 µL of a solution of meropenem (10 mg/L) in its surface and was vacuum dried during 1 hour. Once the solvent was evaporated, each fortified piece of endotracheal tube was placed into a vial containing 2 mL of water and different extraction techniques were tested in order to verify which one offered the best results: i) direct extraction (DE), ii) ultrasonic-assisted extraction (UAE), iii) vortex-assisted extraction (VAE). DE was performed leaving the ETT in a vial containing water during 5 minutes; in the UAE, the vial was

placed inside an ultrasonic bath for 5 minutes; finally, the VAE was carried out by agitating the vial using a vortex during 30 seconds.

Next, solutions were centrifuged at 2500 rpm during 15 min and the supernatant was passed through a 0.45 μm nylon membrane syringe filter. Moreover, before injection, pH was adjusted to 8,9 due the pH of samples extracted from inserted was 7.4, while in the black the pH obtained was 8.9. Finally, 500 μL of the solution were injected in the in-tube SPME Cap-LC system. The percentage of recovery obtained using the proposed extraction methodologies were 92 ± 5 , 87 ± 4 and $92\pm 4\%$ for DE, UAE and VAE, respectively. As can be observed, the three extraction techniques tested offered similar recoveries. Thus, VAE was selected for further experiments due the extraction time needed was lower than in the other techniques assayed.

The optimized VAE-IT-SPME-CapLC-DAD procedure was applied to analyze samples of ETTs used in real patients who were treated with meropenem. A schematic representation of the different steps followed to carry out the analysis is shown in **Figure 4**. Retention times, as well as UV-vis spectra, were used for the screening and quantification of the target analyte.

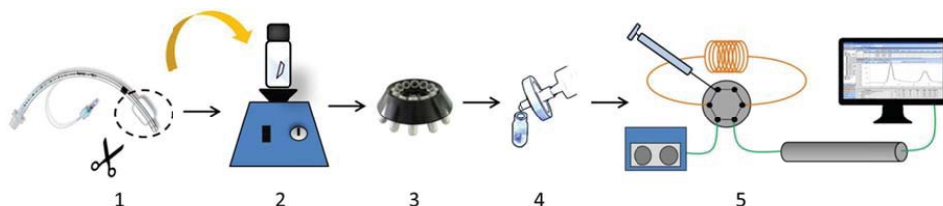


Figure 4: Schematic representation of the different steps involved in the analysis of endotracheal tubes. 1: Sampling, 2: Agitation 3: Centrifugation 4: Filtration, 5: Injection in the IT-SPME-CapLC-DAD system.

In total, five samples of ETTs used in patients in which meropenem was used as a therapy against the infection caused by biofilm formation were analyzed. The concentration of this carbapenem detected in samples TE010, TE013 and TE024 was 0.04, 0.03 and 0.08 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. On the other hand, the concentration of meropenem was below the limit of detection in samples TE008 and TE015. This low amount of analyte in the ETT could be explained due the antimicrobial has penetrated inside the biofilm and, therefore, no unbound analyte is available to be detected (**Table 3**).

Table 3: Concentration of meropenem and recovery obtained in the different endotracheal tubes analyzed.

| Samples ETTs | MER concentrations found $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
|--------------|--|
| TE 008 | <LD |
| TE 010 | 0.04 |
| TE 013 | 0.03 |
| TE 015 | <LD |
| TE 024 | 0.08 |

As an example, **Figure 5** shows the chromatogram obtained by processing sample TE010 and a standard solution of meropenem.

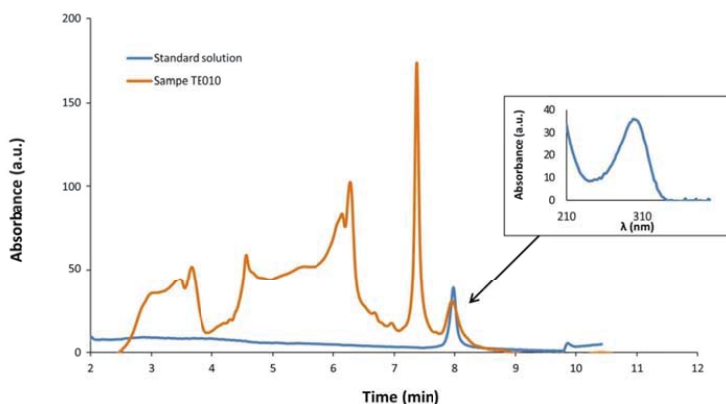


Figure 5: Chromatograms obtained for sample TE010 and standard solution of meropenem. Inlet shows the spectrum of meropenem.

Furthermore, in order to check the accuracy of the method, a recovery study was carried out. For this purpose, samples were fortified with a concentration of 2 mg/L of meropenem and were analyzed by the proposed method, obtaining recovering values of $95 \pm 12\%$.

4. Conclusions

Quantifying the concentration of antibiotic in invasive medical devices can give information about its capability to penetrate into the biofilm and, therefore, the efficacy offered in the treatment of the infection. In this work, a new methodology has been proposed in order to determine the concentration of meropenem in endotracheal tubes from patients in intensive care unit who were treated with this antibiotic. For this purpose, an IT-SPME coupled to CapLC with DAD was optimized and successfully applied to real samples. This new methodology has proved to be effective for on-line extraction and preconcentration of meropenem in the samples analyzed, obtaining low LODs and satisfactory values of precision.

References

- [1] A. Vertes, V. Hitchins, K.S. Phillips, Analytical challenges of microbial biofilms on medical devices, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3858–3866. doi:10.1021/ac2029997.
- [2] J.N. Wilking, V. Zaburdaev, M. De Volder, R. Losick, M.P. Brenner, D. a Weitz, Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) 848–52. doi:10.1073/pnas.1216376110.

- [3] P. Ramírez, M. Gordón, A. Soriano, S. Gil-Perotin, V. Marti, E.M. Gonzalez-Barbera, et al., Assessment of the in vivo formation of biofilm on external ventricular drainages, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32 (2013) 1437–1443. doi:10.1007/s10096-013-1895-8.
- [4] A. Taraszkiewicz, G. Fila, M. Grinholc, J. Nakonieczna, Innovative strategies to overcome biofilm resistance, *Microb. Pathog. Strateg. Combat. Them Sci. Technol. Educ.* (2013) 179–187. doi:10.1155/2013/150653.
- [5] N. Højby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 35 (2010) 322–332. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.
- [6] J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections., *Science.* 284 (1999) 1318–22. doi:10.1126/science.284.5418.1318.
- [7] O. Rendueles, J.M. Ghigo, Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors, *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2012) 972–989. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x.
- [8] A.K. Epstein, A.I. Hochbaum, P. Kim, J. Aizenberg, Control of bacterial biofilm growth on surfaces by nanostructural mechanics and geometry., *Nanotechnology.* 22 (2011) 494007. doi:10.1088/0957-4484/22/49/494007.
- [9] K.M. Papp-Wallace, A. Endimiani, M.A. Taracila, R.A. Bonomo, Carbapenems: Past, present, and future, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (2011) 4943–4960. doi:10.1128/AAC.00296-11.
- [10] A.S.L. Mendez, V. Weisheimer, T.P. Oppe, M. Steppe, E.E.S. Schapoval, Microbiological assay for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 649–653. doi:10.1016/j.jpba.2004.11.030.
- [11] L. Huang, J. Haagensen, D. Verotta, P. Lizak, F. Aweeka, K. Yang, Determination of meropenem in bacterial media by LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 961 (2014) 71–76. doi:10.1016/j.jchromb.2014.05.002.
- [12] S. Bompadre, L. Ferrante, M. De Martinis, L. Leone, Determination of meropenem in serum by high-performance liquid chromatography with column switching, *J. Chromatogr. A.* 812 (1998) 249–253. doi:10.1016/S0021-9673(98)00249-0.
- [13] M. Carlier, M. Noë, J.A. Roberts, V. Stove, A.G. Verstraete, J. Lipman, et al., Population pharmacokinetics and dosing simulations of cefuroxime in critically ill patients: Non-standard

- dosing approaches are required to achieve therapeutic exposures, *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (2014) 2797–2803. doi:10.1093/jac/dku195.
- [14] M. Beumier, G. Casu, M. Hites, L. Seyler, F. Cotton, J.-L. Vincent, et al., B-Lactam Antibiotic Concentrations During Continuous Renal Replacement Therapy, *Crit. Care.* 18 (2014) R105. doi:10.1186/cc13886.
- [15] R. Denooz, C. Charlier, Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B.* 864 (2008) 161–167. doi:10.1016/j.jchromb.2008.01.037.
- [16] F. Mattioli, C. Fucile, V. Del Bono, V. Marini, A. Parisini, A. Molin, et al., Population pharmacokinetics and probability of target attainment of meropenem in critically ill patients, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 72 (2016) 839–848. doi:10.1007/s00228-016-2053-x.
- [17] M.A. Pfaller, R.N. Jones, A review of the in vitro activity of meropenem and comparative antimicrobial agents tested against 30,254 aerobic and anaerobic pathogens isolated world wide, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 28 (1997) 157–163. doi:10.1016/S0732-8893(97)00065-5.
- [18] S.C. Sweetman, Dose adjustment in renal impairment: response from AHFS Drug Information., *BMJ.* 331 (2005) 293. doi:10.1136/bmj.331.7511.293.
- [19] A.S. Mendez, M. Steppe, E.E. Schapoval, Validation of HPLC and UV spectrophotometric methods for the determination of meropenem in pharmaceutical dosage form, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33 (2003) 947–954. doi:10.1016/S0731-7085(03)00366-2.
- [20] M. Ehrlich, F. Daschner, K. Kümmerer, Rapid antibiotic drug monitoring: Meropenem and ceftazidime determination in serum and bronchial secretions by high-performance liquid chromatography-integrated sample preparation, *J. Chromatogr. B.* 751 (2001) 357–363. doi:10.1016/S0378-4347(00)00504-1.
- [21] H. Elkhaili, S. Niedergang, D. Pompei, L. Linger, D. Leveque, F. Jehl, High-performance liquid chromatographic assay for meropenem in serum, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 686 (1996) 19–26. doi:10.1016/S0378-4347(96)00205-8.
- [22] E. Brendel, M. Zschunke, I. Meineke, High-performance liquid chromatographic determination of cefonicid in human plasma and urine, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 339 (1985) 359–365.
- [23] Y. Mrestani, R. Neubert, F. Nagel, Capillary zone electrophoresis determination of

- meropenem in biological media using a high sensitivity cell., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 899–903. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746958>.
- [24] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140–3147. doi:10.1021/ac970319a.
- [25] Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Recent advances of in-tube solid-phase microextraction, *TrAC Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 205–213. doi:10.1016/j.trac.2015.02.020.
- [26] M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review, *Anal. Chim. Acta.* 906 (2016) 41–57. doi:10.1016/j.aca.2015.12.007.
- [27] J. Pla-Tolós, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó, Selective and sensitive method based on capillary liquid chromatography with in-tube solid phase microextraction for determination of monochloramine in water, *J. Chromatogr. A.* 1388 (2015) 17–23. doi:10.1016/j.chroma.2015.02.024.
- [28] J.M. Serrano, M. Silva, Rapid and sensitive determination of aminoglycoside antibiotics in water samples using a strong cation-exchange chromatography non-derivatisation method with chemiluminescence detection, *J. Chromatogr. A.* 1117 (2006) 176–183. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.086.
- [29] K. Ikeda, K. Ikawa, N. Morikawa, M. Miki, S.I. Nishimura, M. Kobayashi, High-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for real-time therapeutic drug monitoring of meropenem in plasma, *J. Chromatogr. B.* 856 (2007) 371–375. doi:10.1016/j.jchromb.2007.05.043.
- [30] Y. Chou, Y.- Yang, J. Chen, C.- Kuo, S. Chen, Quantification of meropenem in plasma and cerebrospinal fluid by micellar electrokinetic capillary chromatography and application in bacterial meningitis patients., *J. Chromatogr. B.* 856 (2007) 294–301. doi:10.1016/j.jchromb.2007.06.015.
- [31] S.G. Wicha, C. Kloft, Simultaneous determination and stability studies of linezolid, meropenem and vancomycin in bacterial growth medium by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B.* 1028 (2016) 242–248. doi:10.1016/j.jchromb.2016.06.033.

- [32] M. Carlier, V. Stove, J.J. De Waele, A.G. Verstraete, Ultrafast quantification of b-lactam antibiotics in human plasma using UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 978–979 (2015) 89–94. doi:10.1016/j.jchromb.2014.11.034.
- [33] E.Ç. Demiralay, D. Koç, Y.D. Daldal, G. Alsancak, S.A. Ozkan, Determination of chromatographic dissociation constants of some carbapenem group antibiotics and quantification of these compounds in human urine, *Biomed. Chromatogr.* 28 (2014) 660–666. doi:10.1002/bmc.3085.
- [34] S.E. Briscoe, B.C. McWhinney, J. Lipman, J.A. Roberts, J.P.J. Ungerer, A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B.* 907 (2012) 178–184. doi:10.1016/j.jchromb.2012.09.016.
- [35] E. Dailly, R. Bouquié, G. Deslandes, P. Jolliet, R. Le Floch, A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 1137–1142. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.038.
- [36] M. Cohen-Wolkowicz, N.R. White, A. Bridges, D.D. Benjamin, A.D.M. Kashuba, Development of a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Assay of Six Antimicrobials in Plasma for Pharmacokinetic Studies in Premature Infants, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 3497–3506. doi:10.1016/j.jchromb.2011.09.031.
- [37] B.C. McWhinney, S.C. Wallis, T. Hillister, J.A. Roberts, J. Lipman, J.P.J. Ungerer, Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 2039–2043. doi:10.1016/j.jchromb.2010.05.027.
- [38] T. Ohmori, A. Suzuki, T. Niwa, H. Ushikoshi, K. Shirai, S. Yoshida, et al., Simultaneous determination of eight beta-lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1038–1042. doi:10.1016/j.jchromb.2011.03.001.
- [39] K. Kameda, K. Ikawa, K. Ikeda, N. Morikawa, A. Nakashima, H. Ohge, et al., HPLC method for measuring meropenem and biapenem concentrations in human peritoneal fluid and bile: application to comparative pharmacokinetic investigations., *J. Chromatogr. Sci.* 48 (2010) 406–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20515537>.

**New optical paper sensor for in situ measurement of
hydrogen sulphide in waters and atmospheres**

Talanta 156-157 (2016) 79-86



New optical paper sensor for in situ measurement of hydrogen sulphide in waters and atmospheres



J. Pla-Tolós, Y. Moliner-Martínez, J. Verdú-Andrés, J. Casanova-Chafer, C. Molins-Legua*, P. Campíns-Falcó

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2016

Received in revised form

20 April 2016

Accepted 2 May 2016

Available online 3 May 2016

Keywords:

Colorimetric paper sensor

Hydrogen sulphide

Methylene blue

Air sampling

Water analysis

Smartphone based colorimetric readout

ABSTRACT

A novel and low-cost colorimetric sensor for the determination of hydrogen sulphide in environmental samples has been developed. This sensor is based on the immobilization of the reagent N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine and FeCl_3 in paper support, in which the H_2S is adsorbed in order to give rise to the formation of methylene blue as reaction product.

The sensor has been applied to determine H_2S in water and air samples. Two different sampling systems for H_2S caption from the air have been assayed: active and passive sampling. The analytical properties of the different systems have been obtained and compared. The analytical signals, corresponding to the methylene blue, have been obtained measuring the absorbance by conventional reflectance diffuse or using different algorithms for quantifying color intensity. The results obtained with both measurement procedures were comparable, with a detection limit of 1.11 and 1.12 mL m^{-3} for air samples (active and passive), and 0.5 mg L^{-1} for water samples. The developed sensor provides good accuracy and precision ($\text{RSD} < 12\%$) and simplifies significantly the analytical measurements because it avoids the need of preparing derivatization reagents, sample handling and allows in situ measurements. The reaction product obtained is highly stable in this support and no provide any blank signal. Under the optimal conditions, the proposed method exhibit excellent visual sensitivity for the naked eye procedure, making the detection of H_2S possible.

© 2016 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Hydrogen sulphide is a toxic, corrosive, flammable and water-soluble gas, with a characteristic smell of rotten eggs. This gas can be produced from natural sources (volcanic activity or by sulphate-reducing bacteria) or from industrial activities (petroleum extraction, natural gas industries, coal mines, fuel burning, production of detergents and the industrial processes of paper) [1–4]. As a consequence of its toxicity and the risks related with exposure in several occupational settings, the detection of this compound has gained importance within the analytical field [5]. Moreover, although the human olfactory threshold is set close to $10 \mu\text{L m}^{-3}$ (depending on the individual and the exposure time), there is a maximum sensitivity of, approximately, 100 mL m^{-3} above which or through prolonged exposure, the perception of the gas disappears because the neurotoxic effects overwhelm the olfactory nerves [1,4,6]. The Directive 2009/161/EU – “Indicative Occupational Exposure Limit Values” establishes values for a reference period of eight-hour time weighted average and for a short term

period of 15 min of 5 mL m^{-3} and 10 mL m^{-3} , respectively, for hydrogen sulphide. Moreover, in Table 1 are summarized the occupational exposure limit of H_2S recommended by different organizations.

Therefore, there is a requirement to develop portable and real-time monitoring methods for low levels of H_2S . Chemical sensors are very useful tools which can be employed in a large variety of applications, such as industrial hygiene, emissions monitoring or clinical diagnostics. These sensor-based devices have shown several benefits in terms of high sensitivity, fast response, easy operation and low cost [7]. Some publications have already published different types of sensors to determine this compound in air or water samples [1–4, 7–20].

Optical sensors offer several interesting properties over the other types because they are sensitive and easy to operate [1]. Some of these sensors are based on the changes in the optical properties of reagents immobilized on a solid support when interacts with the analyte. More concretely, colorimetric sensors are especially attractive because they offer some potential advantages, such as the possibility of being visually observed and measured by the naked eye, without the requirements of sophisticated instrumentation [1,3,21]. Thus, some colorimetric sensors have been

* Corresponding author.

Table 1
Occupational exposure limit values for H₂S proposed by different organizations.

| | Permissible limit value (PEL) | | Recommended exposure limit (REL) | Immediately dangerous to life or health (IDLH) |
|--|---|--|----------------------------------|--|
| | Threshold limit value-time weighted average (TLV-TWA) | Threshold limit value-short term exposure limit (TLV-STEL) | | |
| Occupational safety and health administration (OSHA) | | | | |
| Permissible limit value (PEL) | | | | |
| Construction industry | 10 mL m ⁻³ | – | – | – |
| Maritime | 10 mL m ⁻³ | – | – | – |
| General industry | ^a | ^a | – | – |
| American conference of governmental industrial hygienists (ACGIH) | 1 mL m ⁻³ | 5 mL m ⁻³ | – | – |
| National institute for occupational safety and health (NIOSH) | – | – | 10 mL m ⁻³ (10 min) | 100 mL m ⁻³ |
| Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) | 5 mL m ⁻³ | 10 mL m ⁻³ | – | – |

^a Exposures shall not exceed 20 mL m⁻³ (ceiling) with the following exception: if no other measurable exposure occurs during the 8-h work shift, exposures may exceed 20 ppm, but not more than 50 mL m⁻³ (peak), for a single time period up to 10 min.

reported for the detection of H₂S in air [2,6,15,17,22–25].

On the other hand, paper-based devices have suffered a rapid growth in the analytical chemistry community. As a result, several publications which use paper as a substrate have been published [26–30]. This expansion can be due the intrinsic characteristics of paper, which is an inexpensive material with a large range of thickness, porosity and chemical structure. Furthermore, depending on the type of paper substrate, it can offer different and interesting properties, such as gas permeability, high mechanical flexibility and the possibility to be impregnated with liquids through capillary action, to hold and retain liquids, to be colored and printed, and to be chemically functionalized [27].

Additionally, the current evolution in smartphones and tablets opens up a wide range of interesting alternatives for the development of new analytical tools, because these devices are equipped with several gadgets, such as high resolution cameras, powerful processors or high storage capacity, among other features [31,32]. Free image-editor applications can also be a very useful alternative to scientific equipment [33]. Moreover, the connectivity of mobile phones to internet allows to share data easily and providing real-time results at the point of need [31].

The present work pretends (I) to combine the advantages of paper-based sensors and mobile phone devices to develop a useful analytical method to determine hydrogen sulphide in water and air samples, (II) to compare the analytical properties of different measuring procedures, (III) to control the amount of H₂S in real samples using the proposed sensor. The formation of the methylene blue has been chosen as a colorimetric reaction because it is widely used for the determination of dissolved sulphide in water since its introduction by Fischer in 1883 [5]. This method involves the reaction of this compound with N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine in presence of Fe (III) ions, giving rise to a characteristic blue coloration with a maximum at 670 nm, corresponding to the production of the heterocyclic thiazine dye [5]. This reaction is shown in Fig. 1.

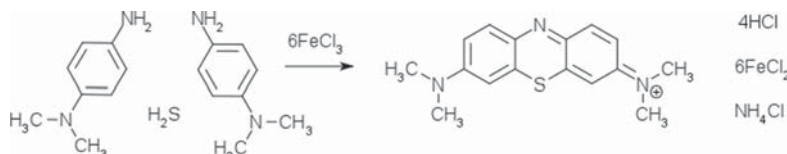


Fig. 1. Reaction between hydrogen sulphide, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine and Fe (III) to form the methylene blue.

The proposed method allows sampling and measuring without any sample treatment, providing an excellent alternative to the conventional analytical approaches for H₂S. These features make this sensor a potentially powerful tool for monitoring hydrogen sulphide in air and water samples.

2. Materials and methods

2.1. Instruments

Absorption spectra were recorded using a Cary 60 UV–vis spectrophotometer (Agilent Technologies, United States) equipped with a diffuse reflection probe from Harrick Scientific Products (United States). The diffuse reflection accessory has an integral video camera in order to select the sample area to be analyzed by providing a visual image. Spectra were recorded from 200 to 800 cm⁻¹. For data processing, CaryWinUV software from Agilent Technologies was used. Ricoh Aficio MP2550 PCL6 multifunctional printer (Ricoh, Japan) was employed to scan the colored sensor. The LG Optimus L5 II smartphone (LG, South Korea) was used to take photos of the sensors. The images were analyzed by the free image editor software GIMP. Grade 41 whatman filter papers ashless (GE Healthcare Life Sciences, United Kingdom) were used as a support for the reagents. An Apex personal sampling pump (Casella, United Kingdom) and Swinnex filter-holder (Merk Millipore, Germany) were used in active sampling. Flow rate was measured using a Multicon KS external flow calibrator (Dräger, Germany). Dilution bottles (2 l) (Supelco, United States) and magnetic stirrer (450 W) (Stuart Scientific, United Kingdom) were used to create the atmosphere of hydrogen sulphide. Dräger-Tube for hydrogen sulphide 0.5/a and Dräger accuro pump (Dräger, Germany) were used to quantify hydrogen sulphide in air samples.

2.2. Reagents and solutions

All reagents used in this study were of analytical grade. Nanopure water obtained using Nanopure II system (Barnstead, United States) was used for the preparation and dilution of all solutions.

N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride was purchased from Sigma-Aldrich (Switzerland). Iron (III) chloride hexahydrate was provided from Probus (Spain). Hydrochloric acid 37% and sodium sulphide hydrate were acquired from Scharlau (Spain). Glycerol was obtained from Sigma-Aldrich (United States).

2.3. Fabrication and preparation of the paper based sensor

The immobilization of the reagents in different supports (with distinct size and shape) was investigated in order to prepare the sensors. Finally, grade 41 whatman filter papers with 1.3 cm ϕ were used as a support. On the other hand, a solution of 0.25 M of FeCl_3 and 0.28 M of N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine were prepared using HCl 6 M as a solvent. After that, the two reagents and glycerol were placed in a vial in a ratio 1:1:0.1 and mixed. Each filter paper was impregnated with 50 μL of the previous mixture and, finally, they were vacuum dried for 15 min

2.4. Generation of standard gaseous samples

Hydrogen sulphide is a weak acid with a values of pKa for the first and the second protonation of (HS^-)=6.88 and (S^{2-})=14.15 respectively [5]. At pH of 5 or lower, we can consider that the 100% of the sulphide is present as H_2S [34]. Thus, to generate the hydrogen sulphide atmospheres, solutions with the appropriate concentration of sodium sulphide (100 μL) were placed into static dilution bottles. These solutions were acidified with hydrochloric acid 6 M (100 μL) and stirred with a magnet during the sampling. Standard gaseous samples were freshly prepared at the moment of the sampling.

2.5. Sensor applicability

In this study, the proposed sensor has been used to determine the concentration of H_2S in two different matrices: water and air. Moreover, two different methodologies were tested for sampling hydrogen sulphide in air: passive and active sampling.

2.5.1. Water analysis

The sensor was submerged into 1 mL of water in which Na_2S was added and was left to react for 30 s After that, it was washed with 5 mL of water to remove the excess of reagent.

2.5.2. Air analysis (passive sampling)

The sensor was suspended with a thread into a static dilution bottle (2 l), in which the hydrogen sulphide atmosphere was generated. A magnet was placed inside the bottle to keep the agitation. The sensor was left to react for 30 min of sampling and, after that, it was washed with 5 mL of water to remove the excess of reagent.

2.5.3. Air analysis (active sampling)

Three dilution bottles, in which the same concentration of hydrogen sulphide was generated, were connected in series with tubes. Inside each bottle, a magnet was placed to shake the mixture. The filter holder containing the sensor was linked with the 3rd bottle. At the same time, the filter holder was connected with an impinger containing N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine (0.28 M) and FeCl_3 (0.25 M) dissolved in HCl 6 M to check if all the hydrogen sulphide was or not retained by the sensor. Finally, the

impinger was put in contact with a pump. An external flow calibrator was connected at the beginning of the assembly to control the air flow, which was adjusted by a valve at 100 mL min^{-1} . After 30 min of sampling, the sensor was washed with 5 mL of water to remove the excess of reagent.

2.5.4. Measurement protocol

After the colorimetric reaction, two different procedures were utilized in order to calculate the concentration of hydrogen sulphide in air and water samples.

Absorption spectra of the colored sensors were recorded using a Cary 60 UV-vis spectrophotometer equipped with a diffuse reflection probe. The absorption spectrum of the methylene blue has a maximum at 670 nm, so this wavelength was selected to perform the analysis.

On the other hand, the free image editor software GIMP was employed [33]. A multifunctional printer was utilized to digitalize the colored sensors. Moreover, a LG Optimus L5 II smartphone camera (5 megapixels resolution) was also employed to take pictures of the sensors. The color picker tool of GIMP was used to evaluate the color intensity of the pictures. The CMYK (cyan, magenta, yellow, black) color-coordinate system was applied to convert the scanned images of the device into numerical color values, a subtractive color mode used in color printing. In this mode, a percentage of the different compounds is used to make the desired color. Brighter colors have a small percentage of ink, while the darker have bigger percentages. The cyan color intensity was chosen for the quantification because it provided the best results. The scheme of the procedure is represented in Fig. 2.

2.6. Analysis of samples

A sewage treatment plant located in Comunidad Valenciana (Spain) was selected to test the proposed method in a real environment. In order to determine the concentration of sulphide in water, three different zones of the plant were selected: entrance, decantation and exit. Water samples were collected using brown glass bottles (250 mL) and stored at 4 °C before their analysis. Samples were analyzed using the proposed method: the sensor was submerged in 1 mL of the water sample and left to react during 30 s After that, it was washed with 5 mL of water.

On the other hand, analysis of hydrogen sulphide in air was performed using passive sampling. In this case, five different areas of the plant were chosen to quantify the amount of this analyte: decanter, homogenization tank, bloom, overflow and digester. Different sensors were hung in these sites for 30 min. At the same time, colorimetric tubes were used to determine the amount of hydrogen sulphide in these places.

3. Results and discussion

3.1. Study of the immobilization of the reagent on the paper based sensor

As it was described above, hydrogen sulphide reacts with N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine in presence of FeCl_3 to produce the methylene blue, which has the maximum absorbance at 670 nm.

Firstly, the immobilization of these reagents on different supports (quartz fiber and cellulose) was investigated. It was observed that, by using the same size and shape of paper, the sensibility offered by the cellulose paper was higher than the achieved by the quartz fiber; in addition, the cellulose paper was mechanically more resistant. Thus, it was the support selected for the sensor.

Moreover, distinct shapes (square, triangle and circle) and sizes (0.5, 1 and 2 cm of side and diameter, respectively) were assayed

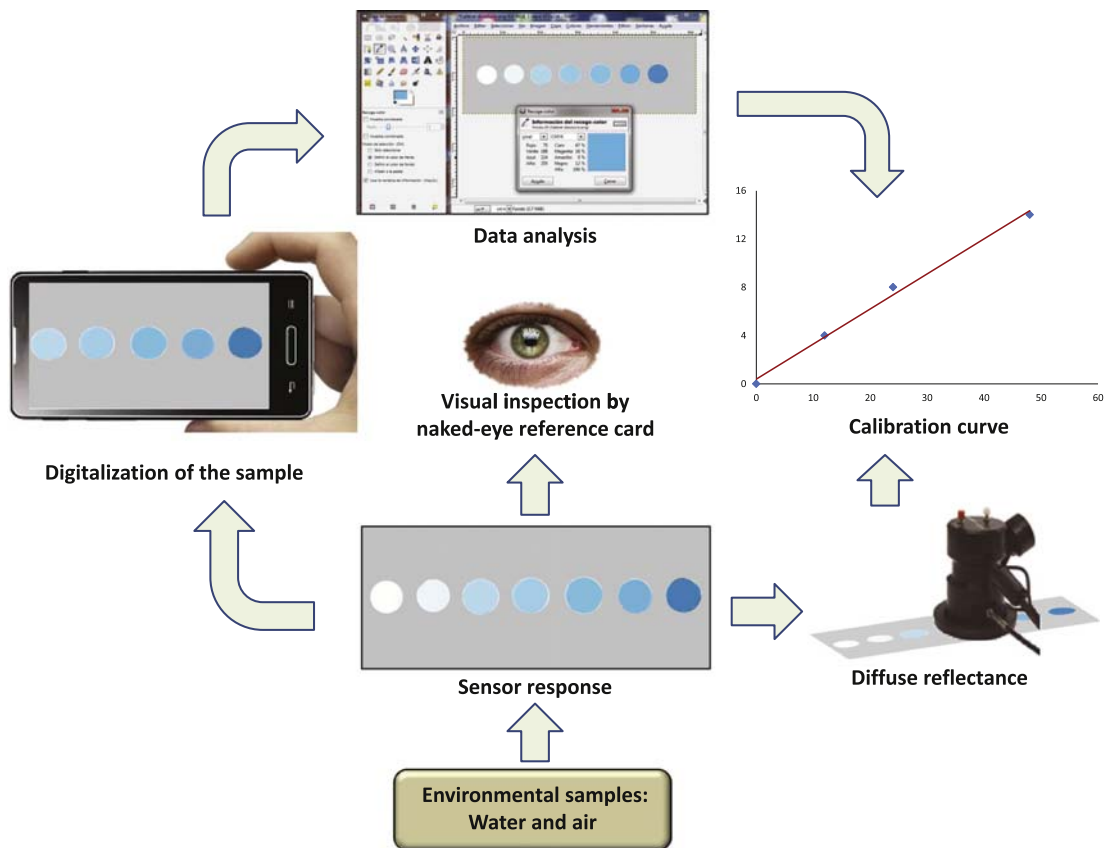


Fig. 2. Flowchart of the sensor and methodology applied.

by keeping constant the H_2S and the exposition time. The results obtained indicate that the sensor response was independently of the size or shape. Thus, a cellulose disk sensor with a diameter of 1.3 cm was selected for its adaptability to the filter holder.

Otherwise, in active sampling, the sensor did not change colour when the paper support was only impregnated with the acidic solution of FeCl_3 and N,N -Dimethyl-*p*-phenylenediamine. This behaviour could be explained because the sensor might be dried excessively by the air pumped through it, and the reaction was not carried out. Thus, it was decided to introduce glycerol in the composition of the sensor. In general, humectants, like glycerol, facilitate gas/solid reactions by increasing the amount of water molecules on the cellulose paper. Water molecules can mediate the reaction, favouring the input of the gas molecules on the solid [1]. In this work, the effect of the amount of glycerol on the cellulose surface, ranging from 0 to 100 μL , was evaluated. The presence of glycerol favoured the reaction in the sensor; however no additional improvement was observed by using higher amounts. According to these results, the quantity selected for further experiment was 10 μL . Moreover, it was observed that glycerol also contributed to a better reagent distribution of the reagent on the paper surface; consequently the color obtained after the reaction was more homogeneous.

The color of the sensors changed from yellow to blue when the reaction was carried out due to the methylene blue formation. The contribution of the humidity present in the atmosphere affects the

reagent, and this parameter also modifies the original color of the sensor. To study the influence of the relative humidity on the collection efficiency of H_2S , passive sampling was performed in atmospheres containing 24 mL m^{-3} of hydrogen sulphide with different percentages of humidity (ranged from 60 to 90%). Although the presence of water modifies the color of the reagent, the final response of the sensors (blue color) was unaffected by the relative humidity, being the RSD between the different sensors of 4%.

In order to remove the reagent excess, a washing step was included before performing the measurement. The reagent interference was eliminated submerging the sensor in water (5 mL). In Fig. 3A are shown the colors corresponding to the sensor at the different stages.

3.2. Applicability of the sensor

The proposed sensor was tested to analyze the concentration of H_2S in water and air samples. Depending on the sampling method, different variables were optimized.

3.2.1. Water analysis

When the sensors were used in water samples, the color was formed almost immediately upon the addition of the samples, indicating that the chromogenic reaction is very fast at the solid state. The coloration is appreciable also at naked eye. In order to

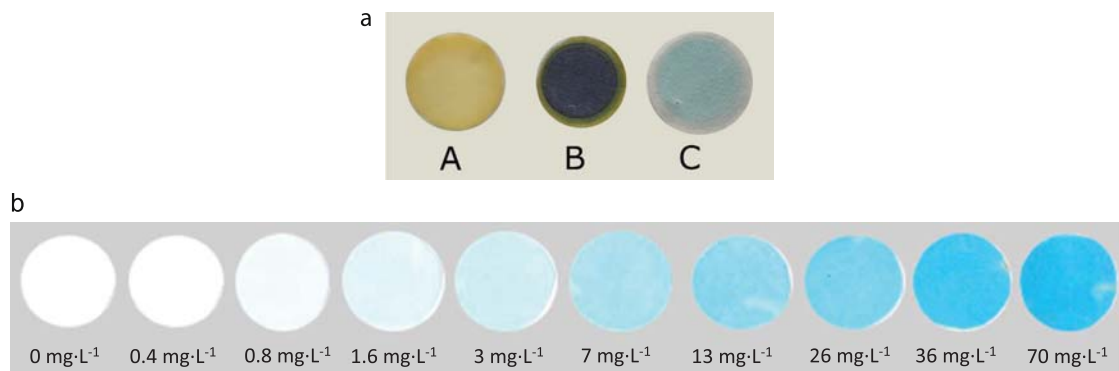


Fig. 3. A) Colors showed by the sensor at different stages: (a) Immobilized reagents, (b) After exposition H_2S , (c) After washing. B) Coloration of the paper sensor obtained after the addition of H_2S in solution at increasing concentration values. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

have a quantitative and precise evaluation, the absorbance and the cyan value were registered and processed. The coloration of the sensor after the addition of different concentrations of H_2S (in the range of 0.4 and 70 mg L^{-1}) is shown in Fig. 3B.

3.2.2. Air analysis (passive sampling)

In this method, the exposition time is a critical parameter which has to be optimized. Gases and vapours are collected by the sensor through a physical process of diffusion. Thus, the sensors were introduced in a 2 l bottle, where an atmosphere of 24 mL m^{-3} of H_2S was generated (see experimental Section 2.4). As it was expected, the response of the sensor was depended on the exposition time (Fig. 4). For a long exposition time, a saturation of the signal was observed. Thus, the time selected for further experiments was 30 min.

3.2.3. Air analysis (active sampling)

Active sampling involves the use of an air pump to pull air through the sensor. In this case, the H_2S in the sample should react with the reagent immobilized in the sensor, so the flow is an important parameter that must be evaluated in order to obtain the optimum response.

The paper containing the reagent was placed into a filter holder and kept in contact with a fixed concentration of H_2S . Thus, air containing 24 mL m^{-3} of H_2S was passed through the sensor during 30 min and the gas flow was varied from 30 to 500 mL min^{-1} . When the flow was high (500 mL min^{-1}), the analytical response of the sensor was very small, due to the analyte could not be retained in the paper. In this case, most of the H_2S was trapped in the impinger solution. However, something similar occurred by lowering the flow at 30 mL min^{-1} . In this case, a low response of the sensor was also observed due to small amount of H_2S has been passed through the sensor. For all further experiments, the sampling flow rate was established at 100 mL min^{-1} ,

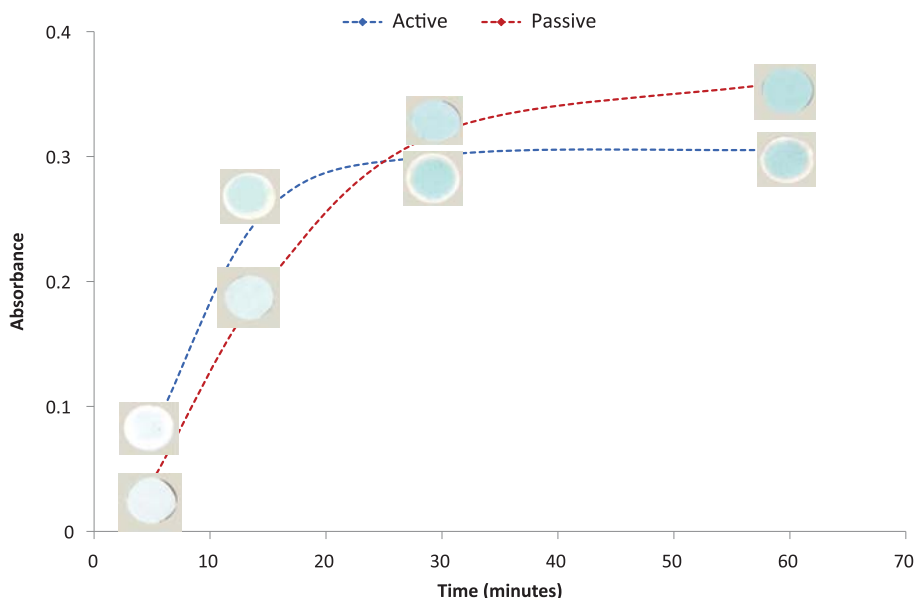


Fig. 4. Variation of the analytical signal vs exposure time (min) a) passive sampling; b) active sampling.

Table 2

Figures of merit obtained by using the paper sensor A) by using reflectance diffuse; B) by using CMYK color coordinates (GIMP).

| A) | | Linearity ($y=a+bx$) (ppm) ^a | | | | Precision RSD (%) | | LOD (ppm) |
|---------------------|---------------|---|-----------------|----------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------|
| | | $a \pm s_a$ | $b \pm s_b$ | R ² | Linear interval (ppm) | Intraday (n=3) ^a | Interday (n=3) ^a | |
| Diffuse reflectance | Aqueous | 0.018 ± 0.008 | 0.051 ± 0.004 | 0.99 | 1.2–6 | 4 | 8 | 0.5 |
| | Air (active) | 0.07 ± 0.01 | 0.0061 ± 0.0007 | 0.99 | 3–50 | 5 | 10 | 1.11 |
| | Air (passive) | 0.077 ± 0.009 | 0.0053 ± 0.0004 | 0.99 | 3–50 | 4 | 9 | 1.12 |
| B) | | Linearity ($y=a+bx$) (ppm) ^a | | | | Precision RSD (%) | | LOD (ppm) |
| | | $a \pm s_a$ | $b \pm s_b$ | R ² | Linear interval (ppm) | Intraday (n=3) ^a | Interday (n=3) ^a | |
| CMYK | Aqueous | 0.1 ± 0.9 | 5.4 ± 0.3 | 0.99 | 1–7 | 6 | 10 | 0.6 |
| | Air (active) | 0.4 ± 0.5 | 0.29 ± 0.02 | 0.99 | 5–50 | 7 | 12 | 1.8 |
| | Air (passive) | 0.5 ± 0.7 | 0.300 ± 0.016 | 0.99 | 5–50 | 7 | 12 | 1.8 |

* In solution ppm are referred to mg S²⁻ L⁻¹, and in air samples ml H₂S m⁻³.^a Established at 6 mg S²⁻ L⁻¹ in water and 25 ml H₂S m⁻³ in air.**Table 3**Found concentration of H₂S in real samples. A) Water; B) Air.

| A) | | Added (mg S ²⁻ L ⁻¹) | Found (mg S ²⁻ L ⁻¹) | % Recovery | | |
|-------------------|---------------------|---|---|------------|-------------------------|------|
| Entrance | Diffuse reflectance | 0 | 1.23 ± 0.05 | – | | |
| | | 6 | 7.3 ± 0.3 | 101 | | |
| | CMYK | 0 | 1.0 ± 0.4 | – | | |
| | | 6 | 7.6 ± 0.7 | 105 | | |
| Decantation | Diffuse reflectance | 0 | < LD | – | | |
| | | 6 | 6.3 ± 0.4 | 105 | | |
| | CMYK | 0 | < LD | – | | |
| | | 6 | 5.9 ± 0.5 | 98 | | |
| Exit | Diffuse reflectance | 0 | < LD | – | | |
| | | 6 | 5.8 ± 0.5 | 97 | | |
| | CMYK | 0 | < LD | – | | |
| | | 6 | 5.9 ± 0.5 | 98 | | |
| B) | | Zone | | | | |
| Method | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Colorimetric tube | | < LD | < LD | < LD | > 15 mL m ⁻³ | < LD |
| Passive sampling | Diffuse reflectance | < LD | < LD | < LD | 25 ± 4 | < LD |
| | CMYK | < LD | < LD | < LD | 28 ± 4 | < LD |

1 Decanter.

2 Homogenization tank.

3 Bloom.

4 Overflow.

5 Digestor.

being the optimum in time and response.

Moreover, the analytical response was studied at different sampling times with a fixed concentration of H₂S of 24 mL m⁻³. As can be seen in Fig. 4, the analytical signal increases by increasing

the sampling time. However, longer time than 30 min did not improve the signal response.

3.3. Analytical parameters

Analytical parameters (linear range, sensitivity and precision) are shown in Table 2. They were calculated for the response of H₂S under different configurations (sensor-solution, sensor-passive gas, sensor-active gas) using two different measurement procedures: diffuse reflectance (Table 2A) and GIMP (Table 2B).

Firstly, calibration equations, employing diffuse reflectance, were obtained by representing the absorbance signal at 670 nm vs. the concentration of hydrogen sulphide. The obtained values indicate that this method provides an adequate linearity range between 3 and 50 mL m⁻³ in active and passive sampling, and 1.2–6 mg L⁻¹ in solution. The precision of the analysis was also evaluated. The intraday precision, RSD (%) was evaluated at a concentration of 24 mL m⁻³ in air samples and 6 mg L⁻¹ in solution, being 4 and 5 for passive and active sampling, respectively, and 4 for solution. The interday precision was obtained comparing the response of three sensors prepared in three different days under identical conditions, at the same level of concentration than in the intraday study. The interday RSD (%) values were 9 for passive sampling, 10 for active sampling and 8 for solution. These low RSD (%) indicated that the proposed sensor is a reproducible device for practical applications. Otherwise, the limit of detection (LOD) was 1.11 and 1.12 mL m⁻³ for active and passive sampling, respectively, and 0.5 mg L⁻¹ for solution, calculated as 3 · S.D./sensitivity, where S.D. is the blank standard deviation. These values indicated that the proposed method is suitable for the determination of hydrogen sulphide in air samples according to the Directive 2009/161/EU – “Indicative Occupational Exposure Limit Values”.

Secondly, the free image editor software GIMP was used to perform a quantitative analysis of the hydrogen sulphide. The colored sensors were scanned and photographed to obtain an image file which was processed using GIMP. The color picker tool on GIMP, with the weighted sample option enabled, was used to evaluate the color intensity.

First of all, different ambient conditions were evaluated to check their influence during smartphone imaging. As it could be expected, images obtained were different when the ambient conditions changed. Therefore, smartphone imaging must be done in controlled ambient conditions to ensure reproducibility and

Table 4
Comparison of the paper H₂S sensor proposed with other sensors described in the literature.

| Sensor type | Support | Sensing device/material | Analytical signal | LODs (mL m ⁻³) | Linear range (mL m ⁻³) | Ref |
|----------------------|---------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|------------------------------------|-----------|
| Optical | Cellulose | Bis(2-aminobenzoi)c/palladium(II) | Fluorescence | 0.002 | 0.008–0.11 | [1] |
| Optical | – | Gas detector tube | Colorimetry | 0.019 | – | [15] |
| Optical | Poly(vinyl chloride) | Tetraoctylammonium fluorescein mercury (II) acetate and tri-n-butyl phosphate | Fluorescence | – | 0–25 | [3] |
| Optical | – | Gas detector tube | Colorimetry | 0.115 | – | [17] |
| Optical | – | Chemoresponsive dyes | Colorimetry | – | 0.05–50 | [2] |
| Optical | Nafion | Ag ⁺ to produce Ag ₂ S | Colorimetry | 212 | ≤2435 | [22] |
| Optical | Solution | Thiolated azido derivatives and active esters functionalized AuNPs (AE-AuNPs) | Colorimetry | 5 | 1778–5942 | [25] |
| Optical | Solution | AuNPs | Colorimetry | 0.08 | 0.1–1.5 | [24] |
| Optical | Poilelectrolite multilayer film | Ag ⁺ to produce Ag ₂ S | Colorimetry | – | – | [23] |
| Optical | Nylon | 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol-Cu(II) | Colorimetry | 2.5 | ≤3531 | [21] |
| Semiconducting oxide | SnO ₂ -coated glass | Nanocrystallite copper/diamond-like carbon film | Surface plasmon resonance | – | – | [8] |
| Semiconducting oxide | – | CeO ₂ -SnO ₂ | Electric | 5 | – | [9] |
| Semiconducting oxide | – | Cu-SnO ₂ | Electric | – | 20–1200 | [10] |
| Semiconducting oxide | – | CuO-SnO ₂ | Electric | – | 1–300 | [11] |
| Semiconducting oxide | – | CuO-SnO ₂ | Electric | 0.5 | – | [12] |
| Semiconducting oxide | – | Fe-SnO ₂ | Electric | 10 | – | [13] |
| Semiconducting oxide | – | Fe ₂ O ₃ | Chemiluminescence | 3 | 8–2000 | [14] |
| Optical | Cellulose | NN-Dimethyl-p-phenylenediamine | Colorimetry | 1.11 | 3–50 | This work |

sensitivity. Thus, the smartphone was placed in a support and photos were taken at a distance of 25 cm, always with the same conditions of light. On the other hand, distinct smartphones were used to take photos of the sensors with the same ambient conditions (light and distance), obtaining similar results, with a RSD% of 8 between them. Therefore, both procedures (diffuse reflectance and GIMP) can be used if quantitative analysis is required.

Calibration equations were calculated using CMYK color mode, by representing the cyan color intensity in the vertical axes and the concentration of the analyte in the horizontal axes. Results obtained show that this procedure provides adequate linearity in the working concentration interval of 1–7 mg L⁻¹ for solution and 5–50 mL m⁻³ for active and passive sampling. The detection limit (LOD) was 1.8 mL m⁻³ for active and passive sampling, and 0.6 mg L⁻¹ for solution. The intraday precision was 6 in solution and 7 for active and passive sampling. Moreover, the values for the interday precision were 10, 12 and 12 for solution, active and passive sampling, respectively.

3.4. Study of potential interferences

Selectivity is an important parameter in the analytical field. In order to study the effect of some possible interfering substances on the proposed sensor, atmospheres with different concentrations of pollutants were created: acetone (7.90 mg m⁻³), amil mercaptane (179.68 mg m⁻³), propanoic acid (9.90 mg m⁻³), benzaldehyde (10.05 mg m⁻³), ethanol (8.00 mg m⁻³), ethanethiol (14.40 mg m⁻³), p-xilene (8.80 mg m⁻³), propanol (7.90 mg m⁻³), toluene (8.70 mg m⁻³), 1-pentanethiol (13.12 mg m⁻³).

The same study was performed in water with different compounds: EDTA (80 mg L⁻¹), Al³⁺ (22 mg L⁻¹), Ca²⁺ (113 mg L⁻¹), CO₃²⁻ (169 mg L⁻¹), K⁺ (344 mg L⁻¹), Na⁺ (52 mg L⁻¹), NO₃⁻ (485 mg L⁻¹), PO₄³⁻ (121 mg L⁻¹), SO₄²⁻ (413 mg L⁻¹), NH₄⁺ (135 mg L⁻¹). According to the results obtained in water and air, we can conclude that these substances did not interfere in the response of the sensor.

3.5. Analysis of samples

To demonstrate the applicability of the paper sensor for determination of H₂S in real environments, samples of water and air were collected in a sewage treatment plant in Comunidad Valenciana (Spain), and processed by employing the proposed method. The amount of sulphide was calculated by using the two different measuring procedures: diffuse reflectance and GIMP.

In water, found concentrations were lower than the LOD, except in the zone of entrance, which was set in 1.23 ± 0.05 mg L⁻¹ (diffuse reflectance) and 1.0 ± 0.4 mg L⁻¹ (GIMP). In order to study the accuracy of the method, these water samples were fortified with 6 mg L⁻¹, being the percentage of recovery 101, 105 and 97 (using diffuse reflectance) and 105, 98, 98 (using GIMP) for entrance, decantation and exit zone respectively. Results are shown in Table 3A.

To perform the quantification in air, different areas of the treatment plant were analyzed using passive sampling and colorimetric tubes (employed as a reference method) (Table 3B).

The colorimetric tube used in the overflow zone appeared saturated (> 15 mL m⁻³), while the concentration in the other areas were lower than the detection limit.

Using passive sampling, concentrations of hydrogen sulphide in air were lower than the LOD, except in the overflow zone, which was set in 25 ± 4 and 28 ± 4 mL m⁻³, for diffuse reflectance and GIMP, respectively.

These results demonstrated that this sensor can be used to analyze sulphide in real samples, avoiding the problem of the samples pretreatment, because the turbidity do not affect the applicability.

4. Conclusions

In the present study, a simple method to prepare a colorimetric sensor for the detection of hydrogen sulphide in environmental samples (air and water) has been reported. A cellulose paper has been impregnated with an acid mixture of N,N-Dimethyl-p-phenylenediamine and Fe (III). This sensor, in presence of hydrogen sulphide, gives rise to the methylene blue formation. Based on it, an analytical method has been developed to determine H₂S in environmental samples.

For air samples, two different methodologies for hydrogen sulphide caption have been tested and compared in this work: passive and active sampling. A semiquantitative analysis can be performed by the naked eye. Moreover, a quantitative analysis can be made by using diffuse reflectance and/or the free image editor software GIMP, without the requirement of sophisticated equipment. Satisfactory RSD values and LOD values have been achieved. The reliability of the proposed sensor has been successfully demonstrated. Several publications have been found in the literature, which utilize sensors to determine hydrogen sulphide in air and water. Some of them use an optical signal to quantify the analyte (colorimetry and/or fluorescence). Nevertheless, others employ an electric response to determine this compound. The analytical characteristics of these techniques have been summarized and compared with those obtained with the proposed method (Table 4). The proposed sensor offers the advantages of simplicity, rapidity, stability, low cost, portability and in-situ analysis, as well as high sensibility for determination of hydrogen sulphide in air and water samples.

Acknowledgements

The authors thank to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (MINECO)/FEDER (Project CTQ2014-53916-P) and to the Generalitat Valenciana (PROMETEO Program 2012/045). J. Pla Tolós expresses his gratitude to the Generalitat Valenciana (GERONIMO FORTEZA Program CPI-14-173) for the financial support. The authors would also like to gratefully acknowledge Egevasa S.A. for supplying the samples used in this study.

References

- J.F.D.S. Petrucci, A.A. Cardoso, Sensitive luminescent paper-based sensor for the determination of gaseous hydrogen sulfide, *Anal. Methods* 7 (2015) 2687–2692, <http://dx.doi.org/10.1039/C4AY02952F>.
- A. Sen, J.D. Albarella, J.R. Carey, P. Kim, W.B. McNamara, Low-cost colorimetric sensor for the quantitative detection of gaseous hydrogen sulfide, *Sens. Actuators B Chem.* 134 (2008) 234–237, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.046>.
- M.M.F. Choi, P. Hawkins, Development of an optical hydrogen sulphide sensor, *Sens. Actuators B Chem.* 90 (2003) 211–215, [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00030-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00030-3).
- J. Sarfraz, D. Tobjork, R. Osterbacka, M. Linden, Low-cost hydrogen sulfide gas sensor on paper substrates: fabrication and demonstration, *IEEE Sens. J.* 12 (2012) 1973–1978, <http://dx.doi.org/10.1109/JSEN.2011.2181498>.
- N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, Analytical strategies for the detection of sulfide: a review, *Talanta* 52 (2000) 771–784, [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00421-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00421-5).
- K.J. Wallace, S.R. Cordero, C.P. Tan, V.M. Lynch, E.V. Anslын, A colorimetric response to hydrogen sulfide, *Sens. Actuators B Chem.* 120 (2007) 362–367, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.02.031>.
- S.K. Pandey, K.H. Kim, K.T. Tang, A review of sensor-based methods for monitoring hydrogen sulfide, *TRAC – Trends Anal. Chem.* 32 (2012) 87–99, <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2011.08.008>.
- N. Bhadra, S. Hussain, S. Das, R. Bhunia, R. Bhar, A. K. Pal, H₂S gas sensor based on nanocrystalline copper/DLC composite films, *Plasmonics* 10 (2014) 503–509, <http://dx.doi.org/10.1007/s11468-014-9834-9>.
- G. Fang, Z. Liu, C. Liu, K. Yao, Room temperature H₂S sensing properties and mechanism of CeO₂-SnO₂ sol-gel thin films, *Sens. Actuators B Chem.* 66 (2000) 46–48.
- A. Chowdhuri, V. Gupta, K. Sreenivas, Fast response H₂S gas sensing characteristics with ultra-thin CuO islands on sputtered SnO₂, *Sens. Actuators B Chem.* 93 (2003) 572–579, [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(03\)00226-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00226-0).
- L.A. Patil, D.R. Patil, Heterocontact type CuO-modified SnO₂ sensor for the detection of a ppm level H₂S gas at room temperature, *Sens. Actuators B Chem.* 120 (2006) 316–323, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2006.02.022>.
- J.M. Lee, B.U. Moon, C.H. Shim, B.C. Kim, M.B. Lee, D.D. Lee, et al., H₂S microgas sensor fabricated by thermal oxidation of Cu/Sn double layer, *Sens. Actuators B Chem.* 108 (2005) 84–88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.01.037>.
- M.V. Vaishampayan, R.G. Deshmukh, P. Walke, I.S. Mulla, Fe-doped SnO₂ nanomaterial: a low temperature hydrogen sulfide gas sensor, *Mater. Chem. Phys.* 109 (2008) 230–234, <http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.11.024>.
- Z. Zhang, H. Jiang, Z. Xing, X. Zhang, A highly selective chemiluminescent H₂S sensor, *Sens. Actuators B Chem.* 102 (2004) 155–161, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2004.04.015>.
- Y. Tanaka, T. Nakamoto, T. Morizumi, Study of highly sensitive smell sensing system using gas detector tube combined with optical sensor, *Sens. Actuators B Chem.* 119 (2006) 84–88, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2005.11.068>.
- K. Toda, S.I. Ohira, M. Ikeda, Micro-gas analysis system μGAS comprising a micro-channel scrubber and a micro-fluorescence detector for measurement of hydrogen sulfide, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 3–10, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2004.01.040>.
- H.P. Ninh, Y. Tanaka, T. Nakamoto, K. Hamada, A bad-smell sensing network using gas detector tubes and mobile phone cameras, *Sens. Actuators B Chem.* 125 (2007) 138–143, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2007.01.049>.
- J.H. Cho, Y.W. Kim, K.J. Na, G.J. Jeon, Wireless electronic nose system for real-time quantitative analysis of gas mixtures using micro-gas sensor array and neuro-fuzzy network, *Sens. Actuators B Chem.* 134 (2008) 104–111, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2008.04.019>.
- M. Seyama, Y. Iwasaki, S. Ogawa, I. Sugimoto, A. Tate, O. Niwa, Discriminative detection of volatile sulfur compound mixtures with a plasma-polymerized film-based sensor array installed in a humidity-control system, *Anal. Chem.* 77 (2005) 4228–4234, <http://dx.doi.org/10.1021/ac0484833>.
- J. Sarfraz, P. Ihalainen, A. Määttäniemi, J. Peltonen, M. Lindén, Printed hydrogen sulfide gas sensor on paper substrate based on poly(aniline composite), *Thin Solid Films* 534 (2013) 621–628, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tsf.2013.02.055>.
- M. Ariza-Avidad, M. Agudo-Acemel, A. Salinas-Castillo, L.F. Capitán-Vallvey, Inkjet-printed disposable metal complexing indicator-displacement assay for sulphide determination in water, *Anal. Chim. Acta* 872 (2015) 55–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.045>.
- A.P. Jarosz, T. Yep, B. Mutus, Microplate-based colorimetric detection of free hydrogen sulfide, *Anal. Chem.* 85 (2013) 3638–3643, <http://dx.doi.org/10.1021/ac303543r>.
- H. Fu, X. Duan, Highly sensitive and colorimetric detection of hydrogen sulphide by in situ formation of Ag₂S@Ag nanoparticles in polyelectrolyte multilayer film, *RSC Adv.* 5 (2015) 3508–3511, <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA11526K>.
- Z. Zhang, Z. Chen, S. Wang, C. Qu, L. Chen, On-site visual detection of hydrogen sulfide in air based on enhancing the stability of gold nanoparticles, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6 (2014) 6300–6307, <http://dx.doi.org/10.1021/am500564w>.
- Z. Yuan, F. Lu, M. Peng, C.-W. Wang, Y.-T. Tseng, Y. Du, et al., Selective colorimetric detection of hydrogen sulfide based on primary amine-active ester cross-linking of gold nanoparticles, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7267–7273, <http://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01302>.
- L. Huang, P. Jiang, D. Wang, Y. Luo, M. Li, H. Lee, et al., A novel paper-based flexible ammonia gas sensor via silver and SWNT-PABS inkjet printing, *Sens. Actuators B Chem.* 197 (2014) 308–313, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.02.081>.
- M. Cuartero, G.A. Crespo, E. Bakker, Paper-based thin-layer coulometric sensor for halide determination, *Anal. Chem.* 87 (2015) 1981–1990, <http://dx.doi.org/10.1021/ac504400w>.
- S. Chaiyo, W. Siangproh, A. Apilux, O. Chailapakul, Highly selective and sensitive paper-based colorimetric sensor using thiosulfate catalytic etching of silver nanoparticles for trace determination of copper ions, *Anal. Chim. Acta* 866 (2015) 75–83, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.042>.
- Y. Su, S. Ma, K. Jiang, X. Han, CdTe-paper-based visual sensor for detecting methyl viologen, *Chin. J. Chem.* 33 (2015) 446–450, <http://dx.doi.org/10.1002/cjoc.201400715>.
- D.C.M. Ferreira, G.F. Giordano, C.C.D.S.P. Soares, J.F.A. de Oliveira, R.K. Mendes, M. H. Piazzetta, et al., Optical paper-based sensor for ascorbic acid quantification using silver nanoparticles, *Talanta* 141 (2015) 188–194, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.067>.
- N. Lopez-Ruiz, V.F. Curto, M.M. Erenas, F. Benito-Lopez, D. Diamond, A.J. Palma, et al., Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices, *Anal. Chem.* 86 (2014) 9554–9562, <http://dx.doi.org/10.1021/ac5019205>.
- S.K. Vashist, T. van Oordt, E.M. Schneider, R. Zengerle, F. von Stetten, J.H.T. Luong, A smartphone-based colorimetric reader for bioanalytical applications using the screen-based bottom illumination provided by gadgets, *Biosens. Bioelectron.* 67 (2014) 248–255, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.027>.
- M. Muñoz-Ortuño, A. Argente-García, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Polydimethylsiloxane composites containing 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate as unique disposable for estimation of casein in effluents from dairy industries, *Anal. Chim. Acta* 873 (2015) 31–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.057>.
- M.N. Hughes, M.N. Centelles, K.P. Moore, Making and working with hydrogen sulfide. The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review, *Free Radic. Biol. Med.* 47 (2009) 1346–1353, <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.018>.

Colorimetric biosensing dispositive based on reagentless hybrid biocomposite: Application to hydrogen peroxide determination

Sensors and Actuators B 231 (2016) 837-846



Colorimetric biosensing dispositive based on reagentless hybrid biocomposite: Application to hydrogen peroxide determination



J. Pla-Tolós, Y. Moliner-Martinez, C. Molins-Legua*, P. Campins-Falcó*

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, Burjassot, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 October 2015
Received in revised form 23 February 2016
Accepted 20 March 2016
Available online 22 March 2016

Keywords:

Colorimetric biosensor
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
Horseradish peroxidase
Sol-gel entrapment
Enzyme adsorption
Hydrogen peroxide

ABSTRACT

An efficient approach to enhance the performance of colorimetric biosensors has been developed. The biosensor is based on the co-immobilization of the reagent 3,3',5,5'-teramethylbenzidine (TMB) and the enzyme horseradish peroxidase (HRP) in a PDMS-TEOS-SiO₂NPs support. The HRP, in presence of H₂O₂, catalyzes the oxidation of TMB, producing a blue color. The generated biosensor, doped with the substrate (TMB) and the enzyme (HRP) (entrapped or adsorbed), has been used to determine H₂O₂ in real samples. Firstly, the immobilization of TMB and HRP in the composite has been studied in order to find the best suitable configuration. The kinetic parameters V_{max} (maximum reaction rate) and K_m (substrate affinity) of the different assayed systems have been determined and compared. Secondly, the analytical properties of the H₂O₂ method have been obtained. From the analytical point of view, no significant differences were observed between the adsorption and entrapment immobilization procedures used for the HRP. This method is simple, inexpensive, highly sensitive and selective for the determination of H₂O₂, with detection limits of 1.3 μ M and a good linearity over the range 4.2–72 μ M. The LOD can be improved to 0.4 μ M by acidifying the solution with sulphuric acid. Precision was also satisfactory (relative standard deviation, RSD < 10%). Results were compared to those obtained by the conventional derivatization method in solution. The developed biosensor is a reagent-release support which significantly simplifies the analytical measurements, because it avoids the need to prepare derivatization reagents and sample-handling, and it allows in situ measurements.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Enzymes have the ability to catalyze reactions with a very high degree of substrate specificity and selectivity [1]. Classical enzymatic assays are performed in solution; the reagents are prepared and added in the appropriate proportion. In some cases, these preparations are complex and time-consuming. Nowadays, besides the traditional analytical properties, other factors such as simplicity, cost, toxicity or times are required. For this reason, since Clark and Lyons coined the word “biosensor” in 1962, the scene changed, giving rise to a new field in the miniaturized techniques [2].

Immobilization of the enzyme is a key factor to develop efficient biosensing devices with a good operational and storage stability, high selectivity, short response time and high reproducibility [3,4]. For this aim, several immobilization techniques have been applied, including physical adsorption, covalent binding and entrapment

into the material [1,4–7]. Each of these techniques has its own advantages and drawbacks:

Physical adsorption onto solid supports represents the easiest method of physical immobilization. Herein, the enzymes are attached to the matrix through hydrogen bonding or Van der Waals forces. This method may suffer from problems such as enzyme leakage from the matrix when the interactions are relatively weak [4].

Covalent attachment ensures the highest strength of the bonding between the support and the enzyme, minimizing leakage issues. However, the binding reaction has to be performed under conditions which do not affect the active site of the enzyme.

The entrapment method consists of the physical occlusion of an enzyme in the lattice of a polymeric matrix [4,8].

Another critical step in the development of the biosensor is the selection of the support to perform the immobilization. The matrix has to provide a biocompatible and inert environment and it should not interfere with the native structure of the protein [9]. Polydimethylsiloxane is a good choice because it offers an appropriate way to fix biomolecules because of its porosity, optical transparent matrix, low temperature curing and inherent versatility [5,10,11].

* Corresponding authors.

E-mail address: cmolins@uv.es (C. Molins-Legua).

In addition, the combination of polydimethylsiloxane with crosslinkers such as triethoxymethylsilane (MTEOS) or tetraethyl orthosilicate (TEOS) allows the regulation of the polymerization process, controlling the pore size distribution and improving the resistance of the films to cracking. Consequently, the entrapped enzymes are accessible to react with external species due to the presence of pores [8]. Wang et al. [12] have reported that the incorporation of copolymers into silica based glasses improves the activity of entrapped enzymes, and the storage stability.

One interesting aspect which has to be commented is that, as far as we know, enzymes are immobilized while the reagent is added into the solution, or immobilized separately [13]. Immobilization of all reagents would be a comfortable way to avoid the solution limitations and could achieve a totally “solid-state” scheme, making easy the miniaturized configuration [14].

There are many examples of biosensors capable of determining H_2O_2 in the literature [14–26]. This compound is present in a large variety of products and has a great importance in pharmaceutical, clinical, chemical, industrial, and environmental analyses [19,24,25,27,28]. Some of the proposed sensors are based on the immobilization of the enzyme horseradish peroxidase in a modified electrode [15,19,22,29]. However, these sensors need instrumentation to perform the analysis and the results cannot be analyzed by naked eye. Other publications come up with sensors based on colorimetric methods, but, as it has been comment above, only the enzyme is immobilized while the substrate is added to the solution separately [26,30,31].

The aim of this paper is the development of a biosensor based on the integration of all the reagents in a solid support, in order to obtain a biocomposite with the enzyme and the substrate co-immobilized in the same composite. As a model biosensor, the assayed enzyme was horseradish peroxidase (HRP), which catalyzes the oxidation of a wide variety of substrates in presence of H_2O_2 [32,33]. In this case, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) was chosen as a chromogenic peroxidase substrate [32,34,35], which can be easily quantified by colorimetry or visual inspection. In this work, substrate (TMB) and/or enzyme (HRP) have been successfully immobilized together into the same sol-gel matrix of PDMS-TEOS- SiO_2 NPs. The films have been used to develop reliable sensors for hydrogen peroxide, which give rise to a blue color that can be measured spectrophotometrically or simply by naked eye. This work improves the toxicity, portability and rapidness of the typically used TMB/HRP catalytic method. This new approach can be a promising tool to determine analytes which requires the use of biomolecules and organic reagents as substrate.

2. Materials and methods

2.1. Instruments

UV–vis measurements were recorded by a HP-8453 UV–vis spectrophotometer from Hewlett Packard (USA) furnished with 1 cm path length quartz microcell. Absorption spectra were registered from 190 to 900 nm. For preparing the composite, ultrasonic bath (300 W) from Sonitech and magnetic stirrer (45 W) from Stuart Scientific was used. Plastic well-plates were used as template to fabricate the sensor (Sharlau, Spain).

2.2. Reagents and solutions

Nanopure water obtained using Nanopure II system (Barnstead, USA) was used for preparation and dilution of all solutions. Sylgard® 184 silicon elastomer base and Sylgard® 184 silicon elastomer curing agent were purchased from Dow Corning (USA). Silicon dioxide was provided from Sigma-Aldrich (China).

Tetraethyl orthosilicate (TEOS) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Hydrogen peroxide 30% was acquired from Merck (Germany). Horseradish peroxidase was obtained from Sigma (USA). Sodium acetate was obtained from Panreac (Spain). Acetic acid was purchased from Sharlau (Spain).

2.3. Preparation of the PDMS-TEOS- SiO_2 NPs-TMB composites

PDMS-TEOS- SiO_2 NPs-TMB composites were prepared by mixing 8 mg of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and 5 mg of silicon dioxide in 2 g of TEOS, under ultrasonic conditions during 10 min. Then, 2 g of base were added to the mixture, followed by vigorous stirring for 15 min. After that, the curing agent was added to the dispersion at a weight ratio of 1:10 to the base and stirred 15 min. The individual films were formed weighting 0.2 g of the blend in a well polystyrene plate ($d = 1$ cm). Finally they were cured at 30 °C during 12 h. The preparation is based on the patent developed by Campins-Falcó et al. [36]

2.4. Preparation of the PDMS-TEOS- SiO_2 NPs-TMB-HRP biocomposites

Two varieties of PDMS-TEOS- SiO_2 NPs-TMB-HRP composites were tested: (i) the HRP was entrapped inside the matrix; (ii) the enzyme was adsorbed on the surface.

PDMS-TMB-HRP (entrapped) biosensors were developed by mixing 8 mg of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 5 mg of silicon dioxide and 20 μ l of a dispersion of HRP in TEOS (1 mg ml^{-1}) in 2 g of TEOS, under ultrasonic conditions during 10 min. Then, 2 g of base were added to the suspension, followed by vigorous stirring for 15 min. After that, curing agent was added to the dispersion at a weight ratio of 1:10 to the base and stirred for other 15 min. The individual PDMS composites were obtained weighting 0.2 g of the blend in a well polystyrene plate ($d = 1$ cm). Finally they were cured at 30 °C during 12 h.

PDMS-TEOS- SiO_2 NPs-TMB-HRP (adsorbed) composites were synthesized by mixing 8 mg of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and 5 mg of silicon dioxide in 2 g of TEOS. The blend was sonicated during 10 min and 2 g of base were added to the suspension, followed by vigorous stirring for 15 min. Curing agent was added to the dispersion at a weight ratio of 1:10 to the base and stirred for other 15 min. The individual PDMS composites were formed weighting 0.2 g of the blend in a well polystyrene plate ($d = 1$ cm) and cured at 30 °C during 12 h. Then, composites were placed above 200 μ l of a solution 0.03 mg ml^{-1} of HRP in carbonate buffer (pH 9, 0.05 M) and left to react for 1 h (each side) at room temperature. Lastly, the composites were rinsed with phosphate buffer at pH 7.

The dimensions of the films were 1 cm diameter and 0.6 mm thickness.

2.5. H_2O_2 measurement procedures

Two hydrogen peroxide measurements were carried out: firstly, when all the reagents were placed in the solution (solution derivatization); secondly, by using the different configurations studied with the composite.

2.5.1. Solution derivatization

The enzyme HRP catalyzes the TMB oxidation by hydrogen peroxide, producing the apparition of a blue color with a maximum at 653 nm which corresponds to the one electron oxidation of TMB. The blue color intensity increased with reaction time. To perform this reaction, 1 ml of buffer NaAc/HAc (0.1 M pH 5), 20 μ l of TMB (3.5 mg ml^{-1}), 20 μ l of HRP (1 μ g ml^{-1}) and the hydrogen peroxide,

were placed in the same vial. After 15 min, the solution was blue and the absorbance was measured at 653 nm.

On the other hand, adding 30 μl H_2SO_4 (2 M) to the mixture the reaction stopped, giving rise to a yellow product that corresponds to diimine form, which absorbs at 450 nm ($\epsilon = 59,000$) and is formed by two sequential one-electron oxidations of TMB. The amount of oxidation product formed was quantified spectrophotometrically at 450 nm.

2.5.2. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP composites

A biocomposite, with enzyme HRP (adsorbed or entrapped) and the TMB entrapped into the PDMS-TEOS-SiO₂NPs, was placed in a vial with 1 ml of buffer NaAc/HAc (0.1 M pH 5). Then, the appropriate volume of H_2O_2 (ranged between 5 a 100 μl) from a stock solutions of 9.8×10^{-4} M and 9.8×10^{-3} M were added. The final H_2O_2 concentrations were between 4.2–72 μM and 4.3–54 μM for adsorbed and entrapped, respectively. The mixture was left to react for 15 min and at these experimental conditions the color obtained was blue. The absorbance was measured at 653 nm.

As in solution, the reaction can be stopped acidifying the mixture with 30 μl H_2SO_4 (2 M). In this case, the absorbance was measured at 450 nm.

When a PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB was used, the procedure was very similar to the described above: in this case, 20 μl of HRP (1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were added to the mixture to complete the reaction.

2.5.3. Kinetic analysis

Kinetic experiments were carried out at room temperature, in a reaction volume of 1 ml HAc/NaAc buffer solution (0.1 M, pH 5.0) with H_2O_2 and TMB as substrate, keeping constant one concentration. Kinetic measurements were taken at 653 nm for 50 min. The Michaelis-Menten constant was calculated using a Lineweaver-Burk plot:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (1)$$

where V is the initial velocity, V_{\max} represents the maximal reaction velocity, and $[S]$ corresponds to the substrate concentration. K_m is Michaelis-Menten constant, which is an indicator of enzyme affinity for its substrate. The smaller the value of K_m is, the stronger the affinity between the enzyme and the substrate.

2.6. Analysis of samples

There is a great deal of products with hydrogen peroxide in their composition available in the market. In order to quantify the amount of this compound in real samples different products containing H_2O_2 were selected to perform the analysis. These products were: Hydrogen peroxide 10 vol. 3% Kern Pharma (Spain), Stabilized oxidizing emulsion Life Cream Developer 20 vol. 6% Farmavita (Italy), Stabilized oxidizing emulsion 9% Deliplus (Spain), Stabilized oxidizing emulsion 1.5% Deliplus (Spain). Samples were stored at room temperature. To perform the analysis, 100 μl of the samples or diluted samples were added to 1 ml of buffer solution. The final concentration of H_2O_2 was within the linear range (between 4.2–72 μM , 4.3–54 μM and 4.4–200 μM for adsorbed, entrapped and solution, respectively).

3. Results and discussion

3.1. Study of the PDMS composites

PDMS is an hydrophobic polymer which can be combined with low molecular weight metal alkoxide precursor molecule such as triethoxymethylsilane or tetraethyl orthosilicate to form hybrid materials (organic/inorganic) [36]. These compounds can

be used as a support composite for the immobilization of derivatization reagents [32,33]. Depending on the composite composition, experimental conditions, features of the reagents and the analyte, two different mechanisms have been proposed: i) the reagent is delivered to the solution under the optimum conditions and the derivatization in the solution is promoted in presence of analyte [37]; ii) The analyte diffuses into the matrix composite and the reaction is performed in the film [38]. Based on our experience in the development of sol-gel sensing films to entrap reagents, the development of a biocomposite for the determination of H_2O_2 has been studied. Therefore, according to the results obtained by Muñoz et al. [38], films with two different composition (100% PDMS and PDMS-TEOS-SiO₂NPs (50:50 wt ratio TEOS:PDMS, 0.1% (w/w) SiO₂NPs)) have been tested in order to study the capability of immobilization and the behaviour of the reagent TMB. The influence of different compounds in the device composition has been assayed in order to select the best composite with good gelation properties, stability and good accessibility of the analyte to reagent.

In both supports the TMB was embedded, either in solid powder or dissolved in acetone. Each composite, with the TMB entrapped, was placed into the buffer solution, containing the HRP and H_2O_2 to complete the reaction. The TMB migrates to the solution, thus the absorbance of oxidized form of the TMB was registered at 653 nm.

As can be seen in Fig. 1, the absorbance obtained using the entrapped TMB in the PDMS matrix was lower than those obtained by the conventional solution method. Additionally, no significant differences were obtained when the reagent was included as a solid powder or dissolved in acetone.

In the PDMS-TEOS-SiO₂NPs film, TEOS modifies the matrix structure imparting hydrophilicity, but maintaining the stability and inertness of PDMS. Additionally, TEOS promoted the better mixing of the organic and inorganic phase to prove a homogeneous dispersion and so, and homogeneous gel [39]. Nevertheless, its addition makes more difficult the gelation process, but the presence of NPs provides greater stability to the sensor, avoiding the film cracking and the enhancement of the size of the network pore. As can be seen in Fig. 1, in these conditions, the reagent diffusion to the solution was higher than the achieved by the PDMS-TMB, and the absorbance values were similar to those obtained when all the reagents were placed in the solution.

Therefore, these studies suggested that the diffusion is favoured by the presence of TEOS and SiO₂NPs in the films of PDMS due to the properties that these compounds provide to the membrane. So, it can be concluded that TMB can be successfully embedded into the PDMS-TEOS-NPs and, in the appropriate experimental conditions, the reagent TMB diffuses to the solution and gives rise to the catalytic reaction.

The effect of the quantity of TMB was optimized by choosing the amount required to provide similar signal to that achieved with all the reagents placed in the solution. The amount of released TMB from the composite to the solution was calculated using the calibration curve obtained with all reagents in solution, keeping the amount of HRP and H_2O_2 constant and varying the concentration of TMB. The results obtained indicated that the theoretical amount of TMB that diffuses to the solution was about the 10% of the total (0.4 mg) entrapped in the composite.

3.2. Immobilization of HRP in PDMS-TEOS-SiO₂NPs composites

In the aforementioned PDMS-TEOS-SiO₂NPs composites, the immobilization of HRP was studied. To examine the efficiency of the enzyme immobilization on this support, two procedures were tested: physical adsorption and entrapment (Fig. 2). The details to perform these immobilizations are shown in the experimental section. The HRP presented activity in both configurations, and the reaction product was formed in the solution.

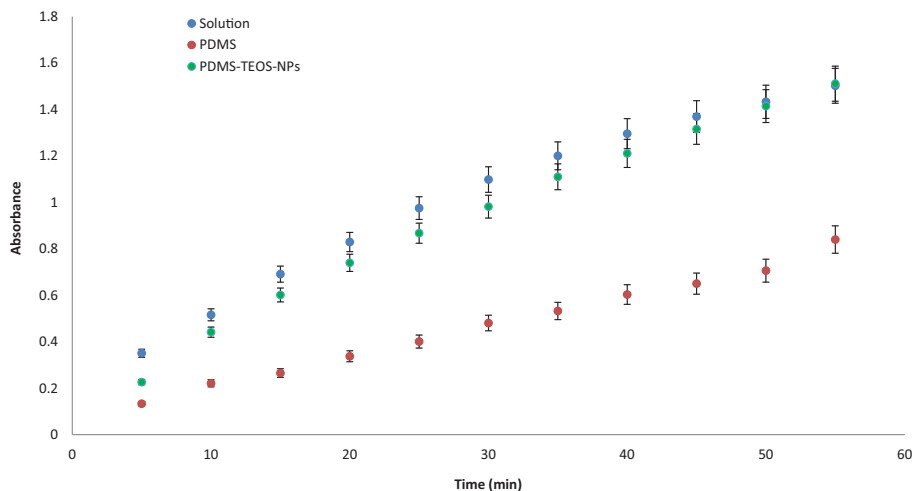


Fig. 1. Absorbance at 653 nm-time course curve of TMB oxidation under different conditions. a) All the reagent in solution; b) TMB entrapped in PDMS; c) TMB entrapped in PDMS-TEOS-SiO₂NPs. Conditions: H₂O₂: 0.18 mM, HRP: 18 ng ml⁻¹, TMB: 0.2 mg/sensor (entrapped) and 0.06 mg ml⁻¹ (in solution).

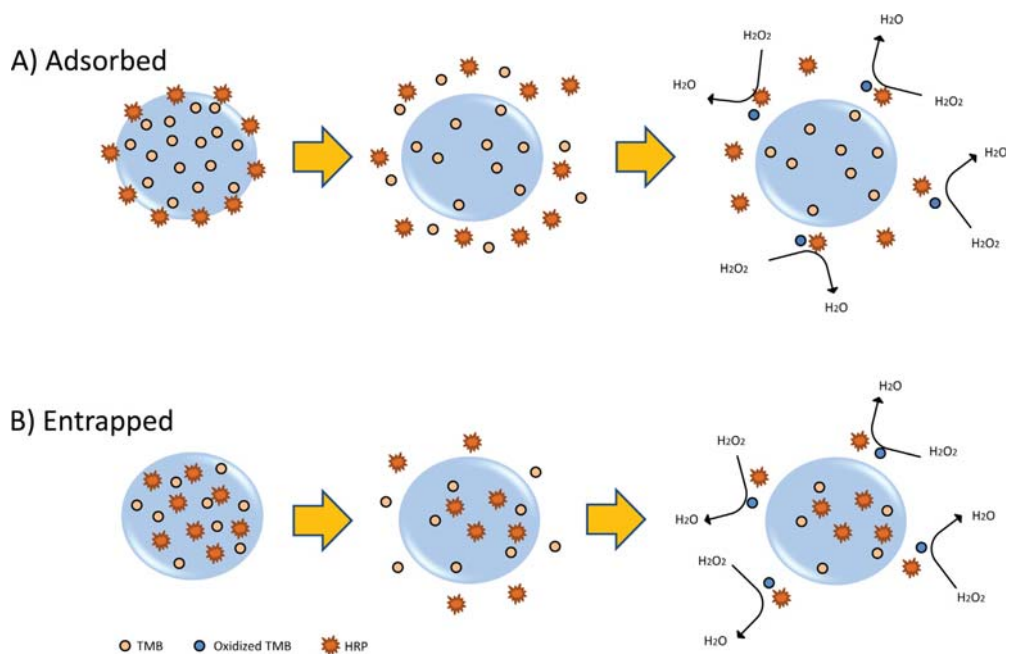


Fig. 2. Schematic illustration for the colorimetric detection of H₂O₂ by using the biocomposite film (PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP). A) HRP-Adsorbed; B) HRP-Entrapped.

In general, the reaction rate depends on the enzyme concentration. If the amount of the enzyme is kept constant and the substrate concentration is increased, the reaction velocity will increase until it reaches a maximum. After this point, increases in substrate concentration will not affect the velocity. This point on the graph is designated V_{max} and it is dependent on the enzyme concentration.

The TMB oxidation process presents different colors depending on time and the oxidation state. The blue product is a one-electron

oxidation product of TMB, and the yellow product is the two-electron oxidation product. Green color can be observed as a mixture of the initial blue product and the final yellow [35]. According to this statement, the optimal amount of HRP required in the different types of assays was optimized in order to obtain the blue TMB oxidation product. In the immobilization procedure based on the adsorption, HRP solutions containing concentrations from 0.001 mg ml⁻¹ up to 0.1 mg ml⁻¹ were assayed. The compos-

ites were immersed in 200 μl of these solutions for 1 h. In order to calculate the amount of HRP adsorbed in each case, the absorbance signals obtained by using the biosensors (incubated in the different solutions) were intercepted in the calibration graph performed with all the reagents in solution (keeping the concentration of TMB and H_2O_2 constant and varying the HRP). The amount of HRP adsorbed on the composite was proportional to the concentration of the solution ($\text{Absorbance}_{653\text{ nm}} = 13.713 C_{(\text{mg ml}^{-1})} + 0.1005$). According to these results, the adsorption process was dependent on the solution of enzyme used, and the adsorption behaviour was studied. A lineal tendency was observed for the isothermal plot $C_{(\text{mgHRP g}^{-1} \text{ solid})}$ against $C_{(\text{mg ml}^{-1})}$, where C_s represents the amount of enzyme adsorbed in mg, and C_m is the concentration of enzyme in the solution in equilibrium with the adsorbent, being the equation $C_{(\text{mgHRP g}^{-1} \text{ solid})} = 0.019 C_{(\text{mg ml}^{-1})} + 0.0002$. In order to work under similar conditions to those established in the solution procedure, a solution of 0.03 mg ml^{-1} of HRP (for incubation) was selected. Taking into account that the sensor was incubated in 200 μl (0.006 mg of enzyme) and the theoretical amount adsorbed represented 6% of the total amount, 0.034 units of HRP were adsorbed per sensor.

Similar studies were performed to study the amount of HRP required in the immobilization by entrapment. Quantities of HRP in the biocomposite ranged from 2.5×10^{-5} mg to 0.035 mg/sensor were assayed. In order to calculate the quantity of HRP that released to the solution, the absorbance signals obtained (for the different concentrations of HRP entrapped) were intercepted in the calibration graph performed with all the reagents in solution (keeping constant the concentration of TMB and H_2O_2 and varying the HRP). In these sensors, approximately 10% of the HRP entrapped diffused to the solution. In order to obtain similar analytical response to the results obtained by conventional procedure, 0.001 mg/sensor (that means 0.095 units/sensor) was the amount of HRP selected.

In conclusion, the theoretical amount of HRP entrapped and adsorbed in the biocomposite was 0.095 and 0.034 units/sensors, respectively.

3.3. Enzyme activity measurements

The study of peroxidase kinetic is crucial to understand the enzymatic characteristics. The kinetic behaviour of HRP in the different tested configurations were carried out at room temperature under 0.1 M NaAc/HAc pH 5.0. The kinetic parameters were evaluated by the variation of the initial absorbance with time. The experiments were performed with a fixed concentration of H_2O_2 and varying concentration of TMB, or vice versa, in presence of HRP (in solution or immobilized). The absorbance data were converted to the corresponding concentration terms by using the value $\epsilon = 39000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (at 653 nm) for the oxidized product of TMB [40]. Within a certain range of substrate concentration, the plots of initial rate vs. TMB or H_2O_2 show a typical Michaelis Menten behaviour [41] (Fig. 3). The kinetic parameters K_m and V_{max} were obtained from the Lineaweaver-Burk plots [42]. The kinetic parameters obtained for the different studied configurations are depicted in Table 1A.

The “apparent” K_m values of the free HRP are similar, being slightly higher when the TMB was entrapped. An explanation for this behaviour could be that the real amount of reagent in solution is lower than that considered (TMB entrapped in the composite). Similar values of K_m were obtained when the HRP was immobilized, and no significant differences were appreciated between the adsorption or entrapment immobilization. The K_m obtained for the co-entrapment of TMB and HRP was slightly superior to that obtained without co-immobilization. This effect can be related with the fact that both reagents (TMB and HRP) are entrapped. V_{max} is

reached when all enzyme sites are saturated with the substrate. Values of V_{max} were similar in all cases.

3.4. Analytical parameters

The calibration curve for the H_2O_2 determination was established under the different studied configurations (solution, TMB composites and biocomposites with HRP immobilized by adsorption or entrapment). Linear range, sensitivity, precision and accuracy of the methods were evaluated. The calibration equations are presented in Table 1B. The obtained values indicate that this procedure provides adequate linearity in the working concentration interval 4.2–72 μM for adsorbed and 4.3–54 μM for entrapped forms.

The detection limit (LOD) was calculated as $3 \cdot s/\text{sensitivity}$, where s is the blank standard deviation [16], being 1.3 μM in all cases. The sensitivity could be improved in a factor of two acidifying the solutions with sulphuric acid when a lower detection limit is required. Under these conditions, the kinetic reaction is stopped and the yellow product of TMB substrate emerges, reaching a LOD of 0.4 μM . The TMB in presence of H_2O_2 (reaction time 15 min) at pH 5.0, presents an UV–vis spectra with a maximum at 653 nm, and the same solutions acidified at pH 1.0 has a maximum at 450 nm (Fig. 4). The maximum of absorbance at 653 corresponds to the charge transfer complex form (blue color), while the maximum at 450 nm belongs to the diimine (yellow color). As can be observed in Fig. 4, the sensitivity at 450 nm is higher than at 653 nm. Characteristic blue and yellow colors can be observed in the inset.

These biosensors were compared with the reaction in solution. As can be seen in Table 1B, the analytical parameters obtained by the three configurations were similar. The results obtained were comparable with other procedures described in the literature (Table 2).

The precision was evaluated for the different procedures. Interday and intraday relative standard deviation (%RSD) was calculated using sensors synthesized in the same batch. The intraday %RSD were 4, 5 and 4 for reagent adsorbed, entrapped and in solution, respectively. Interday %RSD obtained values were 7, 8 and 8 for adsorbed, entrapped and solution, respectively. These results indicate satisfactory %RSD values. In addition, a batch-to-batch precision study was performed. For this aim, the responses of the three sensors prepared in three different batches under identical conditions were obtained. The batch-to-batch %RSD values were 5 and 7 for adsorption and entrapment, respectively. The low %RSD values obtained give evidence that the proposed biosensors are precise sensors for their practical application.

3.5. Interferences

Under the optimum conditions, the effect of different species on the sensor response were examined: citric acid (572 mg l^{-1}), ascorbic acid (485 mg l^{-1}), isopropyl alcohol (800 mg l^{-1}), glucose (950 mg l^{-1}), EDTA (95 mg l^{-1}), Mn^{2+} (22 mg l^{-1}), Ca^{2+} (127 mg l^{-1}), CO_3^{2-} (184 mg l^{-1}), K^+ (454 mg l^{-1}), Na^+ (72 mg l^{-1}), NO_3^- (575 mg l^{-1}), SO_4^{2-} (473 mg l^{-1}). It was found that these substances did not cause any observable interference in the response of the sensor. These results were in agreement with the results obtained by Chang and Tang [43].

3.6. Determination of H_2O_2 in real samples

The applicability of the biosensor to determine H_2O_2 was evaluated by analysing different real samples of products which contain H_2O_2 . Validation of this methodology was carried out by comparing the results with those obtained using the conventional solution derivatization. Table 1C shows the concentration of H_2O_2 found in

Table 1A

Kinetic parameters for peroxidase activity of HRP obtained in different configurations.

| Catalyst | K_m (mM) | | v_{max} ($\mu\text{M/s}$) | |
|----------|--------------------|------------------------|-------------------------------|------------------------|
| | TMB | H_2O_2 | TMB | H_2O_2 |
| HRP | 0.11 ^a | 0.068 ^a | 0.015 ^a | 0.0084 ^a |
| | 0.247 ^b | 0.10 ^b | 0.019 ^b | 0.012 ^b |
| | 0.15 ^c | 0.017 ^c | 0.057 ^c | 0.0045 ^c |
| | 0.13 ^d | 0.023 ^d | 0.04 ^d | 0.0077 ^d |
| | 0.16 ^e | 0.016 ^e | 0.004 ^e | 0.005 ^e |
| | 0.77 ^f | 0.033 ^f | 0.02 ^f | 0.0092 ^f |

^a All reagents in solution.^b TMB entrapped, H_2O_2 and HRP in solution.^c TMB and H_2O_2 in solution, HRP entrapped.^d TMB and H_2O_2 in solution, HRP adsorbed.^e TMB entrapped, H_2O_2 solution, HRP adsorbed.^f TMB entrapped, H_2O_2 solution, HRP entrapped.**Table 1B**Comparison of the figures of merit obtained with the PDMS-TEOS- SiO_2 -NPs-TMB-HRP biocomposites and solution derivatization.

| HRP | Linearity ($y = a + bx$) (mM) | | | Reproducibility RSD (%) | | LOD (μM) | |
|-----------|---------------------------------|----------------|-------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| | $a \pm s^a$ | $b \pm s^b$ | R^2 | Linear interval (μM) | Intraday ($n = 3$) | | Interday ($n = 3$) ^c |
| Adsorbed | 0.012 ± 0.008 | 6.9 ± 0.3 | 0.99 | 4.2–72 | 4 ^g | 5 ^g | 1.3 |
| Entrapped | 0.025 ± 0.003 | 4.7 ± 0.1 | 0.99 | 4.3–54 | 5 ^g | 7 ^g | 1.3 |
| Solution | 0.006 ± 0.003 | 5.3 ± 0.03 | 0.99 | 4.4–200 | 4 ^h | 8 ^h | 1.3 |

^a Established at 0.0363 mM.^b Established at 0.18 mM^c Batch-to-batch.**Table 1C** H_2O_2 concentration found in different real samples with the biocomposites and with the conventional solution derivatization.

| HRP | Hydrogen peroxide solution 3% (0.98 M) | Stabilised oxidizing emulsion 6% (1.96 M) | Revealing emulsion 9% (2.94 M) | Revealing emulsion 1.5% (0.49 M) |
|-----------|--|---|--------------------------------|----------------------------------|
| Adsorbed | 0.91 ± 0.03 | 1.96 ± 0.08 | 2.95 ± 0.12 | 0.52 ± 0.02 |
| Entrapped | 0.84 ± 0.04 | 1.97 ± 0.10 | 2.95 ± 0.15 | 0.49 ± 0.03 |
| Solution | 0.92 ± 0.04 | 1.90 ± 0.07 | 2.94 ± 0.12 | 0.50 ± 0.02 |

Table 2Comparison of H_2O_2 biocomposite films (PDMS-TEOS- SiO_2 -NPs-TMB-HRP) with other H_2O_2 biosensors.

| Catalyst/support | Reagent | Analytical signal | Mode | LODs | Linear range | K_m (mM) | Ref |
|---|---------|------------------------------------|--------------------|---|-----------------------|---|-----------|
| HRP | Luminol | Chemiluminescence | Optic fiber | $640 \mu\text{M}$ | 0.1–0.3 mM | – | [13] |
| HRP-chitosan | Luminol | Chemiluminescence | FIA | $0.04 \mu\text{M}$ | 0.1–10 μM | – | [14] |
| NPs- Fe_3O_4 | DPD | Vis (550 nm) | Batch | $0.25 \mu\text{M}$ | 0.5–15 mM | 0.627 (TMB) 0.696 (H_2O_2) | [48] |
| HRP-CNPs | TMB | Vis | Batch | – | 0–1 mM | 0.682 (H_2O_2) | [49] |
| CuS NPs | TMB | Vis | Batch | – | 10–200 μM | 0.0072 (TMB) 12 (H_2O_2) | [50] |
| Microgel/AgNPs | – | Vis | – | – | 0.3–3 μM | – | [51] |
| PtPdNDS/GNs | TMB | Vis | Batch | $0.1 \mu\text{M}$ | 0.5–150 μM | – | [52] |
| HRP- $\text{Cu}_2(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ nanoflowers | TMB | Vis | Batch | – | – | – | [30] |
| CuInS ₂ | TMB | Vis | Batch | $0.03 \mu\text{M}$ | 0.1–20 μM | 2.01 (H_2O_2) | [26] |
| AgNPs | – | Vis | FIA | $30 \mu\text{M}$ | – | – | [53] |
| CNPs | – | Vis | Batch | – | 10–400 μM | – | [54] |
| UCNPs@PSI _{0Am} in presence of HRP | TMB | Luminescence | Batch | $0.045 \mu\text{M}$ | 0.1–5 μM | – | [55] |
| Red-AgNPs | – | UV-vis Chromatographic analysis | Batch | $1.57 \mu\text{M}/$ $6.19 \mu\text{M}$ | 10–80 μM | – | [56] |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{GO}$ | TMB | Vis | Batch | $0.04 \mu\text{M}$ | 0.1–10 μM | – | [43] |
| HRP or PEG-HRP | TMB | Fluorescence | Sensing microplate | $8 \mu\text{M}/9.1 \mu\text{M}$ | 30–300 μM | – | [57] |
| HRP-sol gel-Gold NPs | Luminol | Chemiluminescence | FIA | – | – | – | [23] |
| PDMS-TEOS- SiO_2 -NPs-TMB-HRP | TMB | Vis | Batch | $1.3 \mu\text{M}, 0.4 \mu\text{M}$ | 1.2–72 μM | – | This work |

TMB: 3,3',5,5'-teramethylbenzidine; ABTS: 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid; DPD: *N,N*-diethyl-*p*-phenylenediamine; UCNPs: Upconversion nanoparticles; PSI_{0Am}: Amphiphilic comb-like polymer; NDs: Nanodendrites; NPs: Nanoparticles; GNs: Graphene nanosheets; GO: Graphene oxide; NPrs: Nanoprisms; CNPs: cerium oxide nanoparticles; AgNPrs: silver nanoprisms; PtPdNDS/GNs: PtPd nanodendrites on graphene nanosheets.

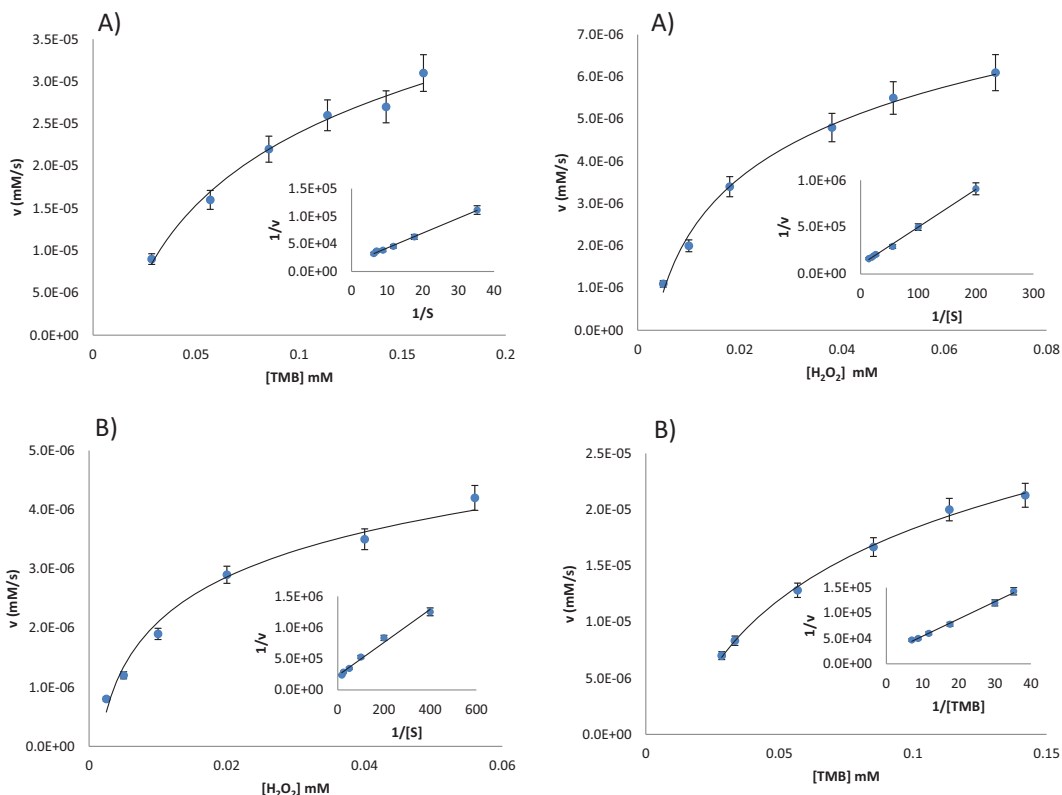


Fig. 3. Steady-state kinetic assay for the biocomposite films. A) HRP-Entrapped. B) HRP-Adsorbed. Conditions: The concentration of TMB was 0.05 mg ml⁻¹ and H₂O₂ was varied; H₂O₂ was 0.3 mg ml⁻¹ and TMB was varied. Insets are the Lineweaver-Burk plots of the double reciprocal of the Michaelis-Menten equation.

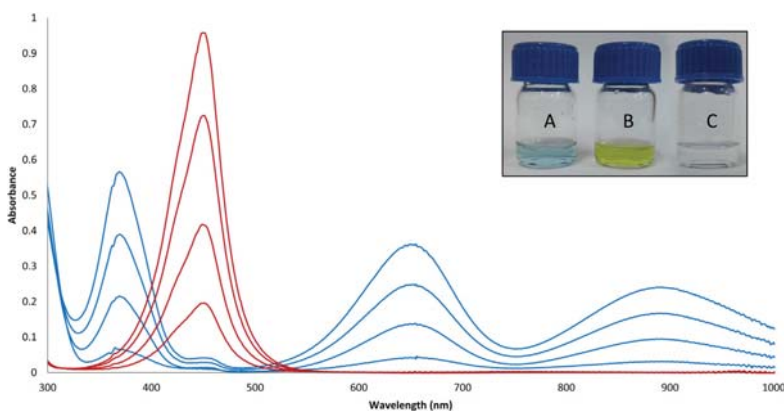


Fig. 4. UV-vis spectra after 15 min of the addition of the biocomposite into a solutions containing H₂O₂ in the range 5–50 μM: a) Conversion of TMB into the oxidation product (λ = 653 nm) at pH 5.0. b) After the addition of H₂SO₄ to stop the reaction and form the diimine (λ = 450 nm) at pH 1.0. Inset: Typical photography of TMB reaction system (blue color, yellow color and blank). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

these samples. In the analysis of hydrogen peroxide solution 3% (0.98 M), no matrix effect was observed and the concentration was calculated by interpolation in the calibration curve with standards. However, the slope of the graph obtained in the hair oxidizing

emulsion samples was different to the calibration curve obtained with standards. Thus matrix effect was present in these samples. In these cases, the concentration was calculated by applying the standard addition method. In all cases, concentrations were similar to

those indicated by the manufacturer. The behaviour of the different hair oxidizing emulsion samples was similar, and the slopes obtained for entrapped and adsorbed composites were $57 \pm 3\%$ and $59 \pm 9\%$ of the slope corresponding to the calibration graphs, respectively. According to these results, the concentration in this kind of samples could be calculated by taking into account the recovery and using the external calibration.

Finally, one-way ANOVA test with a level of significance of 95% was performed using the IBM SPSS Statistics v 22 for the statistical analysis of the results. In all instances, the statistical parameter α was higher than 0.05 (0.073 for hydrogen peroxide solution 10 vol., 0.576 for the stabilized oxidizing emulsion (6%), 0.994 for stabilize oxidizing emulsion (9%) and 0.355 for the stabilized oxidizing emulsion (1.5%). Therefore, no significant statistical differences between the three methods were observed at a level of significance of 95%. Thus it can be concluded that these different methodologies are statistically equal.

This sensor is a versatile device that allows the direct determination of H_2O_2 but it is also valid to determine other analytes that are involved in reactions in which there is generation of H_2O_2 . The oxidation of compounds such as glucose [44], alcohol [45], cholesterol [46] or triglycerides [47] by the suitable enzyme (glucose oxidase, alcohol oxidase, cholesterol oxidase or lipase/glycerol quinase/alpha-glycerol phosphate oxidase) generates H_2O_2 which can be determined by using the proposed sensor.

3.7. Biocomposite stability

The stability of the biosensors with time was studied. To check this property, composites with HRP adsorbed and entrapped were fabricated and stored in the freezer. Measurements were carried out in different days with a fixed concentration of hydrogen peroxide freshly prepared. The biocomposites were stable during a period of three months since their analytical response and their composition did not vary within this time. After this period, the biosensor retains 93% and 92% of its initial activity for the adsorbed and entrapped HRP procedure, respectively.

3.8. Comparison of the PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-biocomposite with other biosensors for hydrogen peroxide determination

In an attempt to demonstrate the goodness of the proposed biocomposite, a comparison with other optical methods used for determination of H_2O_2 has been performed (Table 2). Analytical characteristics such as detection limits (LODs) or linear range have been compared. In the case that enzymes were used, the catalytic properties have also been compared. As can be seen, most of the methods are based on the colorimetric reaction between a peroxidase and a substrate. However, many efforts have been done in order to stabilize the enzymes (HRP) in new supports, even new mimetic peroxidase compounds have been proposed in the last years. In these procedures, enzymes or mimetic peroxidase compounds are immobilized and the substrate reagents (TMB, ABTS, etc.) are added in the solution. In this sense, we propose a biocomposite with the enzyme and the reagent immobilized. As far as we know, no colorimetric biosensor composite with this features have been proposed in the literature.

On the other hand, many procedures presented LODs at very low concentration level (μM), and similar LODs can be reached by using the method proposed in this work.

Besides that, other parameters which are not directly related to the analytical properties, but can be decisive in the selection of the method, have been evaluated: portability, employed reagents (amount, toxicity, and safety), instrumentation (cost), analysis time or the capacity to perform in situ analysis. The use of colorimetric methods has the advantages of the in situ analysis and portability. The proposed H_2O_2 biosensor shows the best results, amongst all the compared procedures, for both portability and rapidly. Comparing to luminescent methods, no instrumentation and infrastructure are needed to carry out the semiquantitative determination by in situ visual inspection. It should be remarked that the proposed biosensor has improved the toxicity compared with other methods because the need to manipulate the derivatization reagent is avoided. The use of this sample preparation is attractive for a number of reasons: high speed analysis, low cost operation, low solvent consumption and low waste generation.

metric methods has the advantages of the in situ analysis and portability. The proposed H_2O_2 biosensor shows the best results, amongst all the compared procedures, for both portability and rapidly. Comparing to luminescent methods, no instrumentation and infrastructure are needed to carry out the semiquantitative determination by in situ visual inspection. It should be remarked that the proposed biosensor has improved the toxicity compared with other methods because the need to manipulate the derivatization reagent is avoided. The use of this sample preparation is attractive for a number of reasons: high speed analysis, low cost operation, low solvent consumption and low waste generation.

4. Conclusions

In the present study we have reported a simple method to prepare a multireagent co-entrapped or adsorbed on organic-inorganic hybrid composites. The enzyme HRP and TMB have been selected as bioorganic and organic reagents for immobilization. The proposed methodology has been applied for the entrapment of the substrate (TMB) or for the immobilization of both reagents (TMB and HRP) in the same composite. Thus, this composite or biocomposite replaces the addition of derivatization reagents and their preparation. These films have been used for determine H_2O_2 in real samples. Satisfactory %RSD values and adequate LOD values have been achieved. The reliability of the proposed biosensor has been successfully demonstrated. The results have been validated by comparison with the conventional derivatization in solution. This reagent-less biosensor offers the advantages of simplicity, rapidity, stability, low cost, portability and in-situ analysis, as well as high sensibility for determination of H_2O_2 .

Thus, given the wide variety of possible enzymes/reagent combinations and the efficiency of this methodology, we believe that this work represents a new way to produce biosensors with a great potential for application in biotechnology, biomedical of environmental field. Further investigations need to be done in order to adapt this methodology to other colorimetric assays.

Acknowledgements

The authors thank to the Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (Project CTQ2014-53916-P) and to the Generalitat Valenciana (PROMETEO Program 2012/045). J. Pla Tolós expresses his gratitude to the Generalitat Valenciana (GERONIMO FORTEZA program) for the financial support.

References

- [1] N. Miletić, A. Nastasović, K. Loos, Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications, *Bioresour. Technol.* 115 (2012) 126–135, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.054>.
- [2] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [3] A. Gürsel, S. Alkan, L. Toppare, Y. Yağcı, Immobilization of invertase and glucose oxidase in conducting H-type polysiloxane/polypyrrole block copolymers, *React. Funct. Polym.* 57 (2003) 57–65, <http://dx.doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2003.07.004>.
- [4] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 489–511, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.003>.
- [5] R.B. Bhatia, C.J. Brinker, Aqueous sol-gel process for protein encapsulation, *Chem. Mater.* 243 (2000) 2434–2441.
- [6] Z. Tong, R. Yuan, Y. Chai, Y. Xie, S. Chen, A novel and simple biomolecules immobilization method: electro-deposition ZrO₂ doped with HRP for fabrication of hydrogen peroxide biosensor, *J. Biotechnol.* 128 (2007) 567–575, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.008>.
- [7] G. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Z.H. Lu, Amperometric hydrogen peroxide biosensor with sol-gel/chitosan network-like film as immobilization matrix, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 335–343 (S0956566302001525 [pii]).
- [8] R. Gupta, N.K. Chaudhury, Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects, *Biosens.*

- Bioelectron. 22 (2007) 2387–2399, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.12.025>.
- [9] S.A. Ansari, Q. Husain, Potential applications of enzymes immobilized on/nano materials: a review, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 512–523, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.005>.
- [10] K.A. Heyries, C.A. Marquette, L.J. Blum, Straightforward protein immobilization on Sylgard 184 PDMS microarray surface, *Langmuir* 23 (2007) 4523–4527, <http://dx.doi.org/10.1021/la070018a>.
- [11] K.A. Heyries, C.A. Mandon, L. Ceriotti, J. Ponti, P. Colpo, L.J. Blum, et al., Macromolecules to PDMS transfer as a general route for PDMS biochips, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1146–1152, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2008.06.042>.
- [12] H.Y. Wang, T. Kobayashi, H. Saitoh, N. Fujii, Porous polydimethylsiloxane membranes for enzyme immobilization, *J. Appl. Polym. Sci.* 60 (1996) 2339–2346, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19960627\)60:13<2339:AID-APP5>3.0.CO;2-F](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19960627)60:13<2339:AID-APP5>3.0.CO;2-F).
- [13] A. Navas Díaz, M.C. Ramos Peinado, M.C. Torijas Minguez, Sol–gel horseradish peroxidase biosensor for hydrogen peroxide detection by chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta* 363 (1998) 221–227, [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00800-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00800-4).
- [14] G.J. Zhou, C. Wang, J.J. Xu, H.Y. Chen, Reagentless chemiluminescence biosensor for determination of hydrogen peroxide based on the immobilization of horseradish peroxidase on biocompatible chitosan membrane, *Sens. Actuators B: Chem.* 81 (2002) 334–339, [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005\(01\)00978-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-4005(01)00978-9).
- [15] F. Wang, R. Yuan, Y. Chai, A new amperometric biosensor for hydrogen peroxide determination based on HRP-nanogold-PTH-nanogold-modified carbon paste electrodes, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 95–104, <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-006-0386-x>.
- [16] M. ElKaoutit, I. Naranjo-Rodríguez, M. Domínguez, M.P. Hernández-Artiga, D. Bellido-Milla, J.L. Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a nafion–sonogel–carbon composite, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 7131–7137, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2008.04.086>.
- [17] K. Thandavan, S. Gandhi, N. Nesakumar, S. Sethuraman, J.B.B. Rayappan, U.M. Krishnan, Hydrogen peroxide biosensor utilizing a hybrid nano-interface of iron oxide nanoparticles and carbon nanotubes to assess the quality of milk, *Sens. Actuators B: Chem.* 215 (2015) 166–173, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.03.041>.
- [18] N. Butwong, L. Zhou, E. Moore, S. Srijaranai, J.H.T. Luong, J.D. Glennon, A highly sensitive hydrogen peroxide biosensor based on hemoglobin immobilized on cadmium sulfide quantum dots/chitosan composite modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis* 26 (2014) 2465–2473, <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201400353>.
- [19] M.Y. Tang, R. Yuan, Y.Q. Chai, A new amperometric biosensor based on HRP/nano-Au/L-cysteine/poly(*o*-aminobenzoic acid)-membrane-modified platinum electrode for the determination of hydrogen peroxide, *Chin. J. Chem.* 24 (2006) 1575–1580, <http://www.scopus.com/scopus/inward/record.url?eid=2-s2.0-33750966275&partnerID=408&rel=R7.0.0>.
- [20] Y. Miao, S.N. Tan, Amperometric hydrogen peroxide biosensor with silica sol–gel/chitosan film as immobilization matrix, *Anal. Chim. Acta* 437 (2001) 87–93.
- [21] J. Li, S.N. Tan, H. Ge, Silica sol–gel immobilized amperometric biosensor for hydrogen peroxide, *Anal. Chim. Acta* 335 (1996) 137–145, [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(96\)00337-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(96)00337-6).
- [22] T. Tangkuaram, C. Ponchio, T. Kangkasomboon, P. Katikawong, W. Veerasai, Design and development of a highly stable hydrogen peroxide biosensor on screen printed carbon electrode based on horseradish peroxidase bound with gold nanoparticles in the matrix of chitosan, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2071–2078, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.011>.
- [23] D. Lan, B. Li, Z. Zhang, Chemiluminescence flow biosensor for glucose based on gold nanoparticle-enhanced activities of glucose oxidase and horseradish peroxidase, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2008) 934–938, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2008.07.064>.
- [24] K. Zhou, Y. Zhu, X. Yang, J. Luo, C. Li, S. Luan, A novel hydrogen peroxide biosensor based on Au-graphene-HRP-chitosan biocomposites, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 3055–3060, <http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2010.01.035>.
- [25] Y. Zhang, R. Yuan, Y. Chai, Y. Xiang, C. Hong, X. Ran, An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on multi-walled carbon nanotubes/electro-copolymerized nano-Pt-poly(neutral red) composite membrane, *Biochem. Eng. J.* 51 (2010) 102–109, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2010.06.001>.
- [26] H. Liu, C. Gu, W. Xiong, M. Zhang, A sensitive hydrogen peroxide biosensor using ultra-small CuInS₂ nanocrystals as peroxidase mimics, *Sens. Actuators B: Chem.* 209 (2015) 670–676, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.12.052>.
- [27] S. Liu, S. Liu, H. Ju, H. Ju, Renewable reagentless hydrogen peroxide sensor based on direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on colloidal gold–modi electrode, *Anal. Biochem.* 307 (2002) 110–116.
- [28] L. Ma, R. Yuan, Y. Chai, S. Chen, Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of HRP on DNA-silver nanohybrids and PDDA-protected gold nanoparticles, *J. Mol. Catal. B Enzym.* 56 (2009) 215–220, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2008.05.007>.
- [29] X. Yi, J. Huang-Xian, C. Hong-Yuan, Direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on a colloid/cysteine-modified gold electrode, *Anal. Biochem.* 278 (2000) 22–28, <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1999.4360>.
- [30] J. Sun, J. Ge, W. Liu, M. Lan, H. Zhang, P. Wang, et al., Multi-enzyme co-embedded organic–inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor, *Nanoscale* 6 (2014) 255–262, <http://dx.doi.org/10.1039/c3nr04425d>.
- [31] Q. Chang, H. Tang, Immobilization of horseradish peroxidase on NH₂-modified magnetic Fe₃O₄/SiO₂ particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol, *Molecules* 19 (2014) 15768–15782, <http://dx.doi.org/10.3390/molecules191015768>.
- [32] R.W. Bally, T.C. Gribnau, Some aspects of the chromogen 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine as hydrogen donor in a horseradish peroxidase assay, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 27 (1989) 791–796, <http://dx.doi.org/10.1515/cclm.1989.27.10.791>.
- [33] L.A. Marquez, H.B. Dunford, Mechanism of the Oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by Myeloperoxidase Determined by Transient- and Steady-State Kinetics Mechanism of the Oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by Myeloperoxidase Determined by Transient- and Steady-State Kinetics, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 9349–9355, <http://dx.doi.org/10.1021/bi907059j>.
- [34] A. Frey, B. Mecklein, D. Externest, M.A. Schmidt, A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays, *J. Immunol. Methods* 233 (2000) 47–56, [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00166-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00166-0).
- [35] P.D. Joseph, T. Eling, R.P. Mason, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 3669–3675.
- [36] P. Campíns-Falcó, Y. Moliner-Martínez, R. Herráez-Hernández, C. Molins-Legua, J. Verdú-Andrés, N. Jornet-Martínez, Passive sensor for in-situ detection of amines in atmospheres, Patent P201300436, Spain.
- [37] M.C. Prieto-Blanco, N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, J. Verdú-Andrés, et al., Development of a polydimethylsiloxane–thymol/nitroprusside composite based sensor involving thymol derivatization for ammonium monitoring in water samples, *Sci. Total Environ.* 503–504 (2015) 105–112, <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.077>.
- [38] M. Muñoz-Ortuño, A. Argente-García, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Polydimethylsiloxane composites containing 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate as unique dispositive for estimation of casein in effluents from dairy industries, *Anal. Chim. Acta* 873 (2015) 31–37, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.057>.
- [39] T. Li, P. Yu, Y. Luo, Deoxygenation performance of polydimethylsiloxane mixed-matrix membranes for dissolved oxygen removal from water, *J. Appl. Polym. Sci.* 132 (2014), <http://dx.doi.org/10.1002/app.41350>.
- [40] E.I. Karaseva, Y.P. Losev, D.I. Metelitsa, Peroxidase-catalyzed oxidation of 2,4-dinitrosoreosorcinol and polydisulfide derivatives of resorcinol and 2,4-dinitrosoreosorcinol, *Anal. Chem.* 75 (2003) 128–135.
- [41] L. Michaelis, M. Menten, Die kinetic der invertinwirkung, *Biochem. Z.* 49 (1913) 333–369, <http://dx.doi.org/10.1021/bi201284u>.
- [42] H. Lineweaver, D. Burk, The determination of enzyme dissociation constants, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658–666, <http://dx.doi.org/10.1021/ja01318a036>.
- [43] Q. Chang, H. Tang, Optical determination of glucose and hydrogen peroxide using a nanocomposite prepared from glucose oxidase and magnetite nanoparticles immobilized on graphene oxide, *Microchim. Acta* 181 (2014) 527–534, <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-013-1145-x>.
- [44] H. Jang, D.-H. Min, Highly precise plasmonic and colorimetric sensor based on enzymatic etching of nanospheres for the detection of blood and urinary glucose, *RSC Adv.* 5 (2015) 14330–14332, <http://dx.doi.org/10.1039/C4RA15485A>.
- [45] R. Gruškievė, V. Kairys, I. Matijošytė, CLEA-based immobilization of methylotropic yeast alcohol oxidase: influence on storage stability and reaction efficiency, *Org. Process Res. Dev.* (2015), <http://dx.doi.org/10.1021/acs.oprd.5b00291>.
- [46] S. Cinti, F. Arduini, D. Moscone, G. Pallešchi, L. Gonzalez-Macia, A.J. Killard, Cholesterol biosensor based on inkjet-printed Prussian blue nanoparticle-modified screen-printed electrodes, *Sens. Actuators B: Chem.* 221 (2015) 187–190, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2015.06.054>.
- [47] C.S. Pundir, J. Narang, Determination of triglycerides with special emphasis on biosensors: a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 61 (2013) 379–389, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.026>.
- [48] L.H. Zhu, Q. Chang, K.J. Deng, G.D. Jiang, C. Yu, H.Q. Tang, Determination of hydrogen peroxide with the aid of peroxidase-like Fe₃O₄(4) magnetic nanoparticles as the catalyst, *Microchim. Acta* 165 (2009) 299–305, <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-008-0133-z>.
- [49] P. Ciaurriz, E. Bravo, K. Hamad-Schifferli, Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates, *J. Colloid Interface Sci.* 414 (2014) 73–81, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2013.09.039>.
- [50] A.K. Dutta, S. Das, S. Samanta, P.K. Samanta, B. Adhikary, P. Biswas, CuS nanoparticles as a mimic peroxidase for colorimetric estimation of human blood glucose level, *Talanta* 107 (2013) 361–367, <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.032>.
- [51] D.M. Han, Q. Matthew Zhang, M.J. Serpe, Poly(N-isopropylacrylamide)-co-(acrylic acid) microgel/Ag nanoparticle hybrids for the colorimetric sensing of H₂O₂, *Nanoscale* 7 (2015) 2784–2789, <http://dx.doi.org/10.1039/C4NR06093H>.
- [52] X. Chen, B. Su, Z. Cai, X. Chen, M. Oyama, PtPd nanodendrites supported on graphene nanosheets: a peroxidase-like catalyst for colorimetric detection of

- H₂O₂, *Sens. Actuators B: Chem.* 201 (2014) 286–292, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2014.04.067>.
- [53] S. Teerasong, T. Sonsa-Ard, C. Vimolkjanjana, N. Choengchan, A. Chompoosor, D. Nacapricha, Colorimetric sensor using silver nanoparticles for determination of hydrogen peroxide based on a flow injection system, *J. Nanoelectron. Optoelectron.* 8 (2013) 446–449, <http://dx.doi.org/10.1166/jno.2013.1506>.
- [54] J.D. Gaynor, A.S. Karakoti, T. Inerbaev, S. Sanghavi, P. Nachimuthu, V. Shutthanandan, et al., Enzyme-free detection of hydrogen peroxide from cerium oxide nanoparticles immobilized on poly(4-vinylpyridine) self-assembled monolayers, *J. Mater. Chem. B* 1 (2013) 3443, <http://dx.doi.org/10.1039/c3tb20204f>.
- [55] J. Liu, L. Lu, A. Li, J. Tang, S. Wang, S. Xu, et al., Simultaneous detection of hydrogen peroxide and glucose in human serum with upconversion luminescence, *Biosens. Bioelectron.* 68 (2015) 204–209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2014.12.053>.
- [56] K. Nitinaivini, T. Parnklang, C. Thammacharoen, S. Ekgasit, K. Wongravee, Colorimetric determination of hydrogen peroxide by morphological decomposition of silver nanoparticles coupled with chromatography analysis, *Anal. Methods* 6 (2014) 9816–9824, <http://dx.doi.org/10.1039/C4AY02339K>.
- [57] N.A. Burmistrova, R.J. Meier, S. Schreml, A. Duerkop, Reusable optical sensing microplate for hydrogen peroxide using a fluorescent photoinduced electron transfer probe (HP Green), *Sens. Actuators B: Chem.* 193 (2014) 799–805, <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.12.025>.

Biographies



Javier Pla-Tolós studied Chemistry at the University of Valencia (Spain). He finished his degree in 2010, and two years later, in 2012, he obtained his Master's Degree in Occupational Risk Prevention. The same year, he joined MINTOTA research group and he started his PhD studies in Chemistry with mention to Excellency in the Department of Analytical Chemistry. His investigation is focused on the study of atmospheres of chloramines and trihalomethanes, developing passive sensors for their in situ determination, as well as the management of techniques for the treatment of environmental samples.



Yolanda Moliner-Martinez is an associated professor in the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry at the University of Valencia. She studied Chemistry at the University of Valencia. She received her BSc in 2001 and continued on to do her PhD in Sciences in the Department of Analytical Chemistry at the University of Valencia. She obtained her PhD degree in 2005 with European mention. She continued her career as a post-doctoral researcher (from 2006 to 2009) in the Research Group of Prof. M. Valcárcel at the University of Córdoba. Since 2009 to September 2013 she was a researcher at the Department of Analytical Chemistry at the University of Valencia.

Her research interest is focused in the development of miniaturized and automated total analysis methods coupled to different separation techniques, mainly micro- and nano-Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis, and the use of nanomaterials as analytical tools for its application in different fields. Her research work has been developed mainly in the research group MINTOTA lead by Prof. Pilar Campins-Falcó.



Carmen Molins-Legua obtained BSc degree 1989, and the Ph. D. degree in Chemistry in 1994, both at the Universitat de València. Her research work has been developed mainly in the area of liquid chromatography, in the research group MINTOTA lead by Prof. Pilar Campins-Falcó. She got a post-doctoral grand in the Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (Netherlands) during 1995 and 1996, and was supervised by Peter Van Zoonen. During her stage she worked in the field of Environmental Analysis. In 1999 she became Assistant Professor in the Analytical Department of the Faculty of Chemistry at the University of Valencia. In 2002 she conducted a stay with the professors S.Cosnier and C.Mousthy at the University of Grenoble. Currently, she is working on the design and development of devices for in situ measurement, and capillary liquid chromatography analyzers in order to monitorize and characterize the environment and human security and health.



Pilar Campins-Falcó (Prof. P. Campins-Falcó; WOK-Researcher ID: B-8943-2008) got the BSc degree in Chemistry in the Faculty of Chemistry of the Universitat de València (1976–1981), and the Ph. D. in the same university (1985) with Extraordinary Award. She was Associated and Assistant Professor. From January 2002, she is Professor of Analytical Chemistry in the Faculty of Chemistry in Universitat de València. She has given lectures in the Faculties of Chemistry, Biology, Pharmacy and in the Superior Technical School of Engineering at degree and postgraduate levels. She has supervised fifteen research projects sponsored by public organizations in competitive announcements and related to clinic studies in drug design and tumor markers, as well as environmental studies as regards priority and emerging pollutants. The current projects deals with the design of new strategies for developing in situ dispositives and capillary liquid chromatography and nanochromatography analyzers in order to monitorize and characterize the environment and human security and health. Nanomaterials are being studied. She has contributed to the discipline by introducing new concepts about calibration, accuracy, and quality of the analytical results, multiresidue analysis, in situ devices and liquid chromatography. She is the leader of a consolidated research group "miniaturization and total methods of analysis" (MINTOTA: <http://www.uv.es/mintota>) created in 1988, and has established collaborations with other research groups of the Spanish and European universities, and develops activities dealing with knowledge and technology transfer with companies, autonomic organizations and research centres. She is co-author of more than 200 scientific publications, such as articles in specialized international magazines and different book chapters, and she has participated in numerous scientific congresses. She has co-supervised ten doctoral theses. She has also experience on university management, Dean of the Faculty of Chemistry 2009–2014 and at present Vice-Rector of research and scientific policy since 2014. She is a reviewer in JCR journals magazines of the discipline and evaluator of several quality and research agencies and commissions.

Smartphone-based photometer coupled to a colorimetric biosensor integrated in a multi-well microplate: Application to the multiple analysis of glucose in human serum samples

Smartphone-based photometer coupled to a colorimetric biosensor integrated in a multi-well microplate: Application to the multiple analysis of glucose in human serum samples

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Valencia,

Doctor Moliner 50, Burjassot (Valencia) Spain

ABSTRACT

In the present work, a biosensor adapted in a 96-well microplate has been coupled with a smartphone-based photometer in order to develop a low-cost colorimetric multi-sample dispositive. The strength of this biosensing system is the integration of the biosensor into the 96-well microplate, and the use of a smartphone and free image analysis software as a microplate reader. The performance of the proposed biosensor has been demonstrated to determine glucose in several human serum samples. This method is simple, cost-effective, sensitive and selective for the determination of glucose, with detection limits of 1.8 mg/L and a good linearity over the range 6-80 mg/L. Precision was also satisfactory (relative standard deviation, %RSD<5). The performance of the biosensing system has been compared with the conventional derivatization method, adding all the reagents in solution and measuring the absorption at 653 nm. Results obtained indicated that this approach simplifies significantly the analytical measurements, avoids the need to prepare derivatization reagents, is portable, and allows multiple in-situ measurements simultaneously. Thus, the simplicity of the test has been improved not only in the reaction step but also in the response measurement.

Keywords: Colorimetric biosensor, glucose, smartphone-based photometer, multi-well microplate.

1. Introduction

Currently trends in the development of new analytical methodologies are focused in the simplicity. Productivity-related properties (rapidity and inexpensiveness) are prioritized in this type of procedures, although quality parameters, such as the accuracy, robustness, sensitivity and selectivity are also taken into account.

These new methodologies are specially designed to provide analytical information in a simple, rapid way, when the number of samples to analyze is high (Valcárcel and Cárdenas, 2005). Furthermore, one interesting aspect of these devices is the portability, which allows the possibility to carry out in-situ analysis, avoiding the need of transport the samples into the laboratory.

In the clinical field, where lots of different samples have to be treated daily, methods using multi-well plates combined with microplate readers are still one of the most used methodologies applied to perform multiple analyses. Nevertheless, although microplate readers are widely used in various readout tests, these instruments are expensive and non-portable, limiting their use in rural areas or developing countries. Therefore, a simple, cost effective, easy-to-use, and portable alternative to microplate reader would be welcomed to mitigate these problems (Berg et al., 2015; Fu et al., 2016).

In recent years, smartphones have become an interesting tool in the analytical field due their high resolution cameras, easy-operation, portability, programmability and high storage capacity. All of these features can be applied in the areas of monitoring and mobile diagnostics (Jia et al., 2015; Lopez-Ruiz et al., 2014; Mei et al., 2016; Vashist et al., 2014). Additionally, free image-editor applications can also be a very useful alternative to scientific equipment (Argente-García et al., 2016; Muñoz-Ortuño et al., 2015).

On the other hand, reliable and accurate saccharide sensors are continually developed in order to analyze glucose and/or their derivatives in physiological media (approximately the 85% of the current world biosensor market are for glucose determination) (Haghighi et al., 2015; Wannajuk et al., 2012). The main analytical characteristics of some techniques have been summarized in **Table 1**. Additionally, diabetes was declared as a global epidemic by the World Health Organization owing to its growth worldwide (Jia et al., 2015). Therefore, the challenge of providing accurate control of diabetes has remained the driving force in numerous research efforts (Haghighi et al., 2015; Honda et al., 2009; Xia et al., 2013).

In this sense, a dispositive capable of combine both methodologies (glucose sensor and smartphone-based photometer) would take advantage of their benefits, providing a new interesting approach. In previous works, Pla-Tolós et al. (Pla-Tolós et al., 2016) developed a biosensor applicable to determine H_2O_2 , based on the immobilization of the reagents in a polymeric support (PDMS-TEOS-SiO₂NPs).

This work pretends to go further; a new biosensor integrated in a multi-well plate has been developed to analyse glucose in human serum samples. Moreover, a smartphone has been employed as a microplate reader, avoiding the need of sophisticated instrumentation. The biosensor is based on the immobilization of glucose oxidase (GOx), horseradish peroxidase

(HRP) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) in a polymeric support. Two modalities of the sensor have been developed: firstly, single discs were developed as a prototype; secondly the biosensor was adapted in a multi-well microplate (**Figure 1**). This new approach improves the toxicity, portability and can be a promising tool to determine analytes which requires the use of biomolecules and organic reagents as substrate.

2. Materials and methods

2.1. Instruments

UV-vis measurements were recorded by 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. The LG Optimus L5 II smartphone (LG, South Korea) was used to take photos of the sensors. The images were analyzed by the open-source software ImageJ. For preparing the composite, ultrasonic bath (300W) from Sonitech and magnetic stirrer (45W) from Stuart Scientific (United Kingdom) was used. Plastic well-plates (Sharlau, Spain) and 96-well microplates (Termo Scientific, Denmark) were used as template to fabricate the sensor. An iPad mini (Apple, USA), with the free app MyLight installed, was employed as a source of uniform illumination. BGStar® blood glucose meter was used to measure the level of glucose in blood (Sanofi, France).

2.2. Reagents and solutions

Nanopure water obtained using Nanopure II system (Barnstead, USA) was used for preparation and dilution of all solutions. Sylgard® 184 silicon elastomer base and Sylgard® 184 silicon elastomer curing agent were purchased from Dow Corning (United States). Silicon dioxide was provided from Sigma-Aldrich (China). D(+)-Glucose 1-hydrate was purchased from Panreac (Spain). Glucose oxidase was obtained from Sigma-Aldrich (United Kingdom). Tetraethyl orthosilicate was got from Sigma-Aldrich (Germany). 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine was bought from Sigma-Aldrich (Switzerland). Horseradish peroxidase was obtained from Sigma (United States). Sodium acetate was provided from Panreac (Spain). Acetic acid was purchased from Sharlau (Spain).

2.3. Preparation of the PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx biosensor

Two different modalities of sensors were assayed in this work: firstly, a dispositive to carry out single analysis was developed as a prototype. Secondly, this sensor was adapted in a 96-well microplate to allow the measurement of several samples simultaneously.

2.3.1. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx single analysis biosensor

The prototype sensor used to perform single analysis was developed by mixing 8 mg of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 5 mg of silicon dioxide, 1 mg of GOx and 50 μl of a dispersion of HRP in TEOS (1mg mL^{-1}) in 2 g of TEOS, under ultrasonic conditions during 10 min. Then, 2 g of base were added to the suspension, followed by vigorous stirring for 15 min. After that, curing agent was aggregated to the dispersion at a weight ratio of 1:10 to the base and stirred for other 15 min. The individual PDMS composites were formed weighting 0.2 g of the blend in a well polystyrene plate ($d=1.5\text{ cm}$). Finally they were cured at 30°C during 12 h.

2.3.2. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx multiple analysis biosensor

The multiple-analysis biosensor was worked out by mixing 4 mg of 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, 2.5 mg of silicon dioxide, in 1 g of TEOS, under ultrasonic conditions during 10 min. Then, 1 g of base was added to the suspension, followed by vigorous stirring for 15 min. Curing agent was incorporated into the dispersion at a weight ratio of 1:10 to the base and stirred for other 15 min. 25 μl of the suspension were placed in each 96-well microplate and were cured at 30°C during 12 h. 20 μl of a solution of HRP ($1\mu\text{g mL}^{-1}$) and 20 μl of a solution of GOx (0.1mg mL^{-1}) were added in each 96-well microplate and were vacuum dried (**Figure 2**).

2.4. Glucose measurement procedures

2.4.1. Solution derivatization

The proposed method is based on two enzymatic cascade reactions. Firstly, GOx catalyses the oxidation of glucose into hydrogen peroxide and gluconic acid. Secondly, the oxidation of TMB is produced by the hydrogen peroxide formed in the previous reaction, catalysed by the HRP. The oxidized TMB gives rise to the apparition of a blue color with a maximum of absorbance at 653 nm. To perform this reaction, 1 mL of buffer NaAc/HAc ($0.1\text{M pH } 5$), 20 μl of TMB (3.5 mg mL^{-1}), 20 μl of HRP ($1\mu\text{g mL}^{-1}$), 20 μl of GOx (1 mg mL^{-1}) and the glucose were placed in the same vial. After 15 minutes, the absorbance was measured at 653 nm.

2.4.2. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx biosensor

Here, two different methodologies were carried out to perform the analysis depending on the modality of the biosensor used (single or multiple):

2.4.2.1. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx single analysis biosensor

A biocomposite (with the HRP, GOx and the TMB entrapped into the PDMS-TEOS-SiO₂NPs matrix) was placed in a vial with 1 mL of buffer NaAc/HAc ($0.1\text{M pH } 5$). Then, different concentrations of glucose were added, and the mixture was left to react for 15 minutes. After this time, the absorbance was measured at 653 nm.

2.4.2.2. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx multiple analysis biosensor

The biocomposite (with the HRP and GOx adsorbed, and the TMB entrapped into the PDMS-TEOS-SiO₂NPs matrix) was placed at the bottom of each 96-well microplate. 100 µl of buffer NaAc/HAc (0.1M pH 5) and 10 µl of solutions of glucose with different concentrations were added into each 96-well microplate and was left to react for 15 minutes. Next, the solution was acidified with 10 µL of HCl (6M).

2.4.2.2.1. Measurement protocol

The 96-well microplate was placed on the top of a dark hood, in which the screen of an iPad mini was used as a source of background light, though the free app MyLight. Subsequently, a smartphone was inserted inside the base of the hood and the image was taken. The hood had an aperture of 12.5 cm x 8.5 cm on its top, in alignment with the smartphone's back camera (**Figure 3**).

The open-source image analysis software ImageJ was employed to evaluate the color intensity of the pictures (Chen et al., 2010). For this purpose, the Readplate plugin (available in the webpage of this software) was downloaded and installed in order to convert the images obtained by the smartphone into RGB numerical values. This mode of color is based on the additive synthesis, which means that colors are obtained through the addition of the three primary ones (red, blue, green). Therefore, maximum values of all the channels give rise to the white color, while if all the values are zero, black color is obtained.

For the quantification of the yellow color, the blue channel intensity was chosen due it provided the best results.

Thus, when the photo was correctly fitted into the grid provided by the software, measurements were performed (**Figure 4**). Finally, the color intensity obtained was automatically converted into a value of absorbance through the expression $A = -\log B/255$, where B is the value of the blue coordinate and 255 represents the maximal transmitted light intensity.

The smartphone images were captured at a fixed distance of 20 cm, from the smartphone's back camera and the screen.

2.5. Analysis of samples

Five fasting samples of blood were taken from five volunteers. To obtain the serum, samples were left to coagulate at room temperature for 60 minutes and centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm. Finally, the serum, which was on the top of the tube, was separated and stored in the -18°C before their analysis.

On the other hand, more serum samples were obtained from four patients who were treated in a hospital. As in the previous case, they were stored at -18°C until analysis.

3. Results and discussion

3.1. Reaction conditions

The activity of enzymes is influenced by different parameters, such as pH or temperature. So, its effects were systematically investigated and optimized to obtain the best performance.

In the proposed biosensor, two enzymes are required to perform the colorimetric reaction: on the one hand, glucose oxidase, which catalyses the oxidation of glucose into gluconic acid and hydrogen peroxide; on the other hand, horseradish peroxidase, which catalyses the oxidation of TMB by hydrogen peroxide. Each of these enzymes presents the maximum activity in a specific value of pH. The optimum pH for glucose oxidase is 5.5, while it has a broad activity range of pH 4-7 (Bright and Appleby, 1969; Nikolaev et al., 2015). In the case of the HRP, its optimum pH is in the range of 6.0 to 6.5 (Schomberg et al., 1993).

Four different buffer solutions, with pH ranged from 5 to 8, were prepared to carry out the reaction. It was observed that, for the same concentration of glucose (73 mg/L), blue colour decreased when the pH increased, obtaining the best signal at a pH 5. Thus, a pH 5 was used for further experiments.

The reaction time, counted from when the glucose is added to the solution, affected directly the absorbance and further determined the sensitivity and detection range of the glucose sensor. 15 minutes reaction time was chosen due to the detection limit obtained was enough to detect levels of glucose present in blood.

By the same way, reaction was carried out at room temperature; although usually this reaction is carried out at 37 °C (Liu et al., 2015). The concentrations of glucose in serum could be quantified without the need of heating the solution, making the method simpler.

3.2. Immobilization of HRP and GOx in PDMS-TEOS-SiO₂NPs biofilm

3.2.1. PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB-HRP-GOx single analysis biosensor: Prototype

In previous work, immobilization of TMB and the enzyme HRP was studied and optimized (Pla-Tolós et al., 2016). Thus, initially, the immobilization of the GOx was assayed, keeping the amount of HRP and TMB constant. During the optimization of the biosensor, different compositions and proportions of reagents were tested.

It has to be said that the TMB oxidation process presents different colors depending on time and the oxidation state. The blue product is a one-electron oxidation product of TMB, and the yellow product is the two-electron oxidation product. Green color can be observed as a mixture of the initial blue product and the final yellow (Josephy et al., 1982).

First of all, a single biofilm was used as a prototype. In order to select the most efficient immobilization process, two different techniques of immobilization were assayed: adsorption and entrapment. Furthermore, two different adsorption procedures were tested: adsorption from a solution and adsorption by deposition.

Initially, GOx was adsorbed in the surface of the composite, while the TMB and the HRP were entrapped. Solutions with concentrations ranged from 0.5 to 3 mg mL⁻¹ of the enzyme were prepared. Then, the biocomposite was placed in 200 µl of these solutions and left to react during 1 h (each side) at room temperature. Finally, the biocomposites were rinsed with phosphate buffer at pH 7 (Pla-Tolós et al., 2016).

In order to know the amount of GOx adsorbed in the surface of the sensor, a calibration graph with the GOx in solution was required. This curve was obtained from the absorbance (at 653 nm) corresponding to a solutions containing a constant glucose concentration, different concentrations of GOx and a sensor with the HRP and the TMB entrapped inside the composite. Thus, intercepting the signal (obtained with the GOx adsorbed) in the calibration curve constructed with the GOx in solution, the percentage of enzyme adsorbed was estimated, being 3.0±0.7 %. Moreover, the amount of GOx adsorbed on the composite was proportional to the concentration of the incubation solution. According to these results, the adsorption process was dependent on the solution used, and the adsorption behaviour was studied. A lineal tendency was observed for the isothermal plot $C_{S(\text{mg GOx}\cdot\text{g}^{-1}\text{ solid})}$ against $C_{m(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})}$, where C_s represents the amount of enzyme adsorbed in mg, and C_m is the concentration of enzyme in the solution, being the equation $C_{S(\text{mg GOx}\cdot\text{g}^{-1}\text{ solid})} = 0.1232 \cdot C_{m(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1})} + 0.1896$. Hence, to work under similar conditions to those established in the solution procedure, a solution of 3.3 mg mL⁻¹ of GOx (for incubation) was selected. Taking into account that the sensor was incubated in 200 µl and the theoretical amount adsorbed represented 3% of the total amount, 2.8 units of GOx were adsorbed per unit of sensor.

To carry out the second technique of adsorption, the HRP and the GOx were immobilized on the surface of the composite by evaporating the solvent. Thus, 20 µL of a solution 1 µg HRP mL⁻¹, and 20 µL of 1 mg GOx mL⁻¹ were deposited on the surface of the sensor (containing the TMB) and vacuum dried. The concentrations of the enzymes were selected to be the same than the used in the solution derivatization (18 ng HRP mL⁻¹ and 18 µg GOx mL⁻¹).

Finally, GOx was entrapped inside the film (with the HRP and TMB), in concentrations ranged from 5 to 50 µg/sensor. The best results were obtained by using 50 µg/sensor which contains 7 units/sensor. In conclusion, different strategies of immobilization and configurations were tested with the three reagents (TMB, HRP and GOX), obtaining good results. However, although all of these procedures can be used, we decided to entrap all the reagents in the polymeric matrix, because only one step is required for the synthesis, simplifying the method.

3.2.2. Biofilms adapted to micro-well plate

Once the single biofilm was optimized, its composition (with the HRP, GOx and TMB entrapped) was adapted in a multi-well microplate in order to allow the analysis of several samples simultaneously. Additionally, a reduction of volume of about 10 times was achieved by using this format; 100 µL of buffer solution and 10 µL of glucose solution were the volumes selected to perform the experiments, instead of 1 mL of buffer solution employed in the prototype.

Firstly, different volumes of the PDMS-TEOS-NPs-TMB were placed in the wells (25, 50 and 75 μl) to study the influence of the thickness in the analytical signal. Best results were obtained with 25 μl , which was the amount of the mixture used in further experiments. This behaviour could be explained because a less thick film favours the diffusion of the reagent into the solution.

In this new format, the films based on enzyme immobilization by entrapment presented lower responses, probably because there is less surface of contact between the biocomposite and the solution, so the diffusion of the reagents into the solution is lower. For this reason, enzymes were adsorbed in the surface of the film, keeping the TMB entrapped in the matrix. However, using this approach, the color obtained after 15 minutes of reaction was still pale blue. Thus, it was decided to enhance the sensibility acidifying the solution with the purpose of obtaining the yellow color. In **Figure 5** is shown the comparison between the calibrates obtained using the blue and the yellow approach. For the blue color, the red coordinate was chosen to quantify the intensity of the signal because provide the best results.

3.3. Colorimetric detection of glucose in the microplate wells

One of the aims of this work was to develop a cost effective method for multiple samples that required the minimum instrumentation. So, the use and process of digital imagens could be an alternative. In order to reach that goal, a study of the imaging conditions was performed.

Ambient conditions (light, distance) (Ariza-Avidad et al., 2015; Jia et al., 2015; Lopez-Ruiz et al., 2014) are important factors to consider when an analysis using photos wants to be performed. Different conditions were tested to observe their influence on the reproducibility of the images. First of all, photos were taken in distinct ambient lights. Nevertheless, results showed that the intensity of the color coordinates (RGB) varied depending on the illumination. For this reason, in a second experience, the flash of the camera was used as a source of light. However, the flash produced reflexes which impeded the correct measurement of the colour coordinates. Additionally, using the flash, the illumination was not uniform, being zones with more light than others. Finally, we decide to use the screen of an iPad mini as a background. For this purpose, the free application MyLight was installed in the device. Furthermore, to avoid any other source of light, photos were taken inside a dark hood with an aperture on its top to place the 96 well-microplate and the iPad. Thus, the illumination achieved was uniform and free of reflexes. On the other hand, the distance selected to take the photo was the necessary to cover all the microplate. Once the image was digitalized, it was analyzed using ImageJ. Although there are several image editors available in the market, we decided to use this free and open-source software because no license is needed to run the program, decreasing the cost of the method. Furthermore, it can be executed in several operating systems.

3.4. Analytical parameters

The calibration curve for the glucose determination was established under the different methodologies used. Linear range, sensitivity and precision of the methods were evaluated. The calibration equations are presented in **Table 2A**. The obtained values indicate that this procedure provides adequate linearity in the working concentration interval 2.3-150 mg/mL and 6-80 mg/mL for the single and multiple format, respectively.

The detection limit (LOD) was calculated as $3\cdot s/\text{sensitivity}$, where s is the blank standard deviation (ElKaoutit et al., 2008), being 0.7 mg/L for the single dispositive and 1.8 for the multiple one.

Additionally, results acquired by these biosensors were compared with those obtained performing the reaction with all the reagents in solution. As can be seen in **Table 2A**, the analytical parameters obtained in solution and by using the biocomposites were similar, measuring at 653 nm. On the other hand, in the multi-well plate format, results were acquired processing the digital imagen using the software ImageJ. In this case, the solution was acidified to obtain the yellow color due sensibility was higher.

Furthermore, the precision was also evaluated for the different procedures. Interday and intraday relative standard deviation (%RSD) was calculated using sensors synthesized in the same batch. Using the solution method, the intraday %RSD was 3, while it was 5 for the single film method and 4 using the multi-well plate format. Interday %RSD obtained values were 6, 5 and 5 for solution, single biofilm and multi-well plate, respectively. These results indicate satisfactory %RSD values. In addition, a batch-to-batch precision study was performed. For this aim, the responses of the three sensors prepared in three different batches under identical conditions were obtained. The batch-to-batch %RSD values were 5 and 7 for the multi-well format and single biofilm, respectively. The low %RSD values obtained give evidence that the proposed biosensors are precise sensors for their practical application.

On the other hand, the main characteristics of the different formats of sensors assayed were summarized in **Table 2B**.

3.5. Determination of glucose in real samples

The applicability of the biosensor to determine glucose was evaluated by analysing different real samples of serum. Validation of this methodology was carried out by comparing the results with those obtained using a BGStar® blood glucose meter. In **Figure 6A** are shown the concentration of glucose found in samples of 5 volunteers using different procedures.

In the analysis of human serum with the biocomposite, a standard addition method was performed to verify if there was a matrix effect. For a level of significance of 95%, $t_{\text{calc}}(0.005) < t'(2.132)$, so the slopes are statistically equal. Thus, no matrix effect was observed and the concentration was calculated by interpolation in the calibration curve with standards.

For the statistical analysis of the results, one-way ANOVA with a level of significance of 95% was performed using the IBM SPSS Statistics v 22. In all cases, the statistical parameter α was higher than 0.05 (0.294, 0.653, 0.164, 0.818 and 0.214, for volunteer 1, 2, 3, 4 and 5,

respectively). Therefore, no significant statistical differences between the three methodologies were observed at a level of significance of 95%. Thus it can be concluded that these different methodologies are statistically equal.

On the other hand, the serum of four patients of a hospital was also analysed both by the staff of the hospital, using a BGStar® blood glucose meter and with the multiple biosensor format (**Figure 6B**). As in the previous case, a statistical analysis of the three methods was performed in order to compare the results obtained. In this situation, the values of α were also higher than 0.05, being 0.09, 0.08, 0.158 and 0.135, for patient 1, 2, 3 and 4, respectively. These results showed that the values obtained by the three methodologies were statistically comparable, which means that the proposed methodology may be applied in the routine analysis of glucose in several patients simultaneously, reducing time and costs.

3.6. Interferences

Under the optimum conditions, the effect of different species on the sensor response was examined: citric acid (668 mg/L), L-cysteine (564 mg/L), gluconic acid (363 mg/L) and L-lysine (182 mg/L). It was observed that these substances did not cause any observable interference in the response of the sensor. These results were in agreement with the results obtained by Mitra et al. (2014).

3.7. Comparison with other methods

In **Table 1** are shown some analytical parameters of other procedures described in the literature to determine glucose. During the last five years, more than one hundred publications related with glucose sensors were published annually, demonstrating that the research in the field of glucose determination is current and is continuously on demand. Furthermore, as can be observed, several methods are based on optical techniques, while the electric ones are also numerous. On the other hand, some techniques use enzymes to perform the reaction, while others are catalyzed by non-enzymatic compounds. Here, the main characteristics and analytical parameters of each method have been summarized to be compared with those obtained in this work. Similar detection limits to those presented in the literature can be reached by using this methodology. However, one of the most interesting advantages the biosensors integrated in multiple-well plates is the potential to perform several analysis simultaneously.

4. Conclusions

In the present work we have developed a straightforward procedure to perform simultaneous analysis by using the combination of a smartphone-based photometer and a biosensor integrated in a 96-well microplate. This approach is based on the immobilization of all the reagents in the biosensor film. The procedure has been applied to determine several samples

of glucose simultaneously, being the enzymes GOx and HRP selected as model enzymes for its development. Moreover, TMB was selected as a chromogenic reagent. Thus, this biocomposite replaces the addition of derivatization reagents and their preparation. Satisfactory %RSD values and LOD have been achieved. The reliability of the proposed biosensor has also been successfully demonstrated. The results have been validated by comparison with the conventional derivatization in solution. A comparative study between the biosensor and the combination of biosensor-microplate wells has been realized. The integration of films biosensors with microplate wells brings advantages in simplicity, rapidity, stability, low cost, portability and in-situ analysis, as well as high sensibility for determination of glucose in serum samples. The device fabrication is simple and rapid, and the cost of manufacturing a large number of devices is very low.

We believe that this work represents a new way to provide rural and developing areas with a dispositive capable to perform this kind of analysis. In future, we will apply the scope of the application of this platform to cover many areas such environmental monitoring or clinical diagnosis.

Acknowledgements

The authors thank to the Ministerio de Economía y Competitividad (Spain)/FEDER UE (Project CTQ2014-53916-P) and to the Generalitat Valenciana (PROMETEO Program 2012/045).

References

- Argente-García, A., Muñoz-Ortuño, M., Molins-Legua, C., Moliner-Martínez, Y., Campíns-Falcó, P., 2016. A solid device based on doped hybrid composites for controlling the dosage of the biocide N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine in industrial formulations. *Talanta* 147, 147–154. doi:10.1016/j.talanta.2015.09.051
- Ariza-Avidad, M., Agudo-Acemel, M., Salinas-Castillo, A., Capitán-Vallvey, L.F., 2015. Inkjet-printed disposable metal complexing indicator-displacement assay for sulphide determination in water. *Anal. Chim. Acta* 872, 55–62. doi:10.1016/j.aca.2015.02.045
- Berg, B., Cortazar, B., Tseng, D., Ozkan, H., Feng, S., Wei, Q., Chan, R.Y.L., Burbano, J., Farooqui, Q., Lewinski, M., Di Carlo, D., Garner, O.B., Ozcan, A., 2015. Cellphone-Based Hand-Held Microplate Reader for Point-of-Care Testing of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *ACS Nano* 9, 7857–7866. doi:10.1021/acs.nano.5b03203
- Bright, H.J., Appleby, M., 1969. The pH Dependence of the Individual Steps in the Glucose Oxidase Reaction The pH Dependence of the Individual Glucose Oxidase Reaction * 244, 3625–3634.
- Chen, A., Ding, Y., Yang, Z., Yang, S., 2015. Constructing heterostructure on highly roughened caterpillar-like gold nanotubes with cuprous oxide grains for ultrasensitive and stable nonenzymatic glucose sensor. *Biosens. Bioelectron.* 74, 967–973.

doi:10.1016/j.bios.2015.07.074

Chen, S.C., Tsai, C.J., Chou, C.C.K., Roam, G.D., Cheng, S.S., Wang, Y.N., 2010. Ultrafine particles at three different sampling locations in Taiwan. *Atmos. Environ.* 44, 533–540.

doi:10.1016/j.atmosenv.2009.10.044

ElKaoutit, M., Naranjo-Rodriguez, I., Domínguez, M., Hernández-Artiga, M.P., Bellido-Milla, D., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L., 2008. A third-generation hydrogen peroxide biosensor based on Horseradish Peroxidase (HRP) enzyme immobilized in a Nafion-Sonogel-Carbon composite. *Electrochim. Acta* 53, 7131–7137. doi:10.1016/j.electacta.2008.04.086

Farid, M.M., Goudini, L., Piri, F., Zamani, A., Saadati, F., 2016. Molecular imprinting method for fabricating novel glucose sensor: Polyvinyl acetate electrode reinforced by MnO₂/CuO loaded on graphene oxide nanoparticles. *Food Chem.* 194, 61–67.

doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.128

Fu, Q., Wu, Z., Li, X., Yao, C., Yu, S., Xiao, W., Tang, Y., 2016. Biosensors and Bioelectronics Novel versatile smart phone based Microplate readers for on-site diagnoses 81, 524–531.

doi:10.1016/j.bios.2016.03.049

Haghighi, B., Karimi, B., Tavahodi, M., Behzadnia, H., 2015. Fabrication of a nonenzymatic glucose sensor using Pd-nanoparticles decorated ionic liquid derived fibrillated mesoporous carbon. *Mater. Sci. Eng. C* 52, 219–224. doi:10.1016/j.msec.2015.03.045

Honda, M., Kataoka, K., Seki, T., Takeoka, Y., 2009. Confined stimuli-responsive polymer gel in inverse opal polymer membrane for colorimetric glucose sensor. *Langmuir* 25, 8349–8356. doi:10.1021/la804262b

Hu, F., Huang, Y., Zhang, G., Zhao, R., Zhang, D., 2014. A highly selective fluorescence turn-on detection of hydrogen peroxide and d-glucose based on the aggregation/deaggregation of a modified tetraphenylethylene. *Tetrahedron Lett.* 55, 1471–1474.

doi:10.1016/j.tetlet.2014.01.056

Huan, Y.F., Fei, Q., Shan, H.Y., Wang, B.J., Xu, H., Feng, G.D., 2015. A novel water-soluble sulfonated porphyrin fluorescence sensor for sensitive assays of H₂O₂ and glucose. *Analyst* 140, 1655–1661. doi:10.1039/C4AN02142H

Jang, H., Min, D.-H., 2015. Highly precise plasmonic and colorimetric sensor based on enzymatic etching of nanospheres for the detection of blood and urinary glucose. *RSC Adv.* 5, 14330–14332. doi:10.1039/C4RA15485A

Jia, M.Y., Wu, Q.S., Li, H., Zhang, Y., Guan, Y.F., Feng, L., 2015. The calibration of cellphone camera-based colorimetric sensor array and its application in the determination of glucose in urine. *Biosens. Bioelectron.* 74, 1029–1037. doi:10.1016/j.bios.2015.07.072

Josephy, P.D., Eling, T., Mason, R.P., 1982. The Horseradish Peroxidase-catalyzed Oxidation of 3,5,3',5'-Tetramethylbenzidine. *J. Biol. Chem.* 257, 3669–3675.

Khan, A.Y., Noronha, S.B., Bandyopadhyaya, R., 2015. Impact of structural features of SBA-15

- host particles on activity of immobilized glucose oxidase enzyme and sensitivity of a glucose sensor. *J. Porous Mater.* 22, 369–378. doi:10.1007/s10934-014-9905-5
- Li, R., Zhen, M., Guan, M., Chen, D., Zhang, G., Ge, J., Gong, P., Wang, C., Shu, C., 2013. A novel glucose colorimetric sensor based on intrinsic peroxidase-like activity of C60-carboxyfullerenes. *Biosens. Bioelectron.* 47, 502–507. doi:10.1016/j.bios.2013.03.057
- Liu, C., Sheng, Y., Sun, Y., Feng, J., Wang, S., Zhang, J., Xu, J., Jiang, D., 2015. A glucose oxidase-coupled DNAzyme sensor for glucose detection in tears and saliva. *Biosens. Bioelectron.* 70, 455–461. doi:10.1016/j.bios.2015.03.070
- Liu, Q., Ding, Y., Yang, Y., Zhang, L., Sun, L., Chen, P., Gao, C., 2016. Enhanced peroxidase-like activity of porphyrin functionalized ceria nanorods for sensitive and selective colorimetric detection of glucose. *Mater. Sci. Eng. C* 59, 445–453. doi:10.1016/j.msec.2015.10.046
- Lopez-Ruiz, N., Curto, V.F., Erenas, M.M., Benito-Lopez, F., Diamond, D., Palma, A.J., Capitan-Vallvey, L.F., 2014. Smartphone-based simultaneous pH and nitrite colorimetric determination for paper microfluidic devices. *Anal. Chem.* 86, 9554–9562. doi:10.1021/ac5019205
- Mei, Q., Jing, H., Li, Y., Yisibashaer, W., Chen, J., Nan, B., 2016. Biosensors and Bioelectronics Smartphone based visual and quantitative assays on upconversional paper sensor. *Biosens. Bioelectron.* 75, 427–432. doi:10.1016/j.bios.2015.08.054
- Mitra, K., Ghosh, A.B., Sarkar, A., Saha, N., Dutta, A.K., 2014. Colorimetric estimation of human glucose level using γ -Fe₂O₃ nanoparticles: An easily recoverable effective mimic peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 451, 30–35. doi:10.1016/j.bbrc.2014.07.028
- Muñoz-Ortuño, M., Argente-García, A., Moliner-Martínez, Y., Molins-Legua, C., Campíns-Falcó, P., 2015. Polydimethylsiloxane composites containing 1,2-naphthoquinone 4-sulphonate as unique dispositive for estimation of casein in effluents from dairy industries. *Anal. Chim. Acta* 873, 31–37. doi:10.1016/j.aca.2015.02.057
- Nakabayashi, Y., Hirosaki, Y., Yamauchi, O., 2006. Dipolar ruthenium-amine complexes with 4,4'-bipyridinium ions accessible for both amperometric and colorimetric glucose sensors. *Inorg. Chem. Commun.* 9, 935–938. doi:10.1016/j.inoche.2006.05.024
- Nikolaev, K., Ermakov, S., Ermolenko, Y., Averyaskina, E., Offenhäusser, A., Mourzina, Y., 2015. A novel bioelectrochemical interface based on in situ synthesis of gold nanostructures on electrode surfaces and surface activation by Meerwein's salt. A bioelectrochemical sensor for glucose determination. *Bioelectrochemistry* 105, 34–43. doi:10.1016/j.bioelechem.2015.05.004
- Ornatska, M., Sharpe, E., Andreescu, D., Andreescu, S., 2011. Paper bioassay based on ceria nanoparticles as colorimetric probes. *Anal. Chem.* 83, 4273–4280. doi:10.1021/ac200697y
- Pla-Tolós, J., Moliner-Martinez, Y., Molins-Legua, C., Campins-Falcó, P., 2016. Colorimetric

- biosensing dispositive based on reagentless hybrid biocomposite: Application to hydrogen peroxide determination. *Sensors Actuators B Chem.* 231, 837–846. doi:10.1016/j.snb.2016.03.094
- Prasad, R., Bhat, B.R., 2015. Multi-wall carbon nanotube–NiO nanoparticle composite as enzyme-free electrochemical glucose sensor. *Sensors Actuators B Chem.* 220, 81–90. doi:10.1016/j.snb.2015.05.065
- Schomberg, D., Salzmänn, M., Stephan, D., 1993. *Enzyme Handbook*, Enzyme Handbook. Springer-Verlag, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-58903-4
- Sedghi, R., Pezeshkian, Z., 2015. Fabrication of non-enzymatic glucose sensor based on nanocomposite of MWCNTs-COOH-Poly(2-aminothiophenol)-Au NPs. *Sensors Actuators B Chem.* 219, 119–124. doi:10.1016/j.snb.2015.04.097
- Shen, Y., Zhang, X., Huang, X., Zhang, Y., Zhang, C., Jin, J., Liu, X., Li, H., Yao, S., 2015. A new fluorescence and colorimetric sensor for highly selective and sensitive detection of glucose in 100% water. *RSC Adv.* 5, 63226–63232. doi:10.1039/C5RA11116A
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., 2005. Vanguard-rearguard analytical strategies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 67–74. doi:10.1016/j.trac.2004.07.016
- Vashist, S.K., van Oordt, T., Schneider, E.M., Zengerle, R., von Stetten, F., Luong, J.H.T., 2014. A smartphone-based colorimetric reader for bioanalytical applications using the screen-based bottom illumination provided by gadgets. *Biosens. Bioelectron.* 67, 248–255. doi:10.1016/j.bios.2014.08.027
- Wang, X.D., Chen, H.X., Zhou, T.Y., Lin, Z.J., Zeng, J. Bin, Xie, Z.X., Chen, X., Wong, K.Y., Chen, G.N., Wang, X.R., 2009. Optical colorimetric sensor strip for direct readout glucose measurement. *Biosens. Bioelectron.* 24, 3702–3705. doi:10.1016/j.bios.2009.05.018
- Wannajuk, K., Jamkatoke, M., Tuntulani, T., Tomapatanaget, B., 2012. Highly specific-glucose fluorescence sensing based on boronic anthraquinone derivatives via the GOx enzymatic reaction. *Tetrahedron* 68, 8899–8904. doi:10.1016/j.tet.2012.08.037
- Xia, X., Long, Y., Wang, J., 2013. Glucose oxidase-functionalized fluorescent gold nanoclusters as probes for glucose. *Anal. Chim. Acta* 772, 81–86. doi:10.1016/j.aca.2013.02.025
- Yang, S., Li, G., Wang, G., Zhao, J., Gao, X., Qu, L., 2015. Synthesis of Mn₃O₄ nanoparticles/nitrogen-doped graphene hybrid composite for nonenzymatic glucose sensor. *Sensors Actuators B Chem.* 221, 172–178. doi:10.1016/j.snb.2015.06.110
- Yi, Y., Deng, J., Zhang, Y., Li, H., Yao, S., 2013. Label-free Si quantum dots as photoluminescence probes for glucose detection. *Chem. Commun. (Camb)*. 49, 612–614. doi:10.1039/c2cc36282a

Table captions

TABLE 1: Comparison of the proposed biocomposite with other sensors found in the literature.

TABLE 2: A) Figures of merit obtained using the proposed biocomposites (single and multiple) and the solution derivatization, B) Comparison of the main characteristics of the different configurations assayed.

Figure captions

FIGURE 1: Flowchart of the sensor and methodology applied.

FIGURE 2: Illustration of the fabrication process and detection principle of the glucose sensor. A: Introduction of the mixture composed by *PDMS-TEOS-SiO₂NPs-TMB* in each well. B: Addition of the enzymes HRP and GOx. C: Evaporation of the water D: Addition of the buffer and the glucose. E: Change of color produced by the oxidation of the TMB.

FIGURE 3: Schematic representation of the system applied to carry out the measurements.

FIGURE 4: An example of a picture of the microplate being analysed.

FIGURE 5: Comparison between the calibrates obtained before and after acidify the solutions.

FIGURE 6: Concentration of glucose found in a) volunteers, b) patients

Table 1

| Catalysts | Reagent | Analytical signal | LODs | Linear range | Ref |
|---|--|---------------------------------------|----------|--------------|-------------------------------|
| C ₆₀ [C(COOH) ₂] ₂ /GOx | TMB | Colorimetry | 0.5 μM | 1.0-40 μM | (Li et al., 2013) |
| GOx | CdTe/CdS PtF ₂₀ TPP | Colorimetry | 0.2mM | 0-3.0 mM | (Wang et al., 2009) |
| GOx | [Ru(NH ₃) ₅ (L ⁺)] ^{2+/3+} | Colorimetric/Amperometric | --- | --- | (Nakabayashi et al., 2006) |
| PVA/MNO ₂ @GO/CuO MIP | --- | Cyclic voltammetry | 0.053 mM | 0.5-4.4 mM | (Farid et al., 2016) |
| GOx/SBA-15 | --- | Amperometric | | 1.0-7.7 mM | (Khan et al., 2015) |
| MWCNTs-COOH-P2AT-Au NPS | --- | Voltammetric | 3.7μM | 0.1-30 mM | (Sedghi and Pezeshkian, 2015) |
| Mn ₃ O ₄ NPs/N-GR/CPE | --- | Electric | 1.0 μM | 2.5-529.5 μM | (Yang et al., 2015) |
| GOx | PLDz | Electrophoresis UV trans-illumination | 5 μM | 100 nM-10 mM | (Liu et al., 2015) |
| Cu ₂ O-CLAuNs | --- | Electric | 1.83 μM | 0.1-5 mM | (Chen et al., 2015) |
| NiO-MWCNT/CPE | --- | Electric | 11.04 nM | 1-200 μM | (Prasad and Bhat, 2015) |
| GOx/Au nanostructures electrode | --- | Electric | 0.02 mM | 0.06-18.5 mM | (Nikolaev et al., 2015) |
| GOx | PVP-AuAg | Colorimetry | --- | --- | (Jang and Min, 2015) |
| GOx | Naphthalimide | Fluorescence | 0.3 μM | 0-120 μM | (Shen et al., 2015) |
| GOx | Tetraphenylethylene | Fluorescence | 3 μM | 50-250 μM | (Hu et al., 2014) |
| GOx | Si QDs | Fluorescence | 0.68 μM | 5-650 μM | (Yi et al., 2013) |
| GOx | HAQB | Fluorescence | 11 μM | 80-420 μM | (Wannajuk et al., 2012) |
| GOx | Au nanoclusters | Fluorescence | 0.7 μM | 2.0-140 μM | (Xia et al., 2013) |
| GOx | H ₂ TEHPPS | Fluorescence | 0.32 μM | 0-5 μM | (Huan et al., 2015) |
| GOx/H ₂ TCPP-CeO ₂ | TMB | Colorimetry | 33 μM | 50-100 μM | (Liu et al., 2016) |
| GOx/γ-Fe ₂ O ₃ NPs | TMB | Colorimetry | 0.21 μM | 1-80 μM | (Mitra et al., 2014) |
| GOx | CeO ₂ NPs | Colorimetry | 0.5 mM | ≤ 100 mM | (Ornatska et al., 2011) |
| GOx/HRP | TMB | Colorimetry | 9 μM | 30-400 μM | This work |

Table 2A

| | Linearity ($y=a+bx$) (mM) | | | | Precision RSD (%) | | LOD (mg/L) | |
|--------------------|-----------------------------|---------------|-------------|-------|---------------------|----------------|----------------|----------------|
| | Color | $a\pm s_a$ | $b\pm s_b$ | R^2 | Linear range (mg/L) | Intraday (n=3) | | Interday (n=3) |
| Solution | Blue | 0.0184±0.0013 | 1.360±0.006 | 0.99 | 4.1-150 | 3 ¹ | 6 ¹ | 1.2 |
| Single biosensor | Blue | 0.017±0.008 | 1.49±0.04 | 0.99 | 2.3-140 | 5 ¹ | 5 ¹ | 0.7 |
| Multiple biosensor | Yellow | 0.06±0.04 | 1.27±0.18 | 0.98 | 6-80 | 4 ¹ | 5 ¹ | 1.8 |

¹Stablished at 50 mg/L

Table 2B

| Format | Reagent amount/sensor (μg) | | | Immobilization | | | Diameter (mm) | Thickness (mm) | Measure |
|-----------------|---|------|-----|----------------|-----------|-----------|---------------|----------------|----------|
| | TMB | HRP | GOx | TMB | HRP | GOx | | | |
| Single disc | 380 | 2.3 | 47 | Entrapped | Entrapped | Entrapped | 15 | 0.6 | Single |
| Multiple sensor | 75 | 0.02 | 2 | Entrapped | Adsorbed | Adsorbed | 7 | - | Multiple |

Figure 1

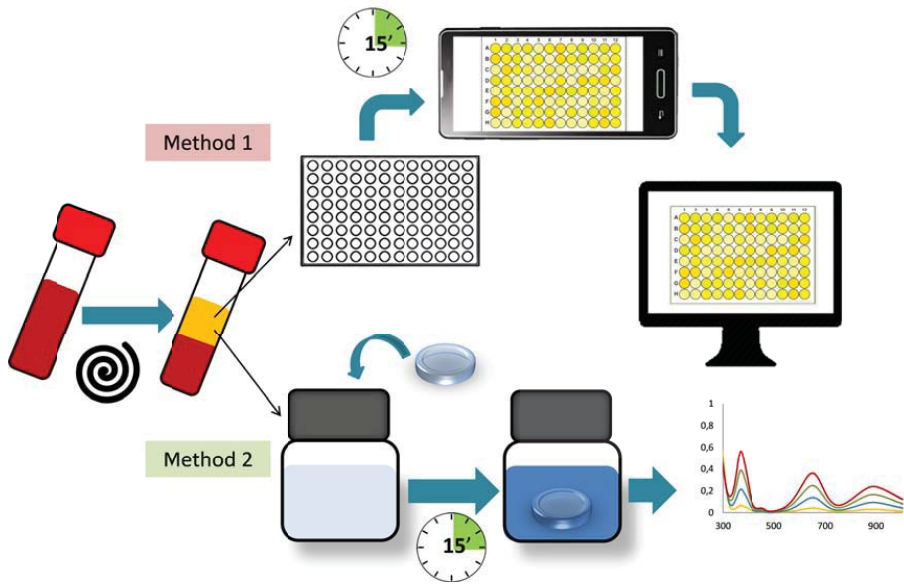


Figure 2

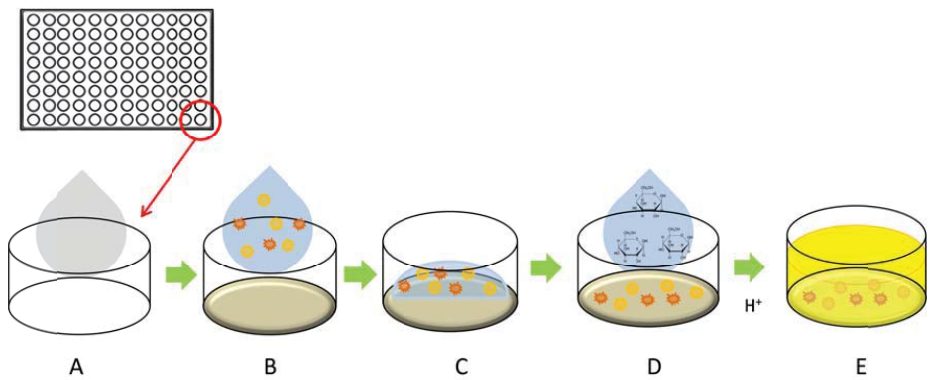


Figure 3

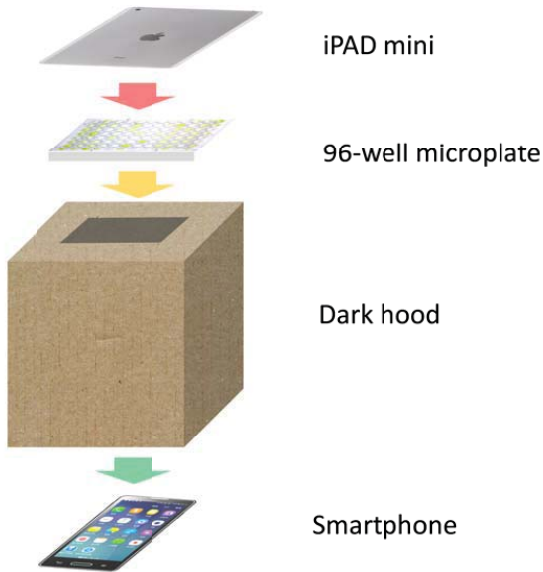


Figure 4

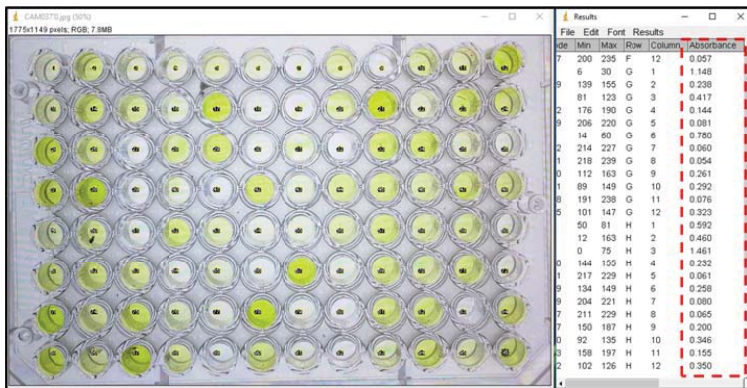


Figure 5

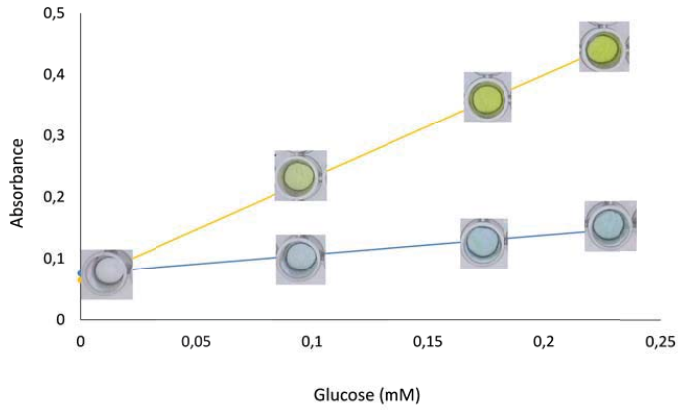


Figure 6

