

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abs, A	Absorbance / Absorbancia (UA)
AAS	Atomic Absorption Spectrophotometry / Espectrofotometría de Absorción Atómica
ATR	Total Internal Reflection / Reflexión Interna Total
$\alpha$	Relative absorbance / Absorbancia relativa
ARROW	Anti Resonant Reflecting Optical Waveguide / Guía de onda Óptica basada en la Reflexión Antiresonante
C	Concentration / Concentración (M)
CCD	Charge-Coupled Device / Dispositivo de Carga Acoplada
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor / Semiconductor de Óxidos Metálicos Complementarios
CNM	Centro Nacional de Microelectrónica
CVD	Chemical Vapour Deposition / Deposición Química en fase Vapor
d	Membrane thickness / Grosor de membrana ( $\mu\text{m}$ ó cm)
d.i.	Internal diameter / Diámetro interno
DOS	Bis-(2-ethylhexyl)sebacate / Sebacato de bis-(2-etilhexilo)
DCS	Dichlorosilane / Diclorosilano
Dm	Diffusion coefficient / Coeficiente de difusión ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )
ECR	Eriochrome R / Eriocromo R
$\epsilon$	Molar absorptivity / Coeficiente de absortividad molar ( $\text{Kg}/\text{mol}\cdot\text{cm}$ )
FIA	Flow Injection Analysis / Análisis por Inyección en Flujo
FIM	Fixed Interference Method / Método de Interferencia Fija o Método de las Soluciones Mezcladas
FTIR	Fourier Transform Infrared Region / Región del Infrarrojo con Transformada de Fourier
GSB	Sensors & Biosensors Group / Grup de Sensors i Biosensors
I	Intensity / Intensidad de emisión (mA)
IC	Integrated Circuits /

Circuitos Integrados	
ICMAB	Institut de Ciències dels Materials de Barcelona
ICP	Induced Coupled Plasma Mass Spectrometry /
Espectrometría de Masas Inducida	
por Acoplamiento de Plasma	
IR	Infrared region /
Región del Infrarrojo	
ISE	Ion-selective electrode / Electrodo Selectivo de Iones
ISFET	Ion-selective Field-effect Transistor /
Transistor de Efecto de Campo Selectivo de Iones	
IWAO	Integrated Waveguide Absorbance Optode /
Optodo Integrado de Guías de onda basado en medidas de Absorbancia	
K	Absorption coefficient /
Coefficiente de absorción	
K <sub>MEM</sub>	Apparent acidity constant /
Constante de acidez aparente	
K <sub>SV</sub>	Stern-Volmer constant /
Constante de Stern-Volmer	
K <sub>tpCIPB</sub>	Potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate / Tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio
L, l	Path length / Camino óptico (cm)
LED	Light Emmiting Diode /
Diodo Emisor de Luz	
LIRL	Lower Limit of the Linear Range/ Límite Inferior de Respuesta Lineal
LPCVD	Low Pressure Chemical Vapour Deposition /
Deposición Química en fase Vapor a Baja Presión	
LSRL	Upper Limit of the Linear Range /
Límite Superior de Respuesta	
Lineal	
$\lambda$	Wavelength / Longitud de onda
(nm)	
MAC	Maximum Admissible
Concentration /	
Concentración Máxima Admisible	
MTES	Methyltriethoxysilane /
Metiltriethoxisilano	
n, $\eta$	Refractive index /
Índice de refracción	
NA	Numeric aperture /Apertura
Numérica	
NIR	Near Infrared Region /
Region del Infrarrojo Cercano	
OTDR	Optical Time Domain Reflectometry /
Reflectometría Óptica en el Dominio Temporal	
P	Radiated power /
Potencia radiante (mV)	
$\rho$	Porosity / Porosidad (%)
PA	Analytical Grade / Para Análisis
PC	Personal Computer /
Ordenador personal	
PECVD	Plasma Enhanced Chemical Vapour Deposition /

	Deposición Química en fase Vapor Mejorada por Plasma
PIN	p-n photodiode /
	Fotodiodo de unión p-n
pKa	Decimal logarithm of the acidity constant /
	Logaritmo decimal de la constante de acidez
pKa <sub>MEM</sub>	Decimal logarithm of the apparent acidity constant /
	Logaritmo decimal de la constante de acidez aparente
PMMA	Polymethylmethacrylate /
	Polimetacrilato de metilo
PTFE	Polytetrafluoroethylene /
	Politetrafluoroetileno
PVC	Polyvinylchloride /
	Cloruro de polivinilo
PVP	Polyvinylpyrrolidone / Polivinilpirrolidona
$\phi$	Quantum yield /
	Rendimiento cuántico
	(nº de moléculas que emiten/nº de moléculas excitadas)
QP	Chemically Pure /
	Químicamente Puro
R	Reflectance / Reflectancia
RIE	Reactive Ion Etching /
	Gravado Iónico Reactivo
RSD	Relative Standard Deviation /
	Desviación Estándar Relativa
T	Transmittance / Transmitancia
TIR	Total Internal Reflection /
	Reflexión Interna Total
R	Correlation coefficient of the minimum square linear fitting /
	Coefficiente de correlación del ajuste lineal por mínimos cuadrados
$r$	Molar ratio / Relación molar
S	Dispersion coefficient /
	Coefficiente de dispersión
SOI	Integrated Optical Sensors /
	Sensores Ópticos Integrados
SPR	Surface Plasmon Resonance /
	Resonancia de Plasmones Superficiales
$\tau$	Life-time / Tiempo de vida
$t_{1/2}$	Half life-time /
	Tiempo de vida media
$t_{90\%}$	90% response time /
	Tiempo en llegar al 90% de la respuesta (min)
TEi	Electric mode / Modo eléctrico
TEOS	Tetraethoxysilane / Tetraetoxisilano
Tg	Glass temperature /
	Temperatura de transición vítrea
$t_{gel}$	Gelling time /
	Tiempo de formación del gel
THF	Tetrahydrofuran / Tetrahidrofurano
TMi	Magnetic mode /
	Modo magnético
TMOS	Tetramethoxysilane / Tetrametoxisilano

TOPh	Tris-(2-ethylhexyl)phosphate / Fosfato de tris-(2-etilhexilo)
tr	Response time / Tiempo de respuesta (min)
UA ó u.a.	Absorbance Unites / Unidades de Absorbancia
UV	Ultraviolet / Ultravioleta
Vis	Visible / Visible

## SUMMARY

## SUMMARY

Interest in optical sensor development has been growing quickly in the recent years. This fact is related to the potential advantages of joining optical transduction, which gathers an ample basis on the analytical knowledge of absorbance or fluorescence techniques, with the technological improvements attained by the telecommunication industry in the field of optical information transmission. For this reason, new research in this field is aimed at the development of light guided optical sensors using cylindrical (optical fibers, capillary) and planar waveguides. The later present advantages such as feasible miniaturization, easy membrane deposition, and a compatible design with the IC microelectronic technology.

Despite the fact that direct absorbance/transmittance measurements are useful due to their broad applicability and versatility toward a large number of analytes, most of the described miniaturized devices have been based on phenomena of poor specificity in the response and that present instabilities due to temperature or pressure variations. These are the surface plasmon resonance or the interferometry. More specific optical sensors are those based on evanescent wave spectroscopy but they require long interaction distances or a great amount of the field out of the waveguide, which in turn makes the response very dependent on variations of the real part of the refractive index. Most of the developed conventional optical sensors are based on traditional transduction phenomena as fluorescence or absorbance, in which the selective response is accomplished by a chromoionophore that interacts with a species of interest to undergo a change in its optical properties. However, new research is needed to overcome some significant limitations concerning optochemical sensing in order to reach a practical application level. First, optical transmission signals may be affected by light scattering or matrix absorption if light crosses the sample solution. On the other hand, optical sensors usually show long response times to reach the equilibrium as a result of the intrinsic slow kinetics of mass transfer through the bulk of the membrane, which is unfortunately worsened when thicker membranes are used to improve sensitivity. In addition, most of the reagents suffer from photobleaching or leaching. To solve these problems, especially those related to sensitivity limitations, complex and expensive measurement setups have been used to increase the signal/noise ratio.

The present work pretends to address some of the mentioned weak points. Besides increasing the dye concentration in the membrane, which is limited by its solubility in the plasticizer, there are two effective alternatives to improve sensitivity: on the one hand, increasing the optical path length and on the other hand, changing the optically active reagent to another one with higher molar absorptivity. With that in mind, we first designed and built a new integrated waveguide absorbance optode (IWAO) for chemical sensing based on radiation transmission through the core of a waveguide. The device consisted of a microfabricated planar waveguide circuit, based on antiresonant reflecting optical waveguide structures (ARROW), and on a chemically active membrane, of a suitable thickness, deposited in a defined region of the former and yielding one part of the light guiding planar structure. Concerning the transduction mechanism, it is established by absorbance/transmittance phenomena of the recognition optode membrane as it interacts with a given concentration of the analyte in the sample.

The novel sensor was conceived to optimize four essential characteristics that define a high-quality optochemical sensor: *enhanced and sizable sensitivity* (depending on the free propagation region length), an *adequate selectivity* toward a certain analyte (regulated by an ionophore), *low response time*, and *minimization of interference effects* caused by the solution matrix. To attain these goals, we proposed a basic structure composed of a single-mode integrated optic waveguide (as the input waveguide), a bulk optode (as the recognition region), and a wider multimode waveguide (as the collection waveguide) in a continuous arrangement.

The main improvement achieved was that ARROW structures allow light to travel in the transversal direction to the mass transfer, rendering the response time independent from the light path length. Therefore, it is possible to increase the sensitivity without enlarging simultaneously the time needed to achieve the steady-state signal. This effect can be understood considering that, in the IWAO, the membrane thickness do not spatially define the light path length as it is only limited by the length of the free propagation region. Moreover, light has no interaction with the sample solution, and interference due to the sample matrix (absorbance or turbidity) is avoided.

To demonstrate the possibilities offered by the use of this novel sensor, we constructed a microfabricated absorbance-sensing device selective to potassium ion, activated with a well-known potassium bulk optode. Optical membranes were characterized initially with a conventional absorbance/transmittance flow cell in a continuous-flow system to perform a comparative study of the analytical response. All the parameters determining the membrane response were optimized in order to guarantee the same operational conditions, using the conventional technique as well as the IWAO. The absorbance change achieved with the conventional configuration was multiplied using the sensor almost for every step change, while the response times for both devices were comparable. In the IWAO sensitivity depends on the optical path length while the response time depends on the membrane thickness. The optical path length was fixed during the fabrication process according to the predicted sensitivity. There is a maximum allowed length, which basically depends on the optical properties of the polymer and on the width of the collection waveguide. As a result of the excellent elicited results, the developed IWAO became a very promising device, with large applicability that adapted existing absorbance schemes to the design and construction of novel specific optochemical sensors.

The next stage of the work was focused on the study and characterization of new chromoionophores as an alternative way of increasing sensitivity, and the study of different matrices for membrane construction, compatible with the silicon surface of transducer. For this purpose, some heptametincyanine dyes, synthesized in the Sensors & Biosensors Group (GSB) to present high molar absorptivities and absorbance maxima in the NIR region, where simple and cheap commercially available emitting sources and detectors can be found, were dissolved in polymeric membranes. Their composition was optimized and their pH response was characterized in a conventional absorbance/transmittance configuration. The obtained membranes were totally homogeneous demonstrating the good solubility of the indicators in the employed organic solvent (DOS). As was expected, a bathochromic shift was observed, which unfortunately moved away the absorbance maxima from the working wavelength of the IWAO light source (LED emitting at 780 nm) and then, it would decreased sensitivity if used as the



recognition element of the new device. On the other hand, pKa values were extremely high to work in optimum conditions and finally all the heptametincyanines presented hysteresis of the calibration curves. Furthermore response times were too long, in the order of 20 minutes, due to the acid/base equilibrium, which involved the diffusion of hydroxyl ions within the membrane. To sum up, the general characteristics of the heptametincyanine dyes revealed their difficult employment as pH indicators in PVC membranes to develop IWAOs.

The second attempt consisted of immobilizing the new chromoionophores in other materials as a sol-gel matrix. The sol-gel technology is well known for its versatility and to be a simple method to manipulate the structure, texture, shape and composition of an optical membrane. However, it requires a strict control of the reaction parameters to obtain a certain material. Therefore, first of all, a pre-study of the sol-gel technology was performed with a commercial indicator, known to be stable in such a matrix. After that, some heptametincyanine dyes were immobilized in sol-gel matrices and were characterized in a conventional absorbance/transmittance configuration. Despite it was not possible to take a broad view concerning the performance of the heptametincyanine dye class in a sol-gel matrix, it was possible to evaluate the effect of some parameters as the precursors employed, the catalyst, the sol pH, the molar ratio between the precursors, the alcohol and water, and the reaction time in the final physical and chemical characteristics of the membranes. The best conditions assayed with one of the indicators demonstrated the possibility to obtain enough stable membranes to use in the new developed planar devices if 4  $\mu\text{m}$ -thickness layers were possible to deposit without cracking. Consequently, two different deposition techniques (the dip-coat technique and the spin-on technique) were assayed. None of them gave satisfactory results with the employed sol-gel compositions, and in the experimental conditions, where the reactions, the ageing time and the drying time took place. All the prepared membranes thicker than one micron cracked. Although it would be possible to minimize membrane swelling during the ageing and drying stages, using other solvents as well as adding stabilizers, to prevent capillary stress, it would all become a tedious and long procedure, inappropriate to develop an easy methodology for activating the waveguide circuit of the new integrated sensor.

Starting from the unfeasibility of depositing 4  $\mu\text{m}$  sol-gel membranes, we proceed evaluating the optical and analytical characteristics of a series of novel neutral pH indicators, a class of ketocyanine dyes in PVC membranes. As the previous heptametincyanine dyes, they were synthesized to fulfill some relevant characteristics, as good solubility in the common plasticizers used in polymeric membranes, high molar absorptivity and absorption bands near the 780 nm-wavelength of the working LED. For each indicator, an optimum membrane composition was studied and characterized in a conventional absorbance/transmittance configuration. Ketocyanine dyes appear to be completely soluble in the organic solvent used as the plasticizer (TOPH), and no aggregation was observed during any of the experiments. The absorbance maxima of ketocyanine dyes in ethanol were slightly red-shifted (longer wavelength) in this less polar solvent, approaching the working wavelength of the IWAO optical system.

Membranes showed good performance during calibrations in the pH range 3-8.5. The permanency of a well-defined isosbestic point in the spectra of the

immobilized indicators demonstrated that there was only one equilibrium involving two species. Basicities were calculated from the equilibrium constant,  $K_{aMEM}$ , of each ketocyanine in the membrane. They were determined by fitting the experimental calibration curve to the general theoretical equation of a pH bulk optode. It was noted the large basicity increment for the immobilized indicators. The pKa value increased in at least 3 pH units, which will allow working near the neutral pH when using them in ion-selective bulk optodes, and consequently, it could support widening the future application fields of the developed membranes. Concerning their stability, photostability was studied in dry and humid conditions under the exposure of different light sources. None of the ketocyanine dyes suffered decomposition in the acid form, but all of them slowly decomposed at their basic form. This study demonstrated that they were stable enough when calibrated in the usual laboratory conditions, and because the stability of the acid form was proved to be excellent, membranes were always acid-conditioned when stored. Recording the absorbance maximum of the acid or the basic form every few minutes while the membrane was continuously in contact with the buffer solution performed a leaching study. It was possible to conclude that the tested dyes did not leach to the solution.

Finally, analytical response characteristics as sensitivity, response time and reproducibility were checked. All of prepared membranes gave the typical sigmoid curve, with the exception of the ones than included the more basic dyes, which did not reach the signal saturation. Linear ranges covered two pH magnitude orders, and responses were fully reversible with a good reproducibility. Moreover, there was no presence of hysteresis of the indicators during all pH cycles. In conclusion, all of the prepared and tested membranes can be considered very sensitive, fast, and reversible optical transducers, suitable for pH determinations.

The next proposal of the work was exploiting the features of the developed membranes by using them as recognition reagents in integrated waveguide absorbance optodes (IWAOs) and then, to provide miniaturized sensors with an enhanced performance. Membranes of the same composition as in the conventional configuration were deposited onto the free propagation region of the devices to work out a comparative study, and again, it was possible to observe that the great advantage offered by the IWAO was the possibility of attaining high sensitivity without increasing the dye ratio or the membrane thickness.

The final goal was to present a versatile platform for optical sensing, which offered improved response characteristics on conventional bulk optodes as higher sensitivity with low response times, due to its unique configuration and the use of very sensitive ketocyanine dyes. Moreover we pretended to improve some technological characteristics such as portability, easy activation or removal of the membrane, low-cost construction, and the possibility to perform continuous monitoring as well as *in situ* measurements. To validate the new design we proposed a FIA system for the determination of cadmium in water using an improved integrated cadmium-selective waveguide absorbance optode. With the intention of improving robustness and simplifying sensor integration as a detector in flow systems or sensor employment for *in situ* measurements, we constructed a new exchangeable transducer, which could be easily and reversibly coupled to optical fibers in a way that waveguide activation (deposition of the membrane) could be performed using reproducible deposition techniques (such as the spin-coat technique) or that the sensor could be regenerated using disposable

transducers, when the response characteristics of the membrane were quenched. For this reason, both input and output waveguides had to be constructed at the same side of the device, and hence, one had to reverse direction. The fabrication process of the new transducer consisted of the same complementary metal oxide semiconductor (CMOS) compatible processes over a silicon wafer, employed for the construction of the previous integrated rectilinear planar ARROW sensors but some changes related to the masks, which define the curves and the connection platform, were done. Other relevant changes to simplify sensor construction concerned the waveguide width. We decided to construct wider input waveguides to have more tolerance in the fiber-waveguide alignment. This fact allowed using standard multimode fibers as well.

The composition of a cadmium-selective membrane was optimized using one of the ketocyanine dyes characterized as a pH indicator in a PVC-polymeric membrane, in combination with a commercial cadmium ionophore. We performed a screen-printing like deposition technique to activate the planar sensor platform with this bulk optode. The sensor integration as a detector in a flow injection system (FIA) was proposed to obtain an automated, simple, and sufficiently reproducible analytical methodology with a high sample throughput. Initially, the FIA system was optimized to reproducibly attain the highest sensitivity in the shorter time. Since ion-selective optodes based on ion exchange, mediated by an ionophore and an indicator, sense the ratio of the analyte and hydrogen ions in the sample solution, the pH had to be kept constant. The FIA technique easily allows adding a conditioning channel that buffers the inserted sample before the detection. The composition and pH of the conditioning solution was studied to elicit the best detection limit, the highest sensitivity, as well as a convenient linear range. While the effect of pH over the upper detection limit was notable, the lower detection limit remained almost invariable from a certain pH due to the interference of the background electrolyte of the conditioning solution. However, it would be possible to improve the detection limit, without compromising sensitivity, by lowering the chromoionophore concentration, because besides ketocyanine dyes present very high molar absorptivities, the long path length of the integrated device ensures sensitivity. Another excellent alternative would be changing the chromoionophore basicity, thus using one of the other reported well-behaved ketocyanine dyes. Yet again, it was proved that the advantages of using the integrated devices rely on the sensitivity increase while other analytical characteristics remained the same as using the same bulk optode in a conventional configuration. Once the system was properly optimized, we proceeded to evaluate the cadmium selectivity of the membrane over a range of alkali, alkaline earth, and heavy metals by performing a fixed interference method (FIM). In general, the selectivity over alkali and alkaline-earth metals and transition metals was good with the exception of lead and copper ions. In the case of samples containing lead and cadmium ions, the membrane indistinctly detected both analytes; therefore, the employed ionophore (ETH 5435) was considered selective to both ions in accordance with previously reported papers. Copper ion irreversibly interfered in the response, but the assayed FIA system allowed a sample pretreatment, so a complexing agent can be introduced in the carrier solution to remove copper before the optical detection. Obviously the presented cadmium membrane did not show the best achievable analytical characteristics but served to prove the appropriateness of the tested new ketocyanine dye to be

used as a pH-selective chromoionophore in ion-selective membranes, compared to other indicators using the same ionophore.

The short time repeatability of the analytical signal was evaluated by successive repeated injections of the same solution obtaining a reversible enough signal to a reasonable time-scale. A decreasing trend of the baseline was expected for long time experiments because of the slowly photobleaching of the ketocyanine dye, but it could be reduced, attenuating laser power and preventing direct sunlight exposition of the membranes deposited over the transducer. However, it is important to mention that membrane lifetime is not a limiting cause for the application of these optodes to real measurements, because making use of the improved IWAO, it is possible to easily renew the sensitive region when response characteristics are quenched. The disposable transducer can be changed to another one or can be disconnected from the base holder and then reactivated, depositing another membrane.

In conclusion, the proposed technologically improved IWAO made evident its appropriateness as a versatile platform for the development of ion-selective optical sensors, depending on the membrane composition, which also permitted to obtain disposable transducers. Actually, investigations are focused on improving ion-selective membranes as well as giving ruggedness and portability to the optical system for the future transference of technology and even though, taking profit of the employed technology to develop optical sensors based on other optical phenomena as fluorescence.

## INTRODUCCIÓN

# Capítulo 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 SENSORES QUÍMICOS

Transductor señal primaria-señal secundaria	Señal primaria	Ámbito de aplicación
Óptico-eléctrico	absorbancia reflectancia luminiscencia índice de refracción efecto opto-térmico dispersión de luz	pH, iones, gases, moléculas, metales pesados
Electroquímico-eléctrico	potencial intensidad	pH, iones, gases, moléculas, metales pesados
Eléctrico-eléctrico	conductividad capacitancia permitividad eléctrica	iones
Másico-eléctrico	masa	gases y líquidos volátiles
Magnético-eléctrico	efecto paramagnético	moléculas
Termométrico-eléctrico	calor	reacciones bioquímicas

### 1.2 SENSORES OPTOQUÍMICOS

#### 1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES OPTOQUÍMICOS

##### 1.2.1.1 Según la interacción luz-materia

*Sensores de absorbancia*

*Sensores de reflectancia*

*Sensores de luminiscencia*

*Sensores de dispersión Raman*

*Sensores de onda evanescente*

*Sensores TIR*

*Interferómetros*

*Elipsómetros*

*Sensores de Resonancia de Plasmones Superficiales (SPR)*

##### 1.2.1.2 En función de la fase reactiva

*Sensores basados en fenómenos de superficie (surface optodes)*

*Optodos de matriz tridimensional (bulk optodes)*

##### 1.2.1.3 En función de la configuración

*Sensores ópticos con radiación no confinada*

*Sensores ópticos con radiación confinada o de onda guiada*

#### 1.2.2 MECANISMOS DE INTERROGACIÓN Y COMPONENTES BÁSICOS

##### 1.2.2.1 Fuentes de luz

*Lámparas*

*LEDs (diodos de emisión de luz o light-emitting diodes)*

*Láseres*

##### 1.2.2.2 Fotodetectores

**Fotoemisores****Detectores de estado sólido****1.2.2.3 Estructuras de guiado****Propagación de luz en guías de onda****Configuraciones de guías de onda****Fibras ópticas****Capilares****Guías de onda planas**

Figura 1. 12: Esquema estructura rib

**Ventajas y limitaciones de los sensores ópticos****Aplicaciones de los sensores ópticos basados en guías de onda**

Características como la robustez y la alta capacidad de transmisión de información a largas distancias que ofrecen las fibras ópticas, permiten su utilización en sitios inaccesibles a la instrumentación convencional, ya que el sistema óptico de medida puede estar ubicado en un entorno controlado de laboratorio, mientras que la fase sensora está en contacto con la muestra. Podemos distinguir entre las aplicaciones en las que se han utilizado sensores ópticos que no requieren de fases reactivas y los que se basan en fases indicadoras [80]. Los primeros tienen aplicación en todas aquellas situaciones en las que se pueden utilizar los análisis ópticos clásicos y las fibras ópticas se utilizan como sensores tipo sonda para medidas de parámetros físicos. Este es el caso de la adquisición remota de información en áreas radioactivas, sistemas de fermentación, áreas de alto voltaje y bioreactores. Por otro lado, los sistemas basados en la señal producida por fases indicadoras al interaccionar con un analito ofrecen un campo de aplicación más amplio, y son de utilidad en todas las ciencias analíticas. Sus áreas típicas de aplicación son en control de procesos, el análisis de niveles de polución, en biotecnología, en defensa, en el análisis de aguas marinas, en química clínica y en técnicas biomédicas invasivas.

**Monitorización medioambiental, control de procesos, análisis de gases****1.3 LA FASE REACTIVA****1.3.1 REACTIVOS E INDICADORES****1.3.2 MATRICES Y SOPORTES**

	<b>Material</b>	<b>Función del soporte</b>	<b>Características</b>
polímeros orgánicos	agarosa (celulosa)	membrana	biodegradable
	PVP (hidrogel)	membrana	biodegradable
	nylon (poliamida sintética)	membrana	flexible
	PVC plastificado	membrana	bajo coste y fácil de usar

	Nafion <sup>TM</sup> (polifluorocarbono)	membrana	resistente químicamente, intercambiador iónico
polímeros inorgánicos	SX-PC (siliconas)	membrana	permeabilidad
vidrios	vidrios porosos silicio	fibras, perlas fibras, guías de onda	transparencia transparencia
	sol-gel (red de óxidos metálicos)	guías de onda, membrana	bajo coste, transparencia, rigidez

### 1.3.2.1 Matrices poliméricas y membranas selectivas de iones

#### *Composición de las membranas ópticas selectivas de iones*

<b>Polímero</b>		
<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>FUNCIÓN</b>
polímero (PVC)	⇒ alto peso molecular ⇒ lipofílico	⇒ estructura rígida ⇒ soporte físico
plastificante (DOS, TOPH)	⇒ líquido ⇒ lipofílico	⇒ disminuye T <sub>g</sub> del polímero ⇒ alta difusión de los otros componentes
ionóforo	⇒ portador iónico neutro o cargado ⇒ lipofílico	⇒ forma complejos con iones
indicador de pH	⇒ sensible a pH ⇒ lipofílico	⇒ intercambia protones ⇒ transductor químico-óptico
aditivo iónico	⇒ lipofílico ⇒ aumenta la transferencia iónica	⇒ mejora la extracción del analito

#### **Plastificante**

La elección del plastificante influye en las características de respuesta de la membrana. La selectividad está afectada por la polaridad del plastificante. Cualitativamente, existe una preferencia hacia iones divalentes respecto a monovalentes en solventes más polares. Además, el rango de trabajo también depende del tipo de solvente utilizado, aunque no hay una correlación directa entre la polaridad y el límite de detección. El plastificante también puede favorecer la formación de pares iónicos entre los iones que han formado complejos y el aditivo iónico lipofílico, que pueden deteriorar la selectividad de la membrana. La disminución de la concentración de iones libres en la membrana, tiene un efecto similar a incrementar la constante de formación del complejo ión-ionóforo e ión-cromoionóforo [137]. Generalmente, los plastificantes utilizados para el desarrollo de



sensores ópticos son los mismos que los utilizados en los ISEs [139].

**Ionóforo**

**Cromoionóforo**

**Aditivos iónicos**

***Mecanismos de respuesta de las membranas ópticas selectivas de iones***

**Mecanismo de intercambio catiónico**

**Mecanismo de coextracción**

### **1.3.2.2 Matrices sol-gel**

***Ventajas e inconvenientes de los materiales sol-gel para el desarrollo de membranas ópticas***

***Mecanismos de reacción***

***Etapas del proceso***

**Hidrólisis y condensación**

**Formación del gel**

**Envejecimiento**

**Secado**

## **1.4 BIBLIOGRAFÍA**

### **OBJETIVOS**

La presente tesis se enmarca en un proyecto multidisciplinar realizado en conjunción con el Centro Nacional de Microelectrónica de Barcelona y el Departamento de Física Aplicada de la Universidad de Zaragoza, en el que se pretende desarrollar una nueva generación de sensores ópticos que no presenten las limitaciones de los dispositivos optoquímicos construidos hasta el momento. El trabajo conjunto, realizado bajo el impulso del Grup de Sensors i Biosensors, tiene como objetivo común la obtención de sensores robustos y versátiles, de pequeño tamaño y de fácil acoplamiento a fibras ópticas, mediante una metodología de fabricación automatizable y masiva a bajo coste. Desde un punto de vista operacional, se pretende también que los sensores sean de uso sencillo, de respuesta reproducible y que proporcionen una alta sensibilidad y selectividad. Así pues, y para llegar a este objetivo global, en la realización de la tesis se han establecido los siguientes propósitos:

1.- Diseño, estudio y optimización de un nuevo concepto de configuración óptica que permita la obtención de un dispositivo integrado basado en guías de onda planas, como plataforma general de transducción de sensores optoquímicos, basados en medidas de absorbancia.

2.- Caracterización, evaluación y validación de la respuesta del sensor desarrollado mediante una membrana modelo, previamente evaluada por la técnica espectroscópica convencional.

3.- Estudio y optimización de las características de respuesta de diversas membranas ópticas de diferente composición para el reconocimiento selectivo de  $H^+$ , basándose en variaciones de las propiedades espectroscópicas de cromioionóforos sensibles en la zona NIR. Los reactivos utilizados (indicadores ácido/base), de alta sensibilidad, se sintetizan en el Grup de Sensors i Biosensors de la Universidad Autònoma de Barcelona para trabajar a longitudes de onda

cercanas a fuentes de luz monocromática y de bajo coste, como LEDs y láseres de diodo.

3.a.- Obtención de membranas ópticas basadas en la inmovilización de cromoionóforos en materiales sol-gel y su caracterización espectroscópica.

3.b.- Obtención de membranas ópticas basadas en la disolución de cromoionóforos en membranas poliméricas (PVC) plastificadas y su caracterización espectroscópica.

4.- Caracterización y evaluación de las membranas ópticas desarrolladas como elementos de reconocimiento selectivo en sensores ópticos integrados y validación de las propiedades que ofrece la nueva configuración plana.

5.- Construcción de una plataforma versátil para el desarrollo de dispositivos sensores basados en óptica integrada para la determinación selectiva de iones en aguas mediante una metodología analítica simple, automática y reproducible.

5.a.- Obtención de una membrana óptica selectiva de cadmio, de composición basada en la combinación de los indicadores de pH previamente caracterizados con un ionóforo selectivo de cadmio y su caracterización espectroscópica.

5.b.- Optimización de un sistema de automatizado de flujo continuo para el análisis de cadmio en aguas, mediante un sensor integrado de absorbancia basado en guías de onda planas que incorpora la membrana selectiva de cadmio, previamente optimizada.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

## **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS xii**

## **SUMMARY 1**

## **INTRODUCCIÓN 9**

### **1.1 SENSORES QUÍMICOS 11**

### **1.2 SENSORES OPTOQUÍMICOS 13**

#### 1.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS SENSORES

OPTOQUÍMICOS.....13

##### 1.2.1.1 Según la interacción luz-

materia..... 13

##### 1.2.1.2 En función de la fase

reactiva..... 19

##### 1.2.1.3 En función de la

configuración..... 20

#### 1.2.2 MECANISMOS DE INTERROGACIÓN Y COMPONENTES

BÁSICOS..... 23

##### 1.2.2.1 Fuentes de

luz..... 25

##### 1.2.2.2

Fotodetectores.....

.... 26

##### 1.2.2.3 Estructuras de

guiado..... 28

### **1.3 LA FASE REACTIVA 37**

#### 1.3.1 REATIVOS E

INDICADORES..... 38

#### 1.3.2 MATRICES Y

SOPORTES.....40

##### 1.3.2.1 Matrices poliméricas y membranas selectivas de

iones..... 41

##### 1.3.2.2 Matrices sol-

gel..... 51

### **1.4 BIBLIOGRAFÍA 61**

## **OBJETIVOS 69**

## **DISCUSIÓN GLOBAL DE RESULTADOS73**

### **2.1 DISEÑO CONCEPTUAL Y TECNOLÓGICO DE UN SENSOR ÓPTICO INTEGRADO E**

### **INSTRUMENTACIÓN IMPLICADA 78**

#### 2.1.1 DISEÑO DEL

TRANSDUCTOR.....

78

#### 2.1.2 CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DEL NUEVO

DISEÑO..... 81

##### 2.1.2.1 Ventajas

tecnológicas.....

81

##### 2.1.2.2 Sensibilidad y tiempo de

respuesta..... 83

#### 2.1.3 REALIZACIÓN TECNOLÓGICA DEL

TRANSDUCTOR..... 86

2.1.3.1 Fabricación de las guías rib ARROW.....	86
2.1.3.2 Obtención de la guía cortada.....	90
2.1.3.3 Pulido de las muestras.....	90
2.1.3.4 Acoplamiento de las guías y las fibras.....	91
2.1.4 INSTRUMENTACIÓN.....	93

## **2.2 CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SENSOR: PARÁMETROS DE CALIDAD 96**

2.2.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA MEMBRANA SELECTIVA DE IÓN POTASIO.....	96
2.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR DESARROLLADO.....	100
2.2.2.1 Optimización del grosor de la membrana: señal y pérdidas.....	101
2.2.2.2 Evaluación de las características de respuesta de la membrana selectiva de ión potasio usando el nuevo dispositivo integrado.....	103

## **2.3 CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS DE RECONOCIMIENTO IÓNICO EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS Y SOL-GEL 107**

2.3.1 COMPUESTOS CIANÍNICOS COMO INDICADORES DE PH.....	108
2.3.1.1 Comportamiento ácido/base de los colorantes heptametincianínicos.....	112
2.3.1.2 Comportamiento ácido/base de los colorantes cetocianínicos.....	113
2.3.2 CARACTERIZACIÓN DE HEPTAMETINCIANINAS EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS Y SOL-GEL.....	113
2.3.2.1 Caracterización de heptametincianinas en matrices poliméricas.....	114
2.3.2.2 Caracterización de heptametincianinas en matrices sol- gel.....	116
2.3.2.3 Metodologías de deposición de membranas sol- gel.....	119
2.3.3 CARACTERIZACIÓN DE CETOCIANINAS EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS.....	120
2.3.3.1 Características espectroscópicas de las cetocianinas en membranas poliméricas.....	121
2.3.3.2 Estabilidad.....	123
2.3.3.3 Características de respuesta analítica.....	125
2.3.4 RESULTADOS DE LAS MEMBRANAS DESARROLLADAS EN LA NUEVA CONFIGURACIÓN SENSORIA.....	127

## **2.4 DESARROLLO DE UN SENSOR SELECTIVO DE IONES PARA SU APLICACIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE 130**

2.4.1 NUEVA CONFIGURACIÓN DE GUÍAS DE ONDA CURVAS.....	130
2.4.1.1 Cambios en el proceso de fabricación para la obtención de guías curvas.....	132
2.4.2 DESARROLLO DE UNA MEMBRANA ÓPTICA SELECTIVA DE CADMIO.....	135
2.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SENSOR DE CADMIO DESARROLLADO.....	136
2.4.3.1 Optimización de un sistema FIA para el análisis de cadmio en agua.....	136
2.4.3.2 Parámetros de calidad.....	137

## **2.5 SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO 139**

## **2.6 BIBLIOGRAFÍA 143**

### **CONCLUSIONES GENERALES 147**

#### **ANEXO I 153**

**Integrated Waveguide Absorbance Optode for Chemical Sensing.** Mar Puyol, Manel del Valle, Ignacio Garcés, Francisco Villuendas, Carlos Domínguez, Julián Alonso. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 5037-5044

#### **ANEXO II 163**

**Inmovilización de heptametincianinas en matrices de PVC y sol-gel para su uso en optodos integrados de guías de onda basados en medidas de absorbancia**

#### **ANEXO III 173**

**Ketocyanine Dyes: H<sup>+</sup>-Selective Ionophores for Use in Integrated Waveguides Absorbance Optodes.** Mar Puyol, Serguei Miltsov, Iñigo Salinas, Julián Alonso. *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 570-576

#### **ANEXO IV 183**

**Improved Integrated Waveguide Absorbance Optodes for Ion-Selective Sensing.** Mar Puyol, Iñigo Salinas, Ignacio Garcés, Francisco Villuendas, Andreu Llobera, Carlos Domínguez, Julián Alonso. *Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 3354-3361

#### **ANEXO V 193**

### **PROGRAMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS**

## **DISCUSIÓN GLOBAL DE RESULTADOS**

---

## Capítulo 2

### DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

La investigación en el área de los sensores ópticos ha experimentado un gran progreso en la última década. No obstante, para conseguir un nivel de desarrollo que haga comercialmente viable el uso de sensores ópticos, es necesario obtener dispositivos fiables, robustos, de dimensiones y precio aceptables, y de fácil manipulación. Estas características determinan el grado de aplicabilidad de los sensores para el ámbito industrial, medioambiental o el biomédico.

Una adecuada explotación de las posibilidades que ofrecen las técnicas espectroscópicas convencionales en el diseño de sensores ópticos pasa por aprovechar los desarrollos tecnológicos realizados por la industria de las telecomunicaciones para la transmisión de información por vía óptica. Como más significativos podríamos destacar las estructuras de confinamiento y guiado de luz, utilizando guías de onda tanto cilíndricas como planas, y los componentes ópticos activos (emisores y detectores) miniaturizados para la zona del espectro NIR. El uso de guías de onda de configuración plana permite construir dispositivos mediante las tecnologías microelectrónicas de fabricación de circuitos integrados. De esta forma, pueden desarrollarse dispositivos miniaturizados siguiendo procesos estandarizados de fabricación, que incluyen la deposición de las capas de reconocimiento, lo que hace viable su fabricación masiva y de bajo coste.

La mayoría de sensores ópticos miniaturizados basados en guías de onda descritos hasta el momento se basan en fenómenos ópticos que miden el índice de refracción [1-3] o la reflexión interna total como la resonancia de plasmones superficiales (SPR) [4-7], o la interferometría [8-9]. Estos dispositivos no se emplean habitualmente en química analítica porque son poco específicos e inestables a variaciones de temperatura o presión. Otras aproximaciones más específicas que utilizan fibras ópticas son los sensores basados en fenómenos ópticos como la absorbancia [3], la fluorescencia [11-13] y la reflectancia [14-16]. Los dispositivos fabricados hasta el momento son discretos y no permiten aprovechar las ventajas de fabricación y miniaturización que ofrecen las tecnologías microelectrónicas. En la **Figura 2. 1** se muestran esquemáticamente los distintos dispositivos instrumentales basados en medidas de absorción que podemos encontrar y sus principales características.

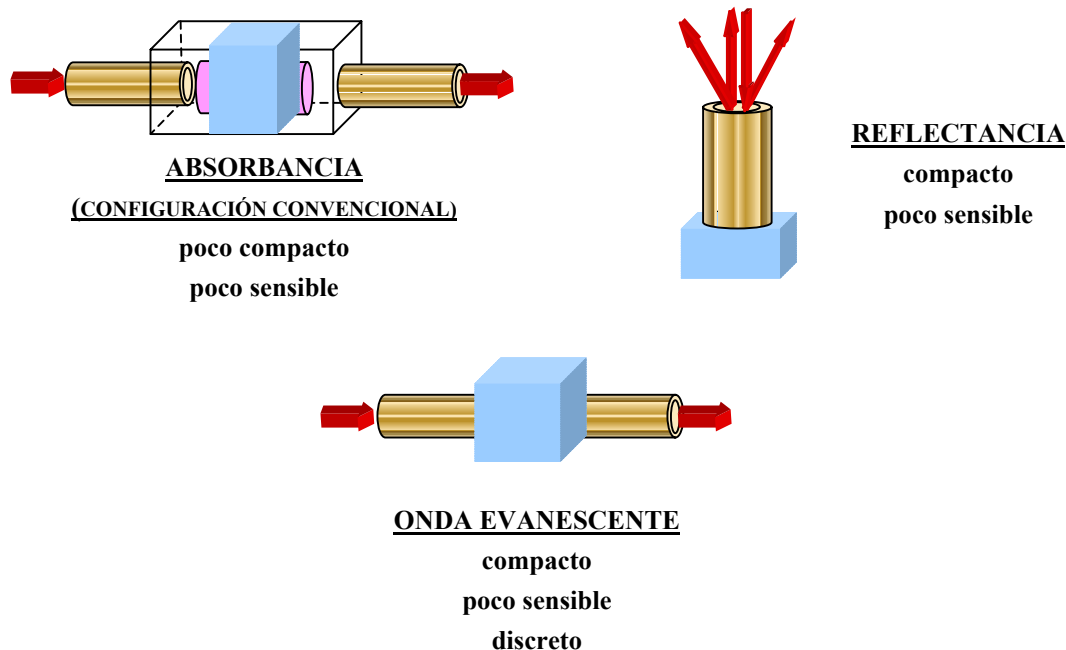
A pesar de que los métodos espectroscópicos basados en la absorbancia/transmisión de radiación son muy utilizados en los laboratorios de análisis, su traslado al diseño de sensores



ópticos presenta algunas limitaciones. En primer lugar, si la radiación atraviesa la disolución de muestra, ésta puede sufrir dispersión o absorción debido a efectos de la matriz. En segundo lugar, la transmitancia/absorbancia es un fenómeno óptico cuyo escalado a nivel micro plantea problemas de sensibilidad al reducirse el camino óptico efectivo de los dispositivos. El uso de membranas gruesas para evitar este último problema compromete el tiempo de respuesta, debido a la lenta cinética de transferencia de masa entre la disolución que contiene el analito y la matriz sensora. Una alternativa a éstos es el uso de fenómenos de fluorescencia ya que la relación señal/ruido es mayor y permite aumentar la selectividad de la respuesta al poder discriminar entre dos longitudes de onda ( $\lambda_{\text{absorción}}$  y  $\lambda_{\text{emisión}}$ ). No obstante, la señal es pequeña y precisa de detectores de alto coste como los fotomultiplicadores, que además requieren de fuentes de alto voltaje.

En tercer lugar, se utilizan componentes ópticos discretos, diseñados para su uso en los métodos espectrofotométricos convencionales, de difícil miniaturización y elevado coste.

De la descripción realizada podemos concluir que restan por resolver básicamente dos problemas: el escalado de los sensores y el traslado a la zona NIR de toda la metodología analítica desarrollada para la realización de medidas de absorbancia/transmisión en el UV-Vis. Esto nos permitiría aprovechar las ventajas instrumentales derivadas del uso de los emisores y detectores de telecomunicaciones.



**Figura 2. 1:** Comparación de los dispositivos instrumentales existentes basados en medidas de absorción de radiación.

La configuración más sensible para el desarrollo de sensores ópticos de onda guiada basados en medidas de absorbancia es aquella en la que el fenómeno óptico, generador de la señal analítica, se ubica en el núcleo de la guía de onda. No obstante, la investigación realizada ha dado pocos pasos en esta dirección. La mayoría de los sensores ópticos integrados de absorbancia descritos

presentan una enorme complejidad instrumental [17-18] o una marcada falta de sensibilidad, ya que se basan en la interacción a través del campo evanescente. En este caso, la región sensora se localiza en el revestimiento de la guía [19-20]. Para incrementar su reducida sensibilidad se requieren largas distancias de interacción, por lo que suelen ser dispositivos dependientes de la parte real del índice de refracción.

El presente trabajo pretende como objetivo final construir una plataforma de aplicación general en el desarrollo de sensores ópticos integrados basados en guías de onda planas selectivos de diferentes analitos, robustos y de fabricación masiva. Esta plataforma debe aprovechar la ventaja derivada de realizar medidas directas de absorbancia en el núcleo de la guía para incrementar drásticamente la sensibilidad.

Siguiendo el esquema de objetivos se estableció un plan de trabajo que puede desdoblarse en cuatro apartados. El apartado 2.1 describe el diseño conceptual de los componentes del transductor, su construcción y el acoplamiento de las fibras ópticas, basándose en la experiencia previa obtenida en la fabricación y caracterización óptica de guías de onda planas (rib ARROW) [14]. A continuación, en el apartado 2.2 se presenta su validación, a partir de su estudio comparativo con sistemas de configuración convencional utilizando membranas de idéntica composición. Este trabajo dio lugar a la publicación presentada en el Anexo I.

Posteriormente, se formuló, optimizó y caracterizó la respuesta de diversas membranas ópticamente selectivas que incorporaban nuevos cromóforos de  $H^+$ . Estos compuestos fueron diseñados y sintetizados en el Grup de Sensors i Biosensors. Las premisas básicas del diseño planteaban la necesidad de que presentaran bandas de absorción en la zona del espectro NIR; que permitieran obtener una mejora substancial de la sensibilidad; y que hicieran viable la utilización de los componentes ópticos activos de bajo coste, desarrollados por la industria de las telecomunicaciones, para la zona NIR. El trabajo realizado se resume en el apartado 2.3 y se divide en la caracterización de dos clases de indicadores de pH diferentes (heptametincianinas y cetocianinas) en matrices sol-gel y de PVC. Debido a que los resultados obtenidos en matrices sol-gel no fueron satisfactorios, se rechazó su uso final en los sensores integrados basados en guías de onda. Éstos se presentan en formato de publicación en el Anexo II. En cambio, los excelentes resultados obtenidos con las cetocianinas en membranas poliméricas dieron lugar a una segunda publicación, presentada en el Anexo III.

Finalmente, en el apartado 2.4 se presentan los cambios realizados en el diseño inicial del sensor óptico integrado, para mejorar tecnológicamente el primer prototipo desarrollado. Estas modificaciones permiten obtener sensores más robustos, simplifican su integración como detectores en sistemas de flujo y permiten obtener sensores desechables de bajo coste, ya que admiten un acoplamiento reversible de las fibras ópticas y el transductor, separando los componentes que generan la señal de los que la transmiten y procesan. En este apartado también se describe el desarrollo de una membrana selectiva de cadmio como membrana modelo, que incorpora una de las cetocianinas previamente caracterizada en el sensor integrado. Los resultados obtenidos permiten demostrar la versatilidad de la plataforma diseñada para la

obtención de dispositivos ópticos selectivos de iones, mediante la introducción de un ionóforo junto a un cromoióforo de una de las familias evaluadas. Este trabajo se presenta en la publicación del Anexo IV.

## 2.1 DISEÑO CONCEPTUAL Y TECNOLÓGICO DE UN SENSOR ÓPTICO INTEGRADO E INSTRUMENTACIÓN IMPLICADA

Con el fin de solucionar los problemas derivados de la falta de sensibilidad o la alta complejidad de los sensores ópticos integrados basados en medidas de absorbancia, a lo largo de la tesis se propone un nuevo concepto de sensor óptico, basado en un dispositivo construido mediante guías de onda planas, integradas en una matriz de silicio. Además, para simplificar su diseño instrumental, el acoplamiento del dispositivo a la fuente de luz y al detector se realiza mediante fibras ópticas.

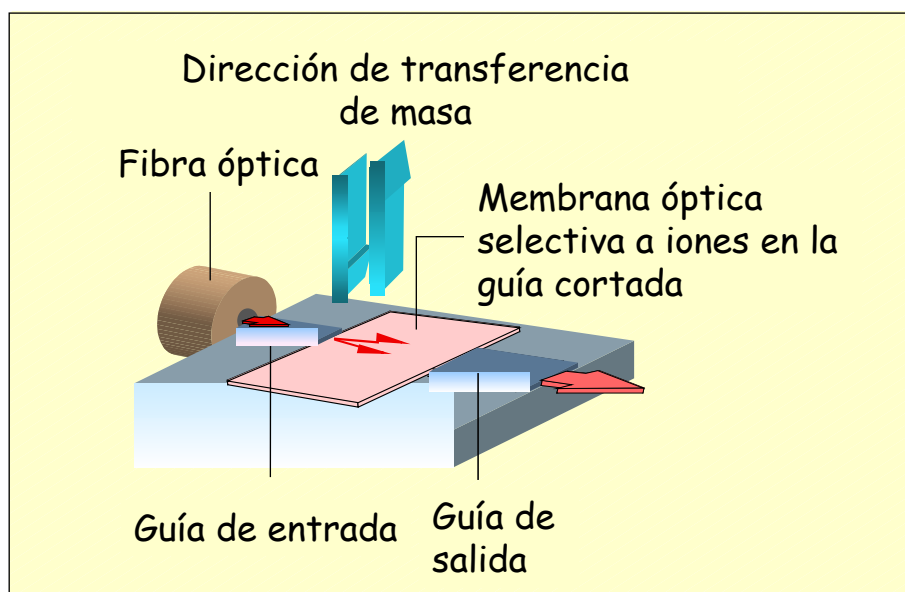
### 2.1.1 DISEÑO DEL TRANSDUCTOR

El nuevo concepto de sensor que se propone tiene como objetivo optimizar cuatro parámetros fundamentales que definen las características operacionales de los sensores optoquímicos: *máxima sensibilidad*, de manera que se produzcan grandes cambios en la señal frente a pequeñas variaciones de concentración de analito; *selectividad* adecuada hacia el analito, modulada por el ionóforo que contiene la membrana; *tiempo de respuesta reducido*, de forma que el diseño no limite la dinámica de la reacción química de reconocimiento, y *minimización de interferencias* debidas a la turbidez o el color *de la matriz* de la muestra.

El diseño planteado para cumplir los requisitos citados consiste en un circuito microfabricado de guías de onda ARROW y en una membrana químicamente activa, de un determinado grosor, depositada en una zona definida del circuito de guías, que actúa simultáneamente como parte de la estructura plana de guiado y como elemento de reconocimiento. El mecanismo de transducción se basa en el fenómeno de absorción, que es modulado por la membrana selectiva al interactuar con el analito presente en la disolución. El esquema se presenta en la **Figura 2.2**. En este, se pueden apreciar tres zonas claramente diferenciadas: una *guía de entrada* o *de inyección* de luz, una *zona de guía cortada* donde se deposita una *membrana óptica selectiva de iones* y una *guía de salida* o *de recogida* de luz. Con esta estructura se pretende conseguir que la luz transmitida por la guía de inyección se propague a través de la membrana, mientras cambia sus propiedades ópticas en función de la concentración de analito en la muestra, y sea recogida por la guía de salida y transmitida hacia el detector.

Tras la experiencia adquirida por el grupo multidisciplinar de trabajo en la fabricación y caracterización de guías, se decidió utilizar una guía rib ARROW [15] como *guía de entrada*. Ésta debería presentar unas dimensiones compatibles con la fibra óptica de excitación y asegurar pérdidas mínimas de luz entre 600-800 nm, aproximadamente. De esta forma se garantiza la transmisión de radiación de las longitudes de onda en las que se pueden encontrar

láseres de diodo comerciales (670 nm o 780 nm), y en las que se detectarán los máximos cambios de absorbancia de los cromoforos utilizados en las membranas selectivas de iones.



**Figura 2. 2:** Esquema general de diseño propuesto, en el que se muestran las guías de inyección y recogida de luz, la membrana sensora y la fibra de entrada. Se destaca como la dirección de difusión de los analitos entre la disolución y la membrana es perpendicular a la dirección de transmisión de luz.

Sobre el núcleo de la guía de entrada se deposita una capa de revestimiento que permite aislar éste del medio externo. El aislamiento es muy importante ya que pequeñas variaciones en el índice de refracción de la disolución en contacto con la guía de entrada podrían modificar las condiciones de inyección de la luz en la membrana y, por tanto, influir en la respuesta del sensor.

Para conseguir unas características ópticas adecuadas del dispositivo, se ha diseñado una guía de entrada en la que los índices de refracción del núcleo ( $n_n$ ), revestimiento del núcleo ( $n_r$ ) y revestimiento del sustrato ( $n_R$ ) siguen el siguiente orden:  $n_n > n_r > n_R$ . Las dimensiones de la guía de entrada que se construye son de 10  $\mu\text{m}$  de anchura y 4  $\mu\text{m}$  de altura para asegurar un buen acoplamiento con la fibra de entrada, por lo que prácticamente puede considerarse monomodo [14].

La guía de entrada se corta a una determinada distancia de su inicio de forma que la cara de salida del núcleo sea perpendicular a la dirección de propagación. De este modo se consigue introducir la luz en la *zona de guía cortada*, donde estará depositada la membrana. En esta región se elimina el núcleo para que la luz se propague libremente por la membrana. Ésta membrana se considera un medio de índice de refracción complejo.

Un diseño apropiado del sensor es aquél, en que el espesor de la membrana es igual que el del núcleo de la guía de entrada (del orden de 4  $\mu\text{m}$ ), de forma que, en esta zona, la luz se guíe en la

dirección de la estructura antiresonante y se propague libremente en la dirección lateral, dirección en la que se difracta. Si el grosor de la membrana es mayor, la luz tiende a difractarse en la dirección transversal a las capas, aumentando las pérdidas del dispositivo. En cambio, membranas de menor grosor provocan pérdidas de inserción de luz en la membrana, ya que cuando ésta sale de la guía de entrada, se encuentra con dos medios de índice de refracción diferente, el de la disolución acuosa y el de la membrana.

Considerando la membrana como un medio de transporte de luz, ésta tendrá que ser transparente a la longitud de onda de trabajo. La longitud de la zona de guía cortada permite modular la sensibilidad de la señal, ya que a mayor longitud, mayor será el camino óptico recorrido por la luz. No obstante, como la luz se difracta en la dirección lateral, existe una longitud máxima compatible con un mínimo aceptable de pérdidas.

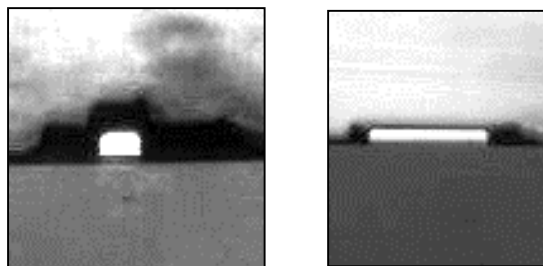
La *guía de salida* recoge la luz que se ha propagado por la membrana interaccionando con los reactivos ópticamente activos de ésta. Evidentemente, aunque es necesario introducir algunas diferencias, ésta ha de poseer las mismas propiedades que la guía de entrada, por lo que su estructura será equivalente. Su amplitud deberá permitir la recogida del máximo de luz difractada en la dirección lateral pero, además, tendrá que ser compatible con las dimensiones de la fibra de recogida. Dado que se utiliza una fibra multimodo estándar de 50  $\mu\text{m}$  de núcleo, se decide que la guía de salida tenga esa misma anchura.

A diferencia de la guía de entrada, no sería necesario que la guía de salida estuviera aislada del medio externo, siempre y cuando las soluciones que estuvieran en contacto con ella no tuvieran índices de refracción mayores que el índice del núcleo. Esto se debe a que una vez excitada la guía de onda de salida, toda la luz será captada por la fibra óptica de salida, independientemente de las condiciones del medio externo.

A continuación se resume el proceso de guiado de luz a través de las diferentes regiones que componen el transductor. La luz, de una determinada longitud de onda, que proviene de la fuente y es transmitida por una fibra óptica monomodo, se acopla a la guía de onda de entrada. La distribución modal de esta guía es monomodo tanto en la dirección transversal a las capas como en la lateral, gracias a las estructuras ARROW y rib. Para una determinada anchura de la estructura rib, una diferencia efectiva entre el índice de refracción del núcleo y sus capas adyacentes permite el confinamiento de luz en la dirección lateral, consiguiendo un comportamiento monomodo en esta dirección. La luz confinada en la guía de entrada se acopla a la membrana depositada en la zona de guía cortada. Asumiendo que el grosor de ésta es el mismo que la altura del núcleo de las guías de entrada y de salida, la luz permanecerá guiada en la dirección transversal a las capas del circuito. Las características de la estructura ARROW permiten que la distribución modal de la luz no cambie significativamente en la dirección transversal, siempre y cuando el índice de refracción de la membrana se aproxime a 1.46. Por lo tanto, la luz permanecerá guiada en esta dirección en la membrana aun cuando haya pequeños cambios de índice de refracción en ésta y a pesar de su contacto con el medio acuoso. En conclusión, la luz se propaga en el interior de la membrana mientras que se difracta en la

dirección lateral a las capas debido a que se ha eliminado la estructura rib. Así pues, para recoger el máximo de luz a la salida de la zona de libre propagación, se diseña una guía de recogida más ancha que la de entrada.

Unas fotografías aumentadas de los dispositivos sensores construidos muestran el confinamiento de la luz a través de las guías construidas a ambos lados del transductor y que permiten verificar el proceso de fabricación y la transmisión efectiva de luz antes de la activación química mediante la deposición de la membrana (**Figura 2. 3**).



**Figura 2. 3:** Verificación del guiado de luz a través de las guías laterales similares a la de entrada (10  $\mu\text{m}$ ) y salida (50  $\mu\text{m}$ ).

### 2.1.2 CARACTERÍSTICAS DIFERENCIALES DEL NUEVO DISEÑO

Tal y como se ha comentado en la introducción, para realizar medidas de absorbancia con sensores ópticos, análogas a las realizadas en los procedimientos espectrofotométricos convencionales, existen problemas instrumentales y metodológicos. No obstante, el nuevo concepto de sensor óptico que se propone presenta una serie de ventajas tecnológicas respecto a otros dispositivos sensores desarrollados, así como una serie de características analíticas diferenciales idóneas para ser explotadas.

#### 2.1.2.1 Ventajas tecnológicas

En paralelo a la propuesta realizada en este trabajo y con los mismos objetivos se han descrito diferentes dispositivos ópticos [17-20]. La diferencia clave entre éstos y el nuevo concepto de sensor, estriba en el tipo de guía de onda plana construida y en la técnica de acoplamiento utilizada para inyectar la luz a la guía de onda.

En cuanto al tipo de guía de onda, el sensor desarrollado utiliza estructuras ARROW, que ofrecen una serie de ventajas respecto a otros dispositivos que emplean otros tipos de guías de onda:

- Como la distribución modal en la dirección transversal a las capas equivale a una guía de onda de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, la guía es fácilmente acoplable a una fibra óptica monomodo, obteniéndose pérdidas de inserción de luz aceptables, del orden de 15 dB a la longitud de onda de 670 nm.

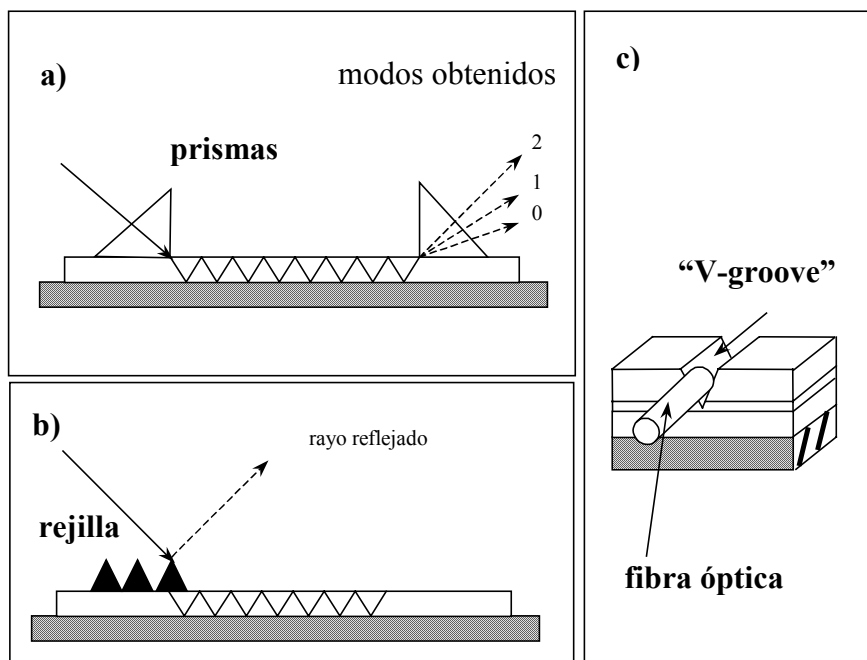
- El principio de funcionamiento de las guías presenta una gran tolerancia a variaciones en los parámetros de fabricación, por lo que las guías ARROW tienen distribuciones monomodo a pesar de pequeños cambios en el índice de refracción del núcleo. Este hecho es debido al efecto de filtro interferente de las capas antiresonantes que atenúan ordenes modales superiores.
- Las estructuras ARROW son tecnológicamente más fáciles de fabricar que las guías de onda planas convencionales y por lo tanto, los procesos de fabricación son menos costosos y más robustos. Las guías de onda convencionales requieren de sustratos de grosor mucho mayor (unas diez veces superior) que las ARROW para conseguir pérdidas de radiación equivalentes en el sustrato. Además, las guías convencionales son menos idóneas para la construcción de sensores ópticos porque para conseguir un comportamiento monomodo en la dirección transversal, a igual índice de refracción, necesitarían unas dimensiones de la membrana del orden de los 100 nm. En cambio con estructuras ARROW se tiene una profundidad del núcleo de unas 4  $\mu\text{m}$ , grosor idóneo para una membrana óptica depositada por técnicas reproducibles.
- La posibilidad de cortar la guía de onda, definiendo una zona de entrada y otra de salida, separadas por una zona donde se deposita la membrana, es sólo posible con estructuras ARROW. En guías de onda convencionales, para poder guiar la luz en la dirección transversal y evitar la pérdida de radiación en el sustrato, el índice de refracción de la membrana tiene que mantenerse superior al índice del medio envolvente. Éste es un aspecto crítico ya que la parte real del índice de refracción de la membrana cambia conjuntamente con la parte imaginaria de éste (absorbancia). Además, en una guía de onda monomodo convencional tanto el índice de refracción del núcleo como el del revestimiento tienen que ser muy parecidos, y cualquier disminución del índice de refracción de la membrana, a valores inferiores al del sustrato, provocaría grandes pérdidas de luz.

En cuanto a la técnica de acoplamiento utilizada (**Figura 2. 4**), en unos casos se han utilizado *prismas* como acopladores radiación-membrana. Éstos requieren de un complejo y aparatoso sistema óptico, de poca reproducibilidad en su construcción y que produce elevadas pérdidas de inserción. Por este motivo, los prismas requieren la utilización de fuentes de luz de alta potencia, como el láser de argón, encareciendo el sistema y acentuando la fotodescomposición de los componentes ópticamente activos de la membrana.

En otros casos se han utilizado *rejillas* o "*gratings*". La eficacia de éstas depende fuertemente del ángulo de incidencia de la luz y de su espacio y grosor, por lo que estos parámetros deben permanecer muy controlados. No obstante, la principal desventaja que presentan este tipo de acopladores es la dificultad de los procesos de su fabricación [16].

En cambio, el sistema de acoplamiento empleado para el sensor desarrollado se basa en el alineamiento directo de fibra-guía o "*end-fire coupling*", mediante canales en forma de V

llamados “V-grooves”, que son fabricados por las técnicas estándar de micromecanización sobre sustratos de silicio [17].



**Figura 2. 4:** Diferentes tipos de acoplamientos entre la fuente de luz, las guías de onda y el detector.  
a) prismas, b) rejillas (gratings), c) canales en forma de V.

### 2.1.2.2 Sensibilidad y tiempo de respuesta

En cuanto a las características analíticas diferenciales que presenta el nuevo diseño de sensor óptico de absorbancia, la principal es que la configuración del transductor permite que la dirección de la transmisión de luz sea perpendicular a la dirección de transferencia de masa, independizando el tiempo de respuesta respecto del camino óptico. De esta forma, es posible incrementar la sensibilidad del sensor sin aumentar simultáneamente el tiempo necesario para llegar al estado estacionario de la señal.

La respuesta de un sensor óptico de matriz tridimensional sigue la ley de Beer-Lambert, que relaciona linealmente la absorbancia con la concentración ( $C$ ) de la especie absorbente, su absorptividad molar ( $\epsilon$ ) y el camino óptico ( $d$ ) ( $A = \epsilon d C$ ) (18). Por lo tanto, las alternativas posibles para incrementar la sensibilidad son o bien cambiar la especie ópticamente activa, por otra de absorptividad molar mayor, aumentar su concentración, o bien aumentar el camino óptico.

A pesar de que existe un gran número de moléculas con propiedades ópticas que potencialmente pueden actuar como cromoionóforos, el número realmente útil de ellas para realizar medidas de absorbancia es muy reducido. En primer lugar, la variación de propiedades espectroscópicas de la molécula debe coincidir con la longitud de onda de alguno de los emisores existentes. Esto ya reduce el número de candidatos potenciales. En segundo lugar, las moléculas deben ser perfectamente solubles en la matriz utilizada. La limitación en este caso



estriba en que ésta es extraordinariamente lipofílica, lo que hace inviable la solubilización de moléculas diseñadas para su utilización en medios acuosos.

Cumplidos estos dos requisitos básicos, la sensibilidad se podría incrementar seleccionando aquellos compuestos que presenten valores de absorptividad más elevados. No obstante, los valores de  $\epsilon$  presentan un límite máximo de  $10^5$  a  $10^6 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  [18].

Otra vía para potenciar la sensibilidad sería incrementar la concentración de la especie ópticamente activa. En este caso el límite vendría prefijado por la solubilidad en el disolvente/plastificante de la matriz. Otro problema asociado es la tendencia actual hacia el desarrollo de sensores miniaturizados. La reducción de superficie activa limita la utilización de esta alternativa.

Así pues, la opción más factible sería aumentar la longitud del camino óptico, cosa que permite el nuevo diseño de sensor. Generalmente, en sensores de configuración convencional utilizados para medidas de absorbancia, el camino óptico viene definido por el grosor de la membrana. El problema resultante de aumentar el grosor de la membrana, para incrementar el camino óptico y de esta forma la sensibilidad, es que provoca un aumento del tiempo de respuesta del sensor. La relación entre el grosor de la membrana y el tiempo de respuesta puede explicarse teóricamente si se asume que la velocidad de respuesta está controlada por el proceso de difusión de los analitos en la membrana.

Suponiendo que  $D_m$  ( $\text{cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ ) es el coeficiente de difusión medio de todas las especies móviles en una membrana de grosor  $d$  (cm), la solución de la respectiva ecuación de difusión da lugar a la siguiente expresión [19]:

$$A(t) = A(\infty) - \{A(\infty) - A(0)\} \times \frac{8}{\pi^2} \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{(2m+1)^2} \exp\left(-\frac{(2m+1)^2 \pi^2 D_m t}{4d^2}\right) \quad (19)$$

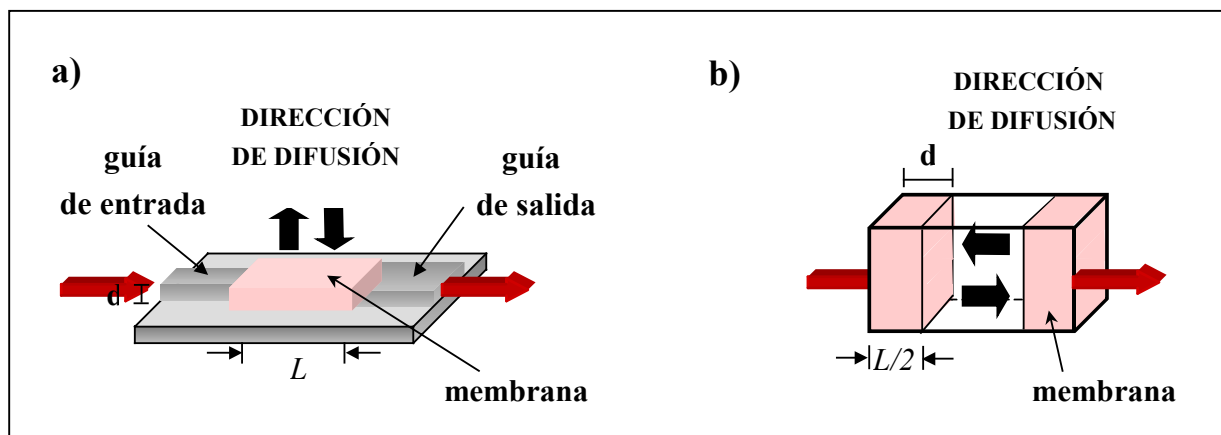
en la que  $t$  es el tiempo,  $A(t)$  es la cantidad total de sustancias que se difunden en un tiempo  $t$ ,  $m$  es un contador de integración,  $D_m$  es el coeficiente de difusión y  $d$  es el grosor de la membrana. A partir de la ecuación (19) se puede deducir que el tiempo en llegar al 95% de la respuesta del estado estacionario es:

$$t_{95\%} = 1.13 \frac{d^2}{D_m} \quad (20)$$

De las ecuaciones 18 y 20 se deduce que en los sistemas de configuración convencional, un aumento del espesor de la membrana provoca un aumento proporcional de la sensibilidad y en cambio, el tiempo de respuesta aumenta proporcionalmente con el cuadrado del espesor de la membrana.

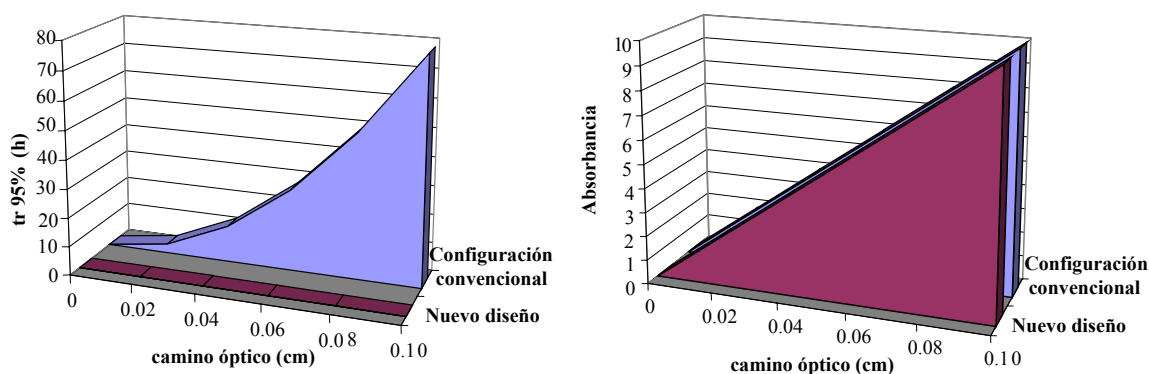
En cambio, en el nuevo sensor óptico el camino óptico no viene definido por el espesor de la membrana sino que está determinado por la longitud de la zona de guía cortada. La **Figura 2. 5**

muestra esquemáticamente ambas configuraciones. En el nuevo diseño presentado, el camino óptico o longitud de la zona de libre propagación ( $L$ ) puede incrementarse para mejorar la sensibilidad, mientras que el grosor de la membrana ( $d$ ) queda inalterado y por lo tanto, el tiempo de respuesta del sensor no se ve afectado.



**Figura 2. 5:** a) Sensor desarrollado, en el que el camino óptico ( $L$ ) es independiente del grosor de la membrana ( $d$ ), b) Configuración convencional, en la que el camino óptico se relaciona con el grosor de la membrana por  $L = 2d$ .

La comparación de los resultados teóricos en cuanto al tiempo de respuesta y la sensibilidad se muestra en la **Figura 2. 6**.



**Figura 2. 6:** Estudio teórico comparativo de los resultados esperados. El  $Tr$  ha sido calculado mediante la ec. 20 considerando  $Dm=1 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . La sensibilidad ha sido calculada mediante la ley de Beer considerando  $C=1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{Kg}^{-1}$  y  $\varepsilon=1 \times 10^5 \text{ Kg} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Con el fin de mejorar la sensibilidad, al incrementar el camino óptico en las dos configuraciones ( $d$  para la configuración convencional y  $L$  para el nuevo sensor) se espera que en la configuración convencional el tiempo de respuesta ( $Tr$ ) también aumente, ya que éste depende directamente del grosor de la membrana ( $d$ ), mientras que en el caso de utilizar el

nuevo sensor, se prevé que el tiempo de respuesta quede inalterado, puesto que el grosor de la membrana no ha sido incrementado, tan solo el camino óptico definido por  $L$ .

Los resultados teóricos obtenidos predicen la posibilidad de aumentar hasta cien veces la sensibilidad mediante una zona de guía cortada de  $500\ \mu\text{m}$  de longitud manteniendo un tiempo de respuesta reducido, en relación con un sensor óptico convencional del mismo grosor de membrana.

Por otro lado, mediante la nueva configuración propuesta, la radiación se mantiene confinada y se evita la interacción de ésta con la disolución que contiene el analito. De este modo, se evitan las posibles interferencias debidas a la matriz de dicha disolución (absorbancia residual, turbidez o índice de refracción). Resultados teóricos basados en la transmisión de luz en guías de onda planas [20] demuestran que la luz queda confinada en la membrana y no sale a la disolución. Si la membrana y la disolución tienen respectivamente los índices de refracción de 1.46 y 1.33, el 99.77 % de la potencia de la radiación se encuentra en el interior de la membrana mientras que el 0.23% restante se guía en el campo evanescente. Cambiando el índice de refracción de la disolución a 1.36, se mantiene un 99.71% de la luz en la membrana, y cambiando el índice de refracción de la membrana a 1.47, se mantiene un 99.79 % de la luz en la membrana. Por lo tanto, podemos considerar que el campo guiado en la membrana es casi independiente de las variaciones en el índice de refracción entre la membrana y la disolución.

### *2.1.3 REALIZACIÓN TECNOLÓGICA DEL TRANSDUCTOR*

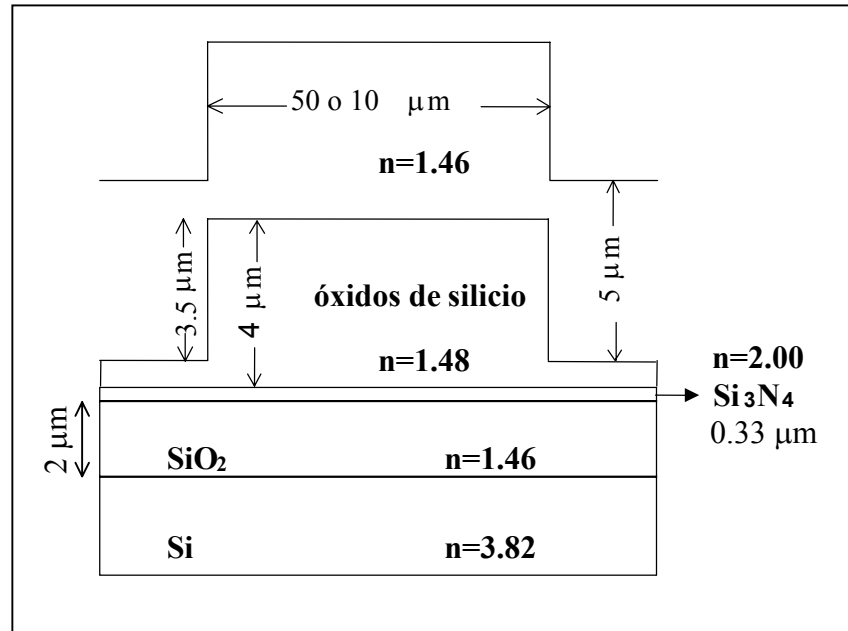
La construcción del primer prototipo de transductor se realizó mediante la fabricación de una estructura principal sobre una oblea de silicio. La estructura constaba de una guía recta de entrada monomodo, una zona de guía cortada y una guía recta de salida multimodo. A ambos lados de la estructura del transductor se fabricaron guías rib equivalentes a las citadas, de forma que fuera posible validar las características de las guías que se utilizarían como elementos activos del sensor. Este conjunto se acoplaba irreversiblemente a un soporte, en el que se grabaron los canales en forma de V, denominados “V-grooves”, que permiten el acoplamiento entre guías y fibras ópticas. Aunque este prototipo permitió demostrar las posibilidades del nuevo sensor óptico de diseño plano, se observó la necesidad de mejorar esta estructura, tanto en lo que se refiere a las guías como a su acoplamiento a las fibras ópticas, con el fin de desarrollar un transductor óptico integrado intercambiable, de fácil manejo y robusto para su utilización en campo. Los cambios realizados en la estructura se comentan en el último apartado de la discusión de resultados (véase § 2.4.1).

#### **2.1.3.1 Fabricación de las guías rib ARROW**

Las guías rib ARROW se fabricaron en el Centro Nacional de Microelectrónica (CNM) de Barcelona. Por tanto, a excepción de algunas modificaciones, los procesos involucrados en la

fabricación de las guías son compatibles con los procesos tradicionales de microelectrónica en tecnología de silicio, que se implementan en este centro.

La estructura fabricada para operar entre 600-800 nm se describe en la **Figura 2. 7**. En ella se pueden distinguir los diferentes grosores de las capas de la guía de onda ARROW y sus índices de refracción requeridos para conseguir las mínimas pérdidas de luz.



**Figura 2. 7:** Esquema de la estructura rib ARROW con revestimiento, fabricada con anchos de 10 o 50  $\mu\text{m}$  dependiendo de si se trata de la guía de entrada o la de salida y con capas de revestimiento de 5  $\mu\text{m}$  de grosor.

El proceso de fabricación de las guías puede dividirse en dos etapas: la fabricación de la *estructura multicapa* y la formación de una *estructura rib* sobre la primera, que guíe la luz en la dirección lateral. Los procesos implicados deben cumplir una serie de requisitos para que las capas fabricadas sean transparentes a la longitud de onda de trabajo y presenten las mínimas pérdidas de luz. En consecuencia, tanto los índices de refracción como el grosor de las capas deben ser controlados al máximo y tienen que ser homogéneos y reproducibles. Además, el espesor de las capas ha de ser preferiblemente delgado, ya que tanto las técnicas de deposición como los procesos de oxidación utilizados tienen velocidades de crecimiento y de oxidación lentas.

El esquema general de fabricación se muestra en la **Figura 2. 8**. Se parte de una oblea de silicio tipo n de 100 mm de diámetro y 0.6 mm de grosor. Esta oblea, que actúa de sustrato, se pule por una de sus caras. Sobre ésta se depositan el resto de las capas.

- I. La primera capa que se deposita es la del revestimiento del sustrato, de índice de refracción cercano al del núcleo ( $n_n=1.46$ ) y de 2  $\mu\text{m}$  de grosor. La técnica de deposición utilizada es la de oxidación térmica del silicio [28, 29]. Ésta es una técnica

habitual en microelectrónica y consiste en el crecimiento de capas aislantes de óxido de silicio, de espesor controlable, sobre la oblea de silicio. La oxidación se verifica a una temperatura del orden de  $1000^{\circ}\text{C}$ , en presencia de un gas que contiene oxígeno o vapor de agua. En este caso se ha utilizado la oxidación térmica húmeda a  $1100^{\circ}\text{C}$ .

- II. Sobre la anterior capa, se deposita otra de alto de índice de refracción ( $n_{r2}=2.00$ ) y de  $0.33\ \mu\text{m}$  de espesor. La técnica utilizada para ello es la deposición química en fase vapor a baja presión (LPCVD). El método de deposición química en fase vapor (CVD) se basa en el uso de un reactivo precursor, diclorosilano (DCS) [23] que reacciona con otro gas, amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), en las proximidades del sustrato en una atmósfera de baja presión (limpia). Sobre el sustrato se va formando la capa de nitruro de silicio ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) a una temperatura de  $800^{\circ}\text{C}$  y una presión de 200 mTorr. Este método permite tener un gran control tanto del grosor de la capa depositada como de su índice de refracción, controlando la temperatura, la presión y el caudal de los gases de mezcla.
- III. La última capa de la estructura multicapa es la capa de núcleo, que se obtiene depositando subóxidos de silicio, de estequiometría variable, en función de las condiciones de deposición, mediante la técnica de deposición química en fase vapor mejorada por plasma (PECVD) [23]. Tal y como su nombre indica, el aporte energético de la reacción se hace mediante un plasma generado por una descarga eléctrica inducida por radiofrecuencia. El plasma de un gas a baja presión permite formar la capa a una temperatura menor, y la velocidad de deposición es más elevada. Son muchos los parámetros que controlan la reacción por lo que fácilmente es posible modificar el índice de refracción de la capa depositada, lo que a su vez provoca que el proceso no sea repetitivo si todos los parámetros no están perfectamente ajustados. Las capas obtenidas no son muy homogéneas, pero los resultados obtenidos en la caracterización óptica de las guías se adecuan a los propósitos que nos planteamos. La reacción se lleva a cabo con una mezcla de silano ( $\text{SiH}_4$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ) a una temperatura de  $300^{\circ}\text{C}$  y una presión de 200 mTorr. Variando parámetros como la relación de caudales de los gases, la geometría de la cámara, la potencia y frecuencia de trabajo, se obtienen índices de refracción entre 1.46 y 1.52.
- IV. A partir de esta etapa se fabrica la estructura rib, que permite el confinamiento lateral de luz. Sobre la capa del núcleo, se deposita una resina fotocurable por la técnica de rotación controlada o “spin-coating” y posteriormente, se coloca una máscara con los motivos que definen la forma, el ancho y la longitud de la guía de onda. Una vez diseñadas las máscaras, éstas se fabrican en casas comerciales especializadas como Align-Rite (Bridgend, South Wales, UK). El conjunto se expone a luz ultravioleta, de

forma que un proceso posterior de revelado elimina la fotoresina de las zonas que se desea atacar y grabar. Tras este proceso, se endurece la fotoresina para evitar su ataque.

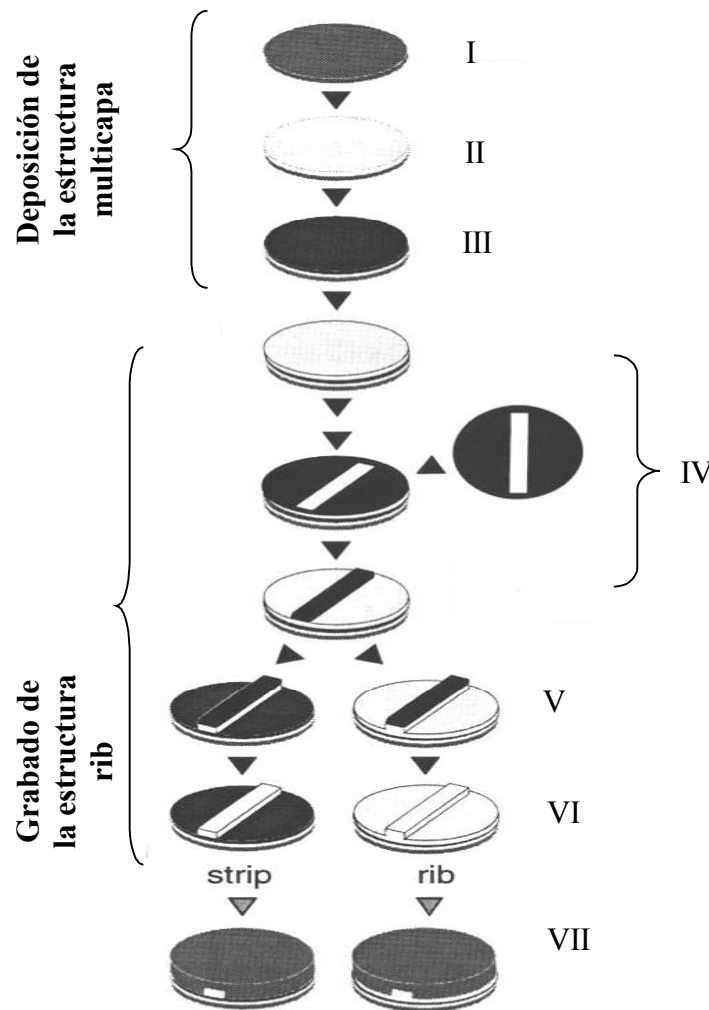


Figura 2. 8: Diagrama del proceso de construcción de las guías ARROW [14].

- V. El grabado consiste en eliminar parte del material de la última capa sin afectar a las zonas que han quedado cubiertas por la fotoresina. Es decir, se hace un grabado selectivo de la estructura. Dependiendo de la técnica utilizada se obtienen grabados diferentes. El proceso físico-químico de grabado escogido es el grabado iónico reactivo o "Reactive Ion Etching" (RIE) [24], que permite obtener estructuras rib de paredes rectas. El grabado se realiza mediante un bombardeo iónico de la muestra provocado por un plasma que se genera en un gas por radiofrecuencia. Debido a que el material arrancado por el ataque puede reaccionar con los iones del gas produciendo un grabado adicional es muy importante escoger debidamente el gas a utilizar. Dependiendo del tiempo de exposición de la estructura, se obtienen profundidades de grabado diferentes

de la última capa. El gas empleado es  $\text{CHF}_3$ , a una potencia del plasma de 500 W y a una velocidad de ataque de 80 nm/min.

- VI. Posteriormente, se elimina la fotoresina por procesos de disolución química en disolventes orgánicos y se obtiene así la estructura rib.
- VII. Finalmente se deposita una capa de revestimiento sobre el núcleo, con la técnica PECVD. Idealmente se necesita un grosor de 5  $\mu\text{m}$  para aislar totalmente las guías y evitar que el campo evanescente alcance el exterior. No obstante, la gran diferencia entre los índices de refracción de esta capa y la del núcleo crean fuertes tensiones entre ellas que provocan el levantamiento del recubrimiento. Por este motivo se han depositado capas de espesores de 2 y 5  $\mu\text{m}$  con índices de refracción de 1.47.

### 2.1.3.2 Obtención de la guía cortada

Existe un proceso adicional de grabado RIE para eliminar la zona de la guía dónde se deposita la membrana. Para ello se necesita una nueva máscara y otra etapa de fotolitografía. El grabado para llegar hasta la capa de nitruro de silicio, eliminando las capas de revestimiento y núcleo tiene una profundidad total de 9  $\mu\text{m}$  (5  $\mu\text{m}$  de revestimiento y 4  $\mu\text{m}$  de núcleo). Para no estropear otras zonas de la estructura, durante el ataque se han tenido que depositar resinas muy resistentes y realizar procesos especiales de curado.

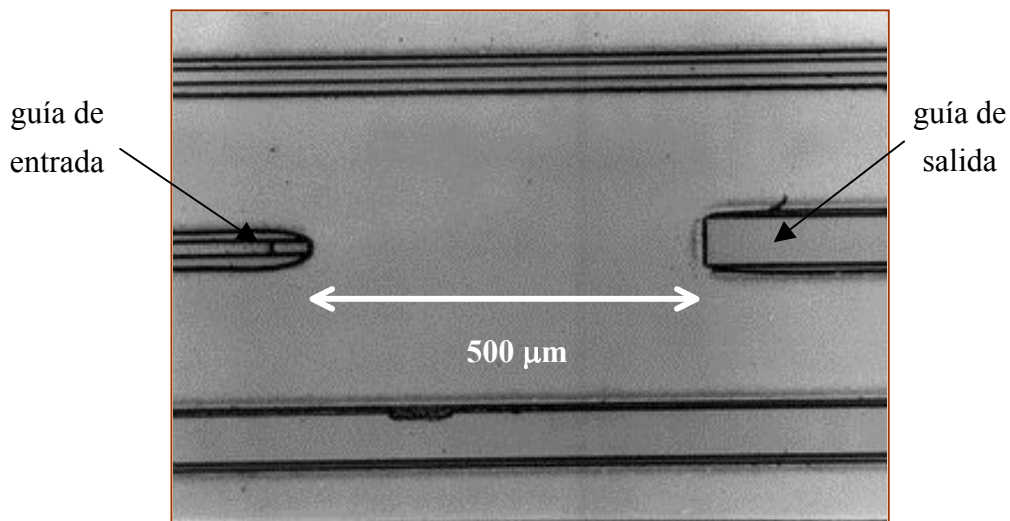
Dado que el control del grabado sólo puede realizarse verificando el tiempo, es habitual obtener heterogeneidades debidas tanto a que queden restos de núcleo como a que se ataque la capa de nitruro de silicio. Estos problemas reducen las prestaciones que podría ofrecer el sensor. El gas empleado es  $\text{CHF}_3$  a una presión de 0.05 mbar, a una potencia del plasma de 500 W y a una velocidad de ataque de 0.1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . En la fotografía de la **Figura 2. 9** se puede apreciar la estructura de guía cortada en la parte central, la guía de entrada a la izquierda y la de salida a la derecha, así como las dos guías laterales que permiten estudiar las características de guiado en ausencia de membrana.

### 2.1.3.3 Pulido de las muestras

El proceso final de la fabricación del transductor consiste en el pulido de las estructuras tras cortarlas a las longitudes deseadas. Es fundamental conseguir un pulido adecuado de las caras de las guías para obtener las mínimas pérdidas de inserción al acoplarlas directamente a las fibras ópticas. Aunque el pulido es tecnológicamente el proceso menos complejo de la fabricación del dispositivo, es a su vez uno de los procesos más críticos ya que tanto las pérdidas de luz como la reproducibilidad en la fabricación dependerán de él.

El pulido consiste en un proceso físico de desbastado que se produce al apoyar el extremo de la guía sobre un material abrasivo en movimiento. El pulido se ha realizado con una pulidora

modelo UP-150 (LECO CORPORATION) con papel incluyendo el abrasivo de carburo de silicio de  $0.9\ \mu\text{m}$  de diámetro de grano, y finalmente alúmina de  $0.3\ \mu\text{m}$ .



**Figura 2. 9:** Fotografía de una vista superior de la estructura del transductor, que muestra la longitud de la zona de guía cortada y las guías de onda de entrada y salida.

#### 2.1.3.4 Acoplamiento de las guías y las fibras

La fijación del sistema de acoplamiento fibra-guía es un paso imprescindible en la construcción del sensor. Este acoplamiento, así como la caracterización óptica de las guías construidas sin membrana, se realiza en el Grupo de Espectroscopía y Fibras Ópticas, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza.

Para el acoplamiento directo se diseña un soporte que facilita los procesos de alineación de las guías con las fibras ópticas. Se usan bloques fabricados con tecnología de silicio en los que se graban unos canales en forma de V o “V-grooves”. El proceso de obtención de estos canales es muy parecido al de la construcción de las guías de onda y se utilizan las mismas técnicas de deposición. A continuación se describe el proceso, que puede resumirse en cuatro etapas de grabado, una etapa de corte y otra de pulido.

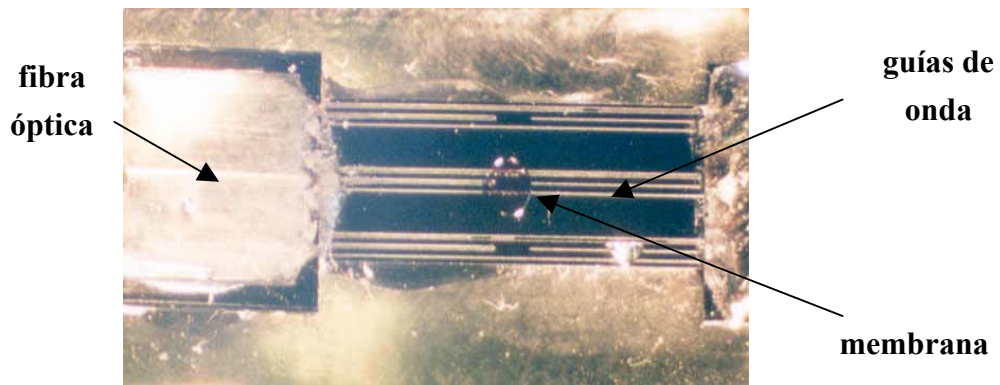
- I. Se deposita una capa de  $\text{SiO}_2$  sobre una oblea de silicio por oxidación térmica con vapor de agua a  $1100\ ^\circ\text{C}$ .
- II. Sobre la capa anterior se deposita una capa de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  mediante la técnica LPCVD. Esta capa protegerá a la anterior de  $\text{SiO}_2$  del vigoroso ataque que se realiza en la última etapa de grabado para obtener el canal en forma de V.



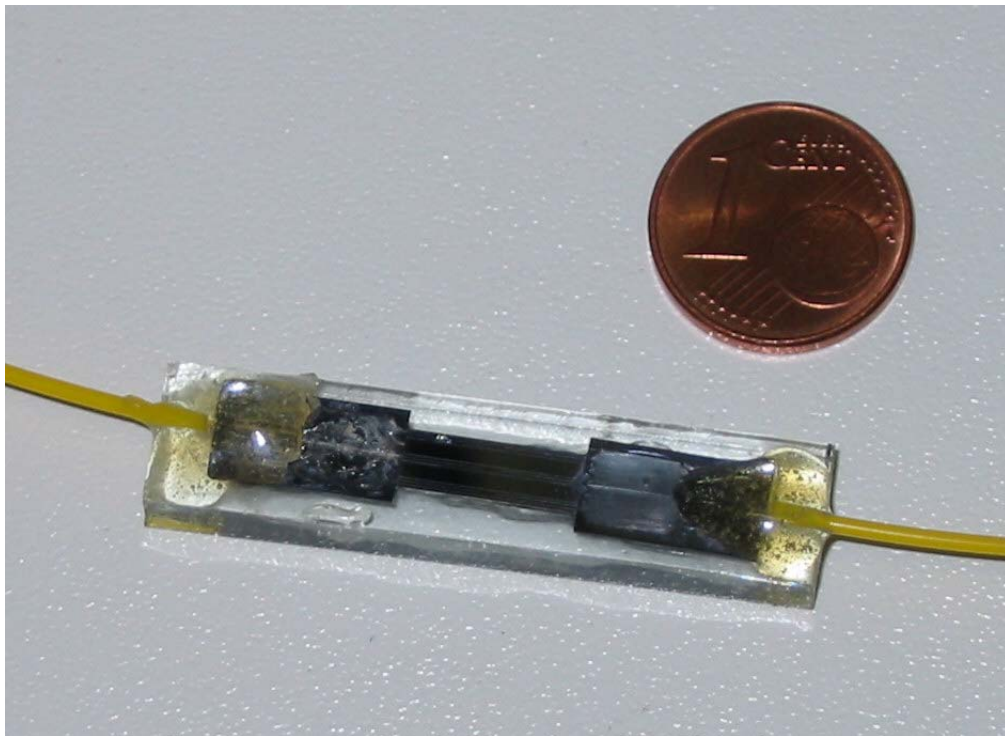
- III. Se realiza un proceso fotolitográfico análogo al explicado en la fabricación de las guías. Sobre la última capa se deposita una resina fotocurable y una máscara con los motivos que definen la anchura y la longitud de los canales. Para diferenciar las zonas a grabar de las que no, se expone el conjunto a luz ultravioleta y se elimina la fotoresina sobrante.
- IV. El conjunto se ataca por el proceso químico RIE y se graba la capa de SiO<sub>2</sub> con ácido fluorhídrico al 10%. Se elimina la fotoresina lavando con acetona y se deja expuesta la capa de silicio que sufrirá el siguiente grabado.
- V. Se graban los canales en forma de V en la capa de silicio de la oblea, mediante un ataque anisotrópico con KOH al 40 %, a 80 ° C y a una velocidad de 1 μm/min.
- VI. Posteriormente se cortan individualmente los canales en forma de V, grabados sobre la oblea, con una sierra de diamante de 50 μm de espesor.
- VII. A través de la visión proporcionada por un microscopio, se acoplan las fibras ópticas peladas a los canales en forma de V y luego los bloques resultantes se someten a un proceso de pulido de calidad óptica. En una primera etapa, se pulen mediante una pulidora de agua. Luego se eliminan los residuos con papel de alúmina de 3 μm de tamaño de partícula y después con alúmina de 1 μm. Finalmente, se realiza un pulido con papel de carburo de silicio de 0.3 μm.

El conjunto compuesto por los canales en forma de V y las fibras se alinean a las guías mediante microposicionadores. Estos permiten mover los soportes en las tres direcciones del espacio, mientras se mantiene fijo el dispositivo transductor. Para medir la alineación, se realiza un montaje en el que la fibra de entrada y la de salida se conectan a una fuente de luz láser y a un detector, respectivamente. La alineación se considera efectuada cuando se detecta el máximo de luz a la salida de la guía.

Una vez alineadas las fibras a las guías, se fijan los soportes de los canales en forma de V, mediante un adhesivo de polimerización rápida (LOCTITE 158350), que presenta las propiedades mecánicas y ópticas adecuadas. Finalmente, cuando están fijadas las fibras a las guías, se encapsula el conjunto con un adhesivo de fotopolimerización lenta (NORLAND OPTICAL ADHESIVE 6101), que presenta un bajo cambio dimensional en el proceso de polimerización, evitando la posible desalineación. La **Figura 2. 10** destaca el aspecto final del acoplamiento de las fibras y las guías mediante los soportes en forma de V y la **Figura 2. 11** muestra uno de los sensores desarrollados de dimensiones 0.5x3.0x1.5 cm.



**Figura 2. 10:** Fotografía ampliada del transductor que incorpora la membrana en la zona de guía cortada.

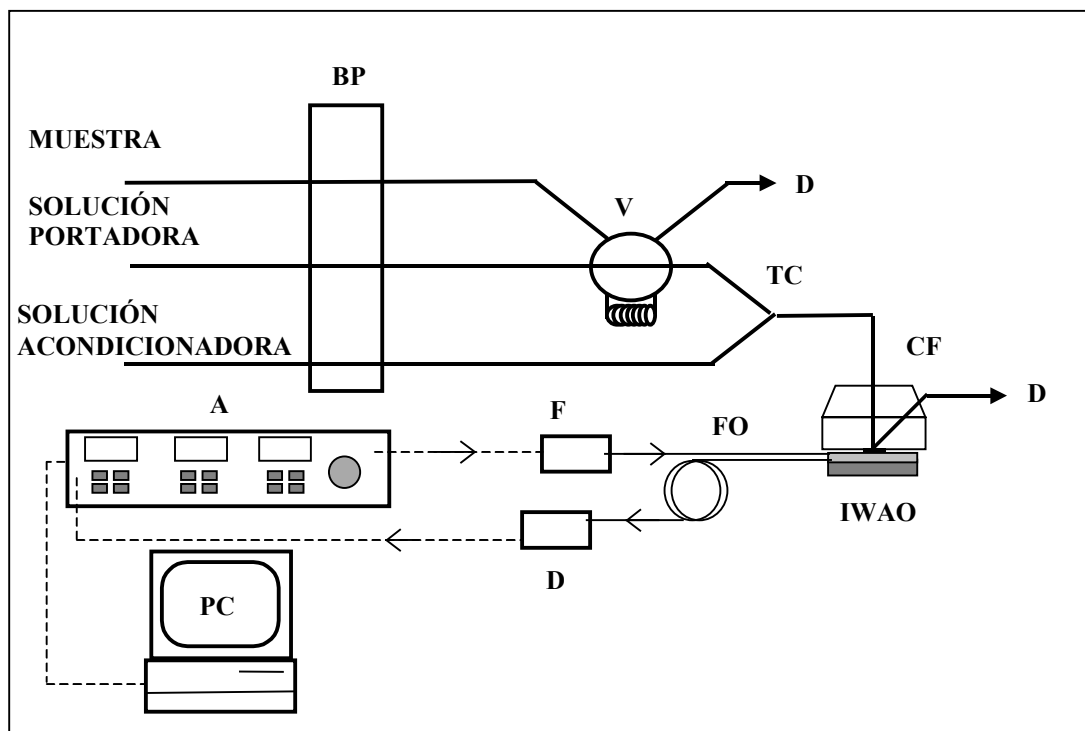


**Figura 2. 11:** Fotografía de uno de los sensores contruidos basado en guías de onda planas de configuración recta.

#### 2.1.4 INSTRUMENTACIÓN

La instrumentación utilizada es bastante sencilla ya que se emplearon componentes ópticos de gran consumo y elementos de gestión de fluidos convencionales. Podemos diferenciar tres partes esenciales del sistema experimental: el *sistema de inyección de luz*; el *sistema de detección y tratamiento de la señal*; y el *sistema de gestión de fluidos* que permite cambiar la

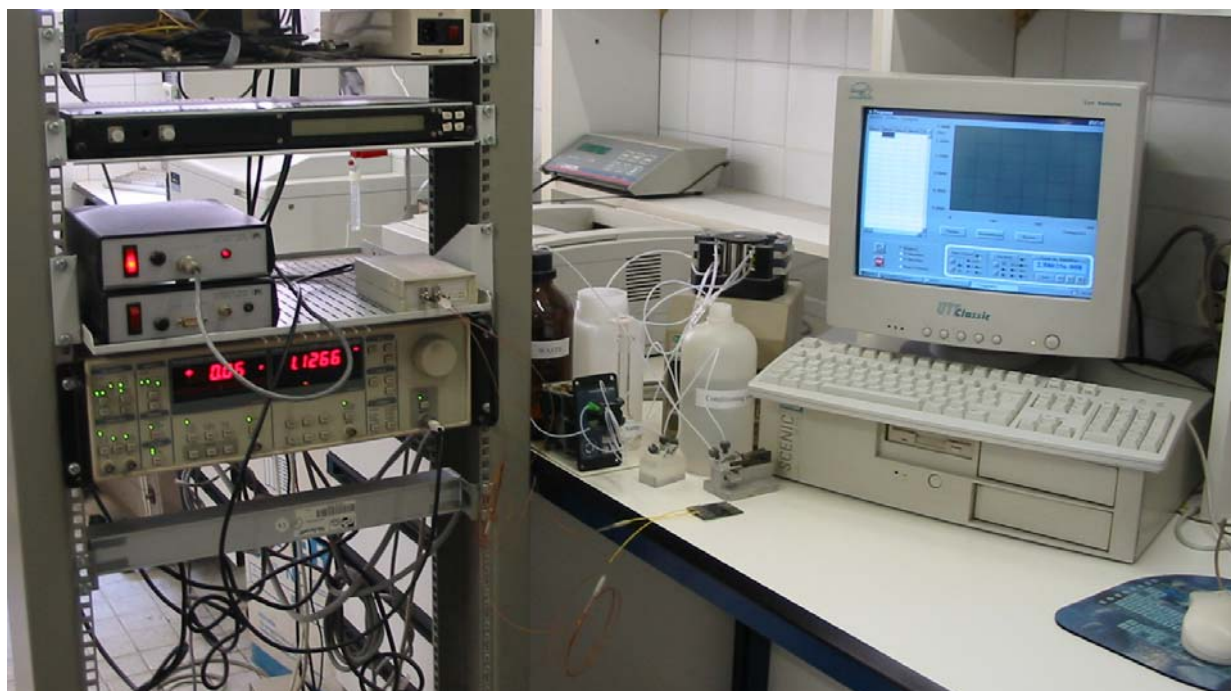
disolución de muestra en contacto con el sensor. Este último puede variar en función del procedimiento de medida utilizado y la configuración del sensor. Para realizar medidas de muestras en condiciones dinámicas de flujo continuo se ha empleado una celda de flujo especialmente diseñada. En el caso de medidas estáticas, esta celda de flujo no es necesaria. El sistema de gestión de fluidos varía si se utiliza una técnica de inyección de muestra o de flujo continuo de ésta.



**Figura 2. 12:** Montaje experimental de sistema que permite realizar medidas en flujo continuo o por inyección de muestra. *Sistema de inyección de luz:* F, fuente; *sistema de detección y tratamiento de la señal:* FO, fibras ópticas, IWAO, sensor integrado, D, detector; *A*, amplificador lock-in; *sistema de gestión de fluidos:* CF, celda de flujo, BP, bomba peristáltica, V, válvula distribuidora o válvula de inyección, D, desguace, TC, conector T.

A lo largo de la tesis se utilizaron dos *sistemas de inyección de luz* diferentes, en función de la longitud de onda de trabajo deseada. Para trabajar con cromoionóforos con absorciones máximas en torno a 680 nm, se utilizó una fuente de luz láser de estado sólido (GCA Fiberoptics, modelo GCA-3200-FC-08-Z) emitiendo a 670 nm, con un ancho de banda de 20 nm y acoplando 1  $\mu\text{W}$  de potencia al sensor. En el caso de trabajar con colorantes sensibles en la zona NIR se utilizó un láser de diodo (GCA Fiberoptics, modelo GCA-78MI) emitiendo a 778 nm, con un ancho de banda de 33 nm. La fuente puede considerarse un LED que acopla 11.26  $\mu\text{W}$  de potencia al sensor al trabajar a una corriente en la que no tiene efecto láser. El *sistema de detección* está formado por el transductor construido, que consta de una estructura multicapa de silicio; una guía de entrada, una zona de guía cortada, que incorpora la membrana

óptica, y una guía de salida. Las guías de entrada y de salida están acopladas a una fibra óptica estándar de telecomunicaciones monomodo (9/125  $\mu\text{m}$ ) y una fibra óptica estándar de telecomunicaciones multimodo (50/125  $\mu\text{m}$ ) respectivamente. Éstas se conectan a la fuente y al detector mediante conectores estándar. El detector es un fotodiodo PIN de silicio conectado a un preamplificador de transimpedancia.

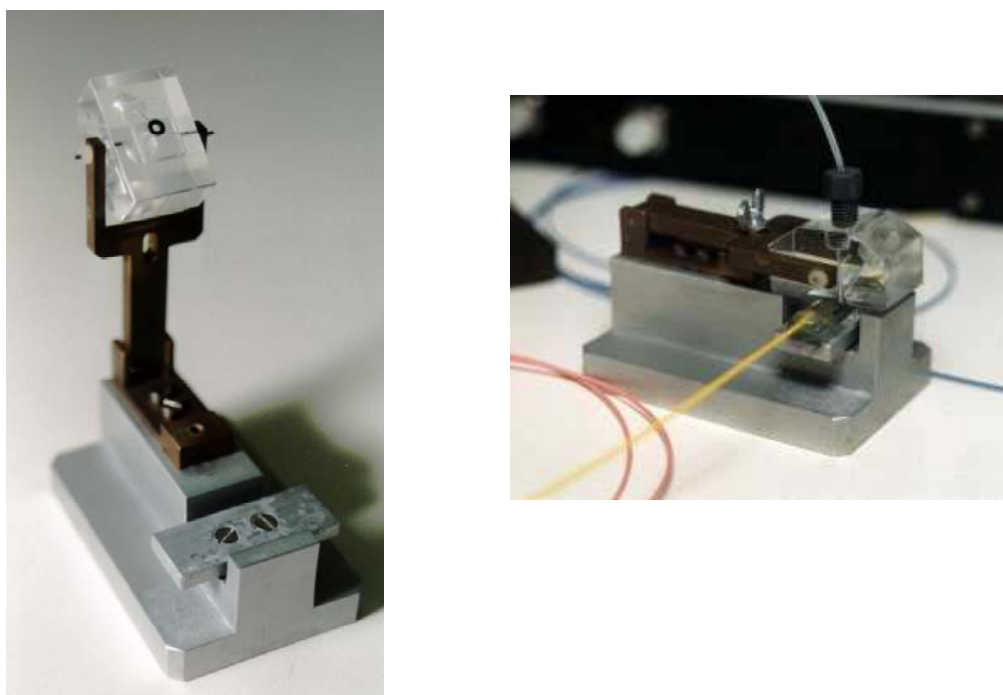


**Figura 2. 13:** Fotografía del montaje experimental

Para aumentar la relación señal/ruido y modular la frecuencia de emisión de la fuente de luz se añadió un *sistema amplificador*. Éste es un demodulador sincrónico o amplificador “lock-in” (SR810 DSP Stanford Research Systems) [25]. Los parámetros a controlar de este amplificador son la frecuencia de modulación, la amplitud de la señal y el tiempo de integración, que controla la amplitud de frecuencias del filtro [26]. Las condiciones de trabajo fueron de 1.1557 Khz de frecuencia, 0.5 V de amplitud y un tiempo de integración de 10-30 ms. En el caso de realizar medidas de muestra en condiciones dinámicas de flujo continuo (paso continuo o inyección periódica de muestra) se introdujo el *sistema de gestión de fluidos*, que consta de una unidad de impulsión o bomba peristáltica de 4 canales Gilson Minipuls 3 (Elkay, Boston, MA), una válvula de distribución de 6 vías automática (Rheodyne 5012, Cocati, CA) o una válvula de inyección automática (Hamilton MVP), y una *celda de flujo* ajustada a las dimensiones del dispositivo. La configuración en V de la entrada y salida del flujo (configuración “wall-jet”), permite reducir al mínimo los volúmenes muertos y previene el atraso en el tiempo de respuesta debido a la dispersión de las muestras en la disolución portadora. La cámara de medida (zona de interacción analito-membrana) viene definida por una junta torica de viton de 2 mm d. i., que proporciona a su vez estanqueidad de la celda. El diseño

de esta celda se ilustra en la **Figura 2. 14**. Todas las conducciones del sistema de gestión de fluidos fueron construidas con tubos de PTEE de 0.8 mm d. i., que se integran en el sistema mediante conectores de PVC. La estanqueidad se asegura mediante juntas tóricas de viton (Epidor, S.A.).

Todo el sistema de adquisición y tratamiento de datos está controlado por un ordenador personal. El programa diseñado con esta finalidad (Anexo V) permite controlar las condiciones de trabajo cuando se utilizan diferentes configuraciones instrumentales y permite obtener el valor de un blanco de referencia para convertir la señal de potencia que se obtiene del amplificador en una señal de absorbancia.



**Figura 2. 14:** Fotografías de la celda de flujo construida.

## 2.2 CARACTERIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SENSOR: PARÁMETROS DE CALIDAD

El primer objetivo que se pretendió abordar fue la obtención de una membrana ópticamente activa, de características conocidas, que permitiera, en primera instancia, evaluar y validar la respuesta del sensor desarrollado. Por esta razón, se preparó una membrana polimérica selectiva de ión potasio de composición análoga a otras previamente descritas en la bibliografía [19, 34] y se caracterizó mediante una configuración convencional basada en una celda de flujo.

### 2.2.1 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA DE LA MEMBRANA SELECTIVA DE IÓN POTASIO

En la **Tabla 2. 1** se muestra la composición de la membrana utilizada para validar el sensor. Ésta se obtuvo disolviendo y homogeneizando los diferentes componentes de la mezcla en 1.5

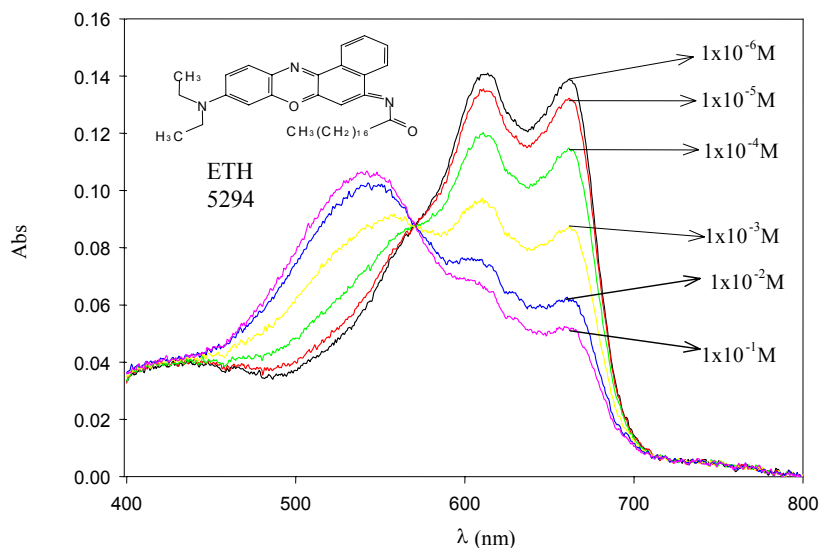
mL de THF. A continuación se deposita la membrana y se deja evaporar el THF. La relación molar entre cromoióforo (ETH 5294), ionóforo (Valinomicina) y aditivo iónico (tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio) que permite establecer una dependencia óptima de la señal respecto de la concentración de analito exige un exceso de aditivo de un 10 %. Tras su preparación, las membranas deben resguardarse de la luz ambiente hasta su utilización.

**Tabla 2. 1:** Composición de la membrana desarrollada para validar la respuesta de la nueva configuración de sensor

	% peso	mmol·ml <sup>-1</sup>
<b>ETH (5294)</b>	0.54	9.3
<b>Valinomicina</b>	0.92	8.3
<b>tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio</b>	0.48	9.7
<b>PVC</b>	32.95	-
<b>DOS</b>	65.20	-

Para controlar los cambios que sufre el cromoióforo en función de la concentración de potasio, se realizó el espectro de absorbancia de la membrana entre 400 y 800 nm, en contacto con soluciones a diferente concentración de analito, tamponadas con acetato de magnesio/acético a pH=5.05 y en condiciones de flujo continuo. El espectro presenta dos bandas de absorción correspondientes a la forma ácida del cromoióforo situadas a 611 nm y 661.5 nm, y la forma básica situada a 542.5 nm (**Figura 2. 15**).

Un aumento en la concentración de ión potasio en la disolución provoca la entrada de éste en la membrana y la desprotonación del cromoióforo mediante un mecanismo de intercambio catiónico. Como la banda de absorción a 660 nm de la forma ácida presenta la máxima sensibilidad, se seleccionó ésta como la longitud de onda de trabajo, por lo que más adelante se utilizó un láser a 670 nm como fuente de luz para caracterizar el sensor integrado. Así pues, un aumento de la concentración de analito provoca una disminución en la señal obtenida a 670 nm. Se realizaron experimentos para determinar las características de respuesta de las membranas frente a ión potasio y se optimizó la composición del tampón, su pH y su concentración [28]. Utilizando un tampón *acetato de magnesio/ácido acético 0.05 M* se comprobó que al aumentar el pH de éste, el intervalo de respuesta lineal se desplazaba a concentraciones menores de ión potasio y que las condiciones ideales para obtener un *intervalo lineal* de respuesta entre las concentraciones  $1 \times 10^{-4}$ - $1 \times 10^{-2}$  M de potasio correspondían a un valor de  $pH=5.55$ . Éste permite obtener un buen coeficiente de regresión ( $r = 0.9996$ ) en el intervalo de concentraciones deseado con una alta *sensibilidad* ( $-0.098$  UA/dec). La **Tabla 2. 2** muestra los resultados de los calibrados obtenidos entre los valores de  $pH=4.25-7.05$ .



**Figura 2. 15:** Variación del espectro de absorción del cromoionóforo comercial ETH 5294 (derivado del colorante Nile Blue), en función de la concentración de ión potasio. Tampón acetato de magnesio/acético 0.05 M a pH=5.05.

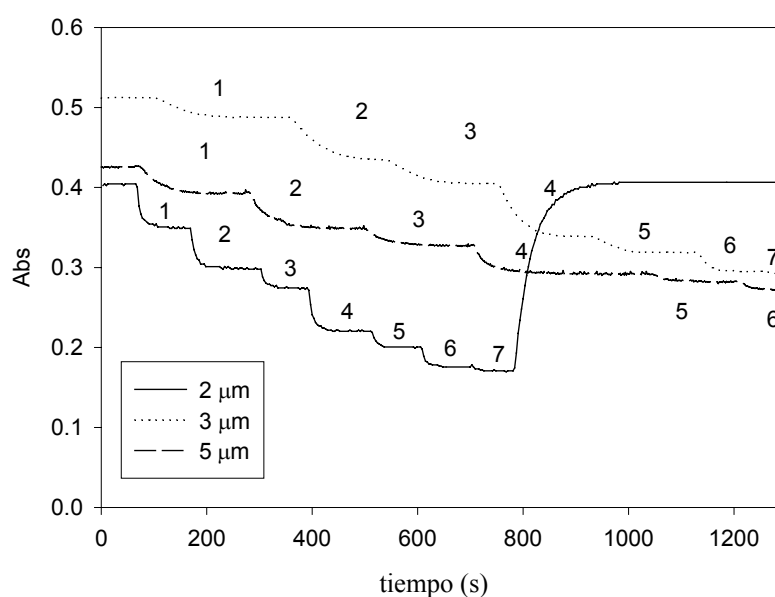
El *tiempo de respuesta* de los sensores de matriz tridimensional depende del tiempo que se tarda en alcanzar al equilibrio entre la disolución acuosa y el interior de la membrana. Excepto en membranas muy delgadas, el paso que determina la velocidad es el proceso de difusión del analito. El hecho de seguir la respuesta frente a ión potasio a una determinada longitud de onda y en continuo, permite observar el tiempo necesario para llegar a la respuesta del estado estacionario y calcular el tiempo de respuesta al 90%, mediante el ajuste de una función exponencial en cada salto de concentración. Para comprobar la dependencia del tiempo de respuesta respecto del grosor de la membrana se compararon los resultados obtenidos con membranas de tres espesores distintos.

**Tabla 2. 2:** Resultados de los calibrados obtenidos con una misma membrana selectiva de ión potasio para diferentes valores de pH de la disolución tampón acético/acetato 0.05 M en el intervalo de respuesta lineal.

pH	I.L.(M)	r	pendiente (UA/dec)
4.25	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-1}$	0.9999	-0.073
5.05	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.9937	-0.070
5.25	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.9982	-0.093
5.55	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.9996	-0.098
6.05	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.9983	-0.089
6.15	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.9979	-0.085
6.25	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-2}$	0.9970	-0.082
6.35	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	0.9715	-0.113
6.45	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	0.9742	-0.142
6.65	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	0.9571	-0.152
7.05	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	0.9455	-0.164

En primer lugar, se realizó un diseño experimental (plan factorial de cuatro factores a dos niveles  $2^4$ ) para optimizar los parámetros de deposición de las membranas que determinan su espesor por la técnica de rotación controlada o *spin-coat*. Los factores variables fueron la velocidad ( $v$ ) y aceleración de rotación ( $a$ ) del soporte, la viscosidad del cóctel y el volumen total de cóctel ( $V$ ) adicionado sobre el soporte de vidrio giratorio. El grosor de las capas depositadas sobre vidrio se determinó mediante *interferometría IR* [29] con un espectrofotómetro FTIR de alta resolución entre  $4000$  y  $500\text{ cm}^{-1}$ , realizando la media de 200 barridos y teniendo en cuenta un índice de refracción de la membrana de 1.54 (valor obtenido con un *refractómetro ABE*). Se compararon los resultados con los obtenidos en el Instituto de Ciencias de los Materiales (ICMAB) mediante la técnica de *elipsometría* [30] y se estableció la función de dependencia del grosor en función de la velocidad de rotación del soporte giratorio, manteniendo los demás parámetros constantes ( $100\text{ mL THF}$ ,  $a=20\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$  y  $V=100\mu\text{L}$ ). Esta función permitirá preparar membranas del grosor deseado modificando tan solo la velocidad de rotación del soporte.

Se depositaron tres membranas a velocidades de rotación distintas y se obtuvo el grosor por interpolación a la curva de respuesta obtenida anteriormente. Se realizaron diversos calibrados con cada una de ellas a la longitud de onda de  $670\text{ nm}$  y se calculó el tiempo de respuesta al 90% en cada salto de concentración (**Figura 2. 16**).



**Figura 2. 16:** Registros en flujo continuo de tres membranas de grosores diferentes obtenidos en las mismas condiciones de tampón acético/acetato  $0.05\text{ M}$  a  $\text{pH} = 5.55$ , mediante un espectrofotómetro de doble haz UV- Vis- NIR (Shimadzu UV-3101PC) a  $\lambda = 670\text{ nm}$ . (1):  $1 \times 10^{-4}\text{ M}$ , (2):  $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ , (3):  $1 \times 10^{-3}\text{ M}$ , (4):  $5 \times 10^{-3}\text{ M}$ , (5):  $1 \times 10^{-2}\text{ M}$ , (6):  $5 \times 10^{-2}\text{ M}$ , (7):  $1 \times 10^{-1}\text{ M}$ .

Los tiempos de respuesta calculados se resumen en la **Tabla 2. 3**. Como era de esperar, se puede generalizar que el tiempo de respuesta aumenta al aumentar el grosor de la membrana y



disminuye cuanto mayor es la diferencia de concentraciones entre la membrana y la disolución. Respecto a esta última observación, al aumentar el gradiente de concentración mayor es la velocidad de difusión de los iones. Por otro lado, cuando el cambio de concentración tiene el sentido de más a menos concentrado, se observa un retraso en el tiempo de respuesta, seguramente por ser más difícil el lavado de la membrana y de la celda de flujo.

**Tabla 2. 3:** Tiempos de respuesta calculados mediante el ajuste de una función exponencial, en cada salto de concentración, para las tres membranas de grosor diferente.

[K <sup>+</sup> ] (M)	tr <sub>90%</sub> (min)		
	2 μm	3 μm	5 μm
1x10 <sup>-4</sup>	0.62	2.24 ± 0.71	2.83 ± 1.24
5x10 <sup>-4</sup>	0.82	2.55 ± 0.55	3.00 ± 1.20
1x10 <sup>-3</sup>	0.62	2.57 ± 0.62	2.74 ± 0.88
5x10 <sup>-3</sup>	0.78	1.88 ± 0.69	2.26 ± 0.61
1x10 <sup>-2</sup>	0.90	1.78 ± 1.00	1.65 ± 0.53

Con el objetivo de validar las características diferenciales del nuevo transductor óptico, se depositaron siempre membranas de espesores cercanos a 4 μm. Así pues, el tiempo de respuesta medio de las membranas desarrolladas fue del orden de 2 minutos.

El *tiempo de vida* de la membrana determina el tiempo de uso de ésta sin que se pierdan sus características de respuesta. Por lo general, las membranas resguardadas de la luz y del contacto con una disolución acuosa se degradaban más lentamente. El tiempo de vida viene marcado básicamente por el número de veces que se utilizaba la membrana. Se observó que por cada calibrado efectuado, la pendiente de la curva de calibración disminuía alrededor de un 10% debido a la fotodescomposición del cromoionóforo o a la exudación de alguno de los componentes de la membrana. Este hecho quedó demostrado evaluando el tiempo de vida de membranas aisladas de la luz y mantenidas en un medio seco, que duraron hasta 40 días manteniendo invariables sus características de respuesta. Así, aunque las membranas presentan un grado de reversibilidad aceptable, su utilización en medidas en continuo es limitada dependiendo de las condiciones de almacenamiento.

### 2.2.2 CARACTERIZACIÓN DEL SENSOR DESARROLLADO

Para construir los sensores integrados selectivos de iones es necesario activar la zona de guía cortada depositando una membrana de reconocimiento selectivo. Es de gran importancia que el material de soporte utilizado para la construcción de esta membrana sea compatible con la superficie del transductor desarrollado. El tipo de membrana plastificada (hidrofóbica), utilizado para la validación de la respuesta del sensor, no tiene una buena adherencia a la superficie de silicio de la estructura multicapa que constituye el transductor. Para minimizar este problema fue necesario silanizar la superficie de éste. Previo acoplamiento de las fibras y las guías, se silanizaron los chips transductores en un reflujo de una mezcla de tolueno y silano

90:10 durante cinco horas. Posteriormente se lavaron con acetona y se secaron a 40 °C. En cambio, el proceso de silanización utilizado para los transductores ya acoplados a las fibras ópticas, consistió en la deposición sucesiva de tres alícuotas de 20 µL de la mezcla de tolueno y silano sobre la superficie, en una atmósfera seca. Posteriormente se secaron a 40 °C durante una hora y finalmente se lavaron con acetona.

### 2.2.2.1 Optimización del grosor de la membrana: señal y pérdidas

Tal y como se ha comentado anteriormente, la membrana óptica cumple con dos funciones fundamentales en la estructura del sensor. Por un lado, actúa de región sensora selectiva a un determinado analito y por otra, de medio de guiado de luz a través de la zona de guía cortada. Por esta razón es de gran importancia tener un control estricto del espesor de las membranas depositadas sobre la zona de guía cortada.

Para evaluar las pérdidas de radiación que se obtienen en función del grosor de la membrana, se silanizaron once dispositivos diferentes, que incluían tres conjuntos de guías cortadas de 0.5 mm de longitud. Se depositaron 20 µL de un cóctel sensor (misma relación polímero/plastificante que la membrana de validación) a diferentes velocidades de rotación del sustrato (800-2000 rpm). El espesor óptimo para obtener las mejores condiciones de confinamiento de luz es teóricamente de 4 µm. Se depositó un cóctel polimérico idéntico al utilizado en la caracterización espectroscópica de las membranas, diluido en 1.5 mL de THF, fijando una aceleración de rotación de 20 m·s<sup>-2</sup> durante un tiempo de rotación de 30 s.

Para determinar el espesor de las capas depositadas se utilizó un *perfilómetro* debido a la imposibilidad de medirlas mediante la técnica interferométrica, y los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante la técnica de *microscopía confocal* [38, 39]. Las membranas depositadas a velocidades entre 1000 y 1500 rpm dieron grosores entre 1.5 y 0.5 µm y las membranas depositadas a velocidades de entre 500 y 800 rpm dieron valores de entre 3 y 1.5 µm.

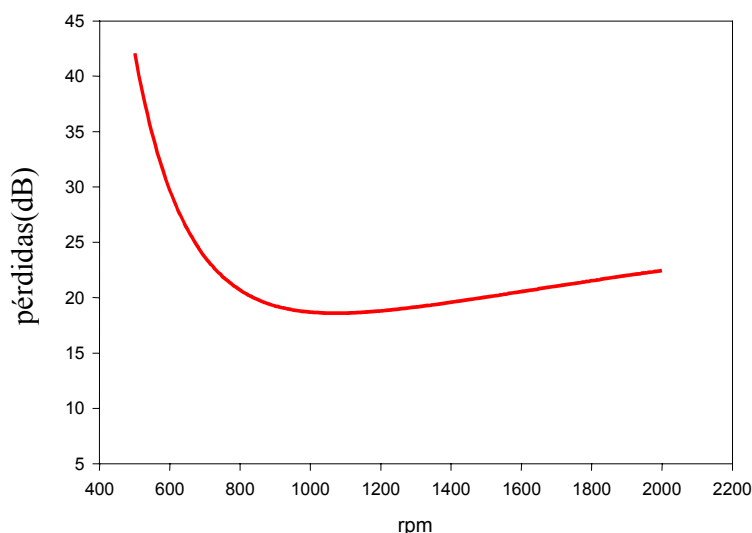
Para medir las pérdidas de luz en decibelios (dB) se relaciona la potencia de entrada de la guía respecto de la de salida mediante la expresión,  $1 \text{ dB} = 10 \log P_2/P_1$ , en la que  $P_2$  y  $P_1$  son la potencia de salida y la de entrada respectivamente.

Se evaluaron las pérdidas de las tres zonas de guía cortada de cada dispositivo y se promedió el resultado para estimar las pérdidas de cada deposición. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 2. 4**. Se ajustó una curva con todos los valores obtenidos para hallar la velocidad a la que se observan las mínimas pérdidas de luz (**Figura 2. 17**). A pesar de la alta dispersión de los resultados, debida seguramente a las irregularidades en las membranas, se pudo concluir que los cócteles depositados a 800 rpm eran los que daban membranas de grosor más cercano al valor ideal de 4 µm, porque eran las que ofrecían menores pérdidas de luz. A velocidades mayores que 1000 rpm se obtenían grosores menores y las membranas tenían muchas pérdidas de inserción de la luz desde la guía de entrada a la membrana. En cambio, a velocidades menores

que 800 rpm se obtenían espesores de membrana superiores, que daban problemas de confinamiento de luz de la membrana a la guía de recogida.

**Tabla 2. 4:** Pérdidas de luz por la zona de la guía cortada, en función de la velocidad de deposición de las membranas

Dispositivo	velocidad (rpm)	Pérdidas (dB)
1	2000	24.45 ± 8.60
2	1500	21.65 ± 7.32
3	1500	21.65 ± 7.32
4	1000	14.97 ± 4.36
5	1000	14.97 ± 4.36
6	800	14.10 ± 3.68
7	800	14.10 ± 3.68
8	800	17.46 ± 3.37
9	700	34.74 ± 4.35
10	600	36.62 ± 4.67
11	500	34.59 ± 3.52



**Figura 2. 17:** Gráfico que relaciona las pérdidas de luz obtenidas en función de la velocidad de rotación del soporte, de membranas depositadas por rotación controlada sobre diferentes dispositivos.

En la primera fase de desarrollo, los chips transductores que iban a ser utilizados para desarrollar los sensores ópticos ya estaban acoplados a las fibras ópticas de manera irreversible. Ésta integración, que por una parte simplificaba el proceso de medida, no permitía el proceso de deposición de las membranas por la técnica de rotación controlada. Así pues, para obtener membranas delgadas por simple evaporación del solvente, fue necesario diluir los cócteles poliméricos originales. Se depositaron volúmenes de 20  $\mu\text{L}$  de diversos cócteles diluidos entre un 25 y un 75 % en THF, simulando una técnica serigráfica (*screen-printing*).

Con un cóctel diluido al 50 % se obtuvo un funcionamiento próximo al óptimo y se evaluaron pérdidas de entre 5 y 10 dB, por lo que se tomó este método de deposición como válido para activar los dispositivos con membranas poliméricas. Conociendo las limitaciones que conllevaba este tipo de deposición, quedó pendiente una modificación tecnológica del sensor que permitiera depositar las membranas por otras técnicas más reproducibles. Este propósito, que se llevó a cabo en la fase de construcción de un prototipo de sensor integrado como plataforma versátil para la detección de iones en agua, se describirá más adelante.

#### **2.2.2.2 Evaluación de las características de respuesta de la membrana selectiva de ión potasio usando el nuevo dispositivo integrado**

Para convertir la medida de potencia que se obtiene con el sensor, en una medida de absorbancia, comparable con la suministrada por la configuración convencional, es necesario realizar un blanco que relacione la potencia de salida y la de entrada. Para ello se tomó un blanco antes de realizar cada experimento en condiciones en las que la membrana se encontraba en el mínimo de absorbancia ( $\text{NaOH } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ), es decir, cuando el cromoióforo se encontraba totalmente desprotonado. Este valor se toma como la máxima potencia que se detectará a la salida del sensor. Conviene que sea lo mayor posible porque dependiendo del valor del blanco se obtendrán variaciones totales de absorbancia mayores.

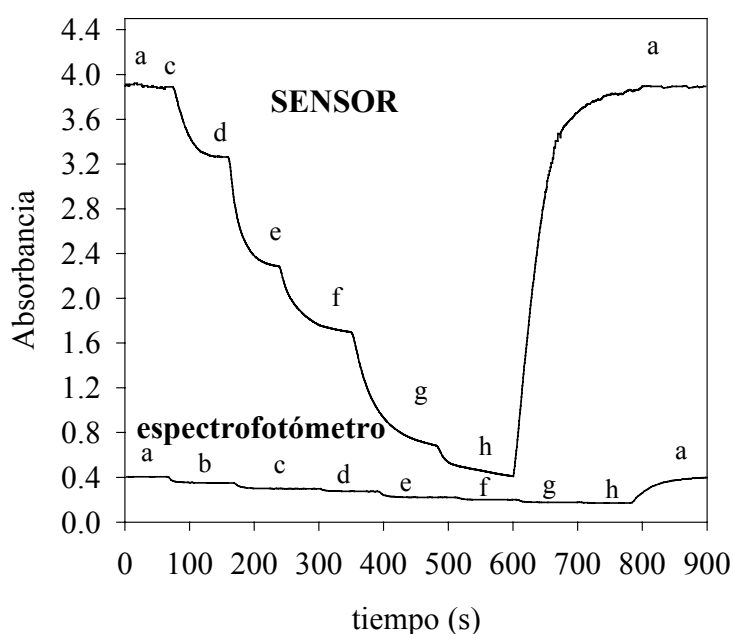
La potencia detectada depende de la cantidad de luz absorbida, pero también de la potencia emitida por la fuente de luz. A pesar de que por esta razón interesa que la fuente tenga una gran potencia de emisión, por otro lado esto provoca una rápida fotodescomposición del cromoióforo. En este sentido, el control y regulación instrumental de la potencia de la fuente de luz es de gran importancia.

Para validar la respuesta del nuevo sensor con la membrana, previamente estudiada en una configuración convencional, se realizaron calibrados en las mismas condiciones experimentales. Los diferentes patrones de potasio se prepararon en una disolución tampón acético/acetato 0.05 M a  $\text{pH}=5.55$  y se siguió la respuesta de la membrana a la longitud de onda del láser emitiendo a 670 nm. Características analíticas como la *selectividad* y el *intervalo lineal de respuesta* dependen de la composición de la membrana y no de la configuración en la que ésta se evalúe, por lo que se asumió que éstas no debían variar. Se estudiaron otros parámetros como la *sensibilidad*, en el mismo rango lineal de concentraciones, el *tiempo de respuesta* y el *tiempo de vida* del dispositivo. Estos últimos parámetros sí se pueden ver influidos por la nueva configuración plana del sensor y por la instrumentación utilizada.

#### ***Sensibilidad y tiempo de respuesta como características diferenciales del nuevo sensor***

Para poder comparar adecuadamente tanto la sensibilidad como el tiempo de respuesta de ambas configuraciones, se estudiaron los resultados obtenidos con membranas de un espesor de 4  $\mu\text{m}$ , en el caso de utilizar la configuración convencional, que incluye dos membranas en cada

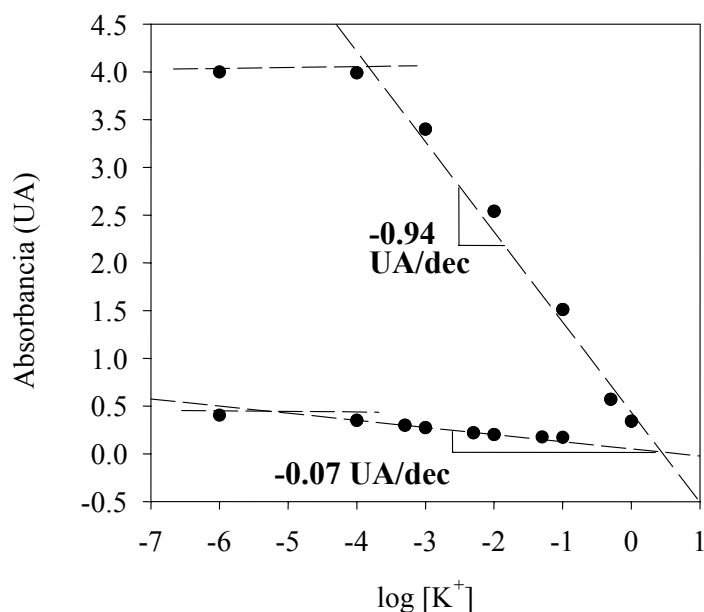
celda de flujo, y de 4  $\mu\text{m}$  en el caso de utilizar el sensor. Este hecho implica tener en cuenta que la configuración convencional, tiene un camino óptico igual a dos veces el grosor de cada membrana (8  $\mu\text{m}$ ). Los calibrados obtenidos a la misma longitud de onda demostraron una clara diferencia en cuanto a sensibilidad entre ambas configuraciones (**Figura 2. 18**). En la caracterización de las membranas, utilizando la configuración convencional en una celda de flujo, se obtuvo una variación total de absorbancia de 0.4 UA, para una variación de concentraciones de potasio entre  $1 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-1}$  M. En las mismas condiciones y utilizando el sensor, se obtuvo una variación total de hasta 4 UA, modificándose ligeramente el rango dinámico de trabajo ( $1 \times 10^{-4}$ -1 M). Este hecho demostraba que gracias a la nueva configuración se puede mejorar considerablemente la sensibilidad respecto a los sensores de absorbancia desarrollados hasta el momento, debido al largo camino óptico definido por la zona de guía cortada.



**Figura 2. 18:** Comparación de los calibrados obtenidos en las mismas condiciones con ambas configuraciones a  $\lambda = 670$  nm. a: tampón acético/acetato 0.05 pH=5.55, b:  $1 \times 10^{-5}$  M, c:  $1 \times 10^{-4}$  M, d:  $1 \times 10^{-3}$  M, e:  $1 \times 10^{-2}$  M, f:  $1 \times 10^{-1}$  M, g:  $5 \times 10^{-1}$  M, h: 1 M

Considerando un mecanismo de intercambio catiónico entre la membrana y la disolución y ajustando los resultados experimentales a la curva teórica de respuesta, es posible obtener la constante de extracción del sistema.

La **Figura 2. 19** muestra las curvas de calibración obtenidas experimentalmente. Se puede observar claramente el incremento de sensibilidad obtenido al utilizar el sensor, ya que la pendiente de la recta de calibración (UA/dec) en el rango dinámico de respuesta se multiplica en más de diez veces.



**Figura 2. 19:** Respuesta de la membrana en función de la concentración de potasio obtenida con ambas configuraciones a 670 nm y en las mismas condiciones experimentales. Tampón acético/acetato 0.05 M a pH =5.5.

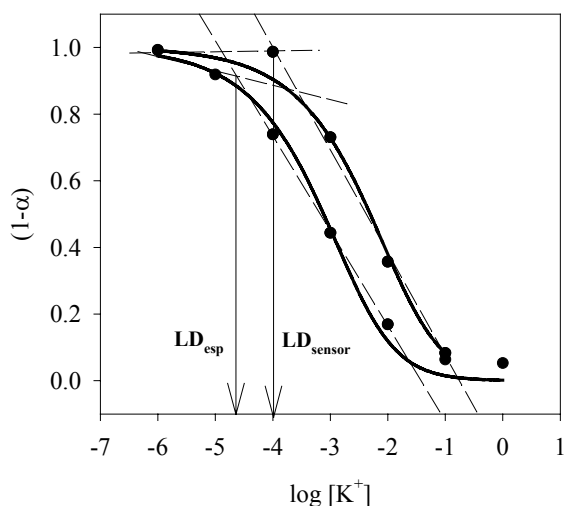
La **Figura 2. 20** muestra las curvas teóricas obtenidas al normalizar la respuesta mediante el parámetro  $\alpha$  para proceder al cálculo de las constantes de extracción. El buen ajuste de los resultados experimentales demostró el cumplimiento del mecanismo de intercambio catiónico supuesto para esta membrana (§ 1.3.2.1).

Los resultados obtenidos probaron que una de las ventajas que ofrece el uso de la nueva configuración es el incremento de la sensibilidad sin necesidad de aumentar la concentración de cromóforo de la membrana, posibilidad que vendría limitada por su solubilidad, y sin aumentar el grosor de ésta, lo que provocaría un incremento del tiempo de respuesta.

Los sensores evaluados en este trabajo tenían una longitud de guía cortada de 500  $\mu\text{m}$ . Esta longitud aún podría incrementarse dentro de unos límites marcados por un mínimo de pérdidas de inserción de luz en la guía de recogida. Los estudios previos de caracterización óptica de las guías de onda pronosticaron la posibilidad de construir sensores de hasta 1000  $\mu\text{m}$  de longitud de guía cortada sin que ello supusiera grandes pérdidas de luz, por lo que sería posible incrementar aún más la sensibilidad.

A continuación se procedió a comprobar que, de acuerdo con las previsiones teóricas descritas en el apartado anterior (véase § 2.1.2.2), el incremento de sensibilidad no provocaba como contrapartida un incremento inaceptable del tiempo de respuesta. Para ambas configuraciones y en idénticas condiciones experimentales, se determinó el tiempo de respuesta de las membranas, ajustando una función exponencial a cada salto de concentración, obtenido al realizar un calibrado. Los resultados mostraron como el cambio en unidades de absorbancia

conseguido para cada salto de concentración se multiplicaba al utilizar el sensor, mientras que el tiempo de respuesta permanecía equivalente en ambas configuraciones, señal inequívoca de que el grosor de las membranas utilizadas era similar. Cabe señalar que en la configuración convencional existen dos membranas de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, mientras que el sensor integra una sola membrana de 4  $\mu\text{m}$ , por lo que el aumento de sensibilidad conseguido con este último es aún más notorio.



**Figura 2. 20:** Curvas de calibración teóricas de la membrana selectiva de potasio obtenidas a 670 nm con ambas configuraciones. El ajuste de los resultados experimentales se obtuvo mediante la ecuación 10 para cationes monovalentes ( $a = 2$ ,  $b = 1$ ).

**Tabla 2. 5:** Comparación de las características de respuesta de una membrana testada en una configuración convencional o con el nuevo sensor.

salto de concentración (M)	salto de absorbancia (UA)		tiempo de respuesta <sup>a</sup> ( $t_{90\%}$ min)	
	configuración convencional	sensor	configuración convencional	sensor
tampón- $10^{-5}$	0.008	0	0.97	-
$10^{-5}$ - $10^{-4}$	0.009	0.049	0.85	-
$10^{-4}$ - $10^{-3}$	0.021	0.628	1.20	0.29
$10^{-3}$ - $10^{-2}$	0.018	0.976	1.17	0.16
$10^{-2}$ - $10^{-1}$	0.009	0.642	1.00	0.52
$10^{-1}$ - $5 \times 10^{-1}$	0.001	1.010	0.43	0.54
1- tampón	0.062	3.490	11.13	1.76

### Tiempo de vida

El *tiempo de vida* de los sensores depende por un lado del tiempo de vida de la membrana y por otro, del tiempo de vida del dispositivo transductor como tal. Utilizando la técnica convencional, se pudo comprobar que el tiempo de vida de las membranas está limitado por la continua exudación de sus componentes y por la fotodescomposición del cromoionóforo. En el caso de utilizar el sensor, la fotodescomposición del cromoionóforo debida a la irradiación es aún más acusada, ya que la luz transmitida a través de las guías de onda proporciona una mayor

densidad de energía óptica a la membrana. La estrategia que se utilizó para conseguir reducir la fotodescomposición de los reactivos a lo largo del trabajo consistió en reducir drásticamente la potencia de luz introducida, y conseguir la máxima señal midiendo la radiación de la salida del sensor a la máxima ganancia del detector.

Por otro lado, se comprobó que el tiempo de vida del dispositivo dependía en gran parte del número de veces que se silanizaba la superficie del chip transductor. Parece ser que los polímeros utilizados para la fijación de las fibras y las guías eran poco estables al continuo ataque de los reactivos de silanización y a la temperatura del proceso. Se observó un reblandecimiento de los polímeros que acababa provocando la desalineación de fibras y guías, e incluso en algunos casos, el levantamiento de la capa de polímero, imposibilitando el funcionamiento del sensor.

Tras la validación conceptual del sensor realizada con la membrana de potasio, se procedió a explotar la potencialidad de éste. En primer lugar, se estudiaron nuevas membranas con el objetivo de optimizar la etapa de reconocimiento selectivo. Así mismo, se caracterizó una nueva familia de indicadores de pH sintetizados en el Grup de Sensors i Biosensors (GSB), de alta sensibilidad y gran potencial para su uso como cromoforos sensibles en la zona NIR en membranas selectivas de iones. Su uso permitiría ampliar el rango de componentes ópticos de gran consumo y fácil accesibilidad utilizables en la construcción de sensores. Finalmente, se diseñó una nueva configuración de sensor que permitiera la obtención de una plataforma general de medida sobre la que se ubicarían transductores ópticos intercambiables. La deposición de las membranas selectivas sobre estos transductores podría realizarse de forma simple, automática y reproducible, mediante técnicas fotolitográficas o serigráficas.

### **2.3 CARACTERIZACIÓN DE REACTIVOS DE RECONOCIMIENTO IÓNICO EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS Y SOL-GEL**

Una de las posibilidades existentes para mejorar las características de respuesta de los optodos de configuración convencional es la utilización de cromoforos que presenten bandas de absorción en la zona del espectro NIR. En sentido estricto, sería preferible que la posición de dichas bandas permitiera aprovechar los componentes ópticos activos desarrollados por la tecnología óptica para comunicaciones. Un ejemplo de estos serían las fuentes de radiación monocromática miniaturizadas de alta intensidad y bajo coste (láseres de diodo). Para incrementar la sensibilidad, los cromoforos deberían además presentar bandas de absorción muy intensas, lo que implicaría tener una elevada absorptividad molar.

Como ventaja adicional, y a diferencia del intervalo UV-Vis, muy pocos compuestos naturales absorben en la zona NIR del espectro electromagnético. Por esta razón, si el dispositivo sensor está basado en medidas de transmitancia convencionales, el uso de compuestos sensibles en este rango del espectro reduciría drásticamente las interferencias debidas a la matriz de la muestra.



La limitación que se plantea para aprovechar estas ventajas es la inexistencia de cromoionóforos de pH comerciales sensibles entre 780 nm y 2000 nm. Para abordar este problema, el Grup de Sensors i Biosensors abrió una línea de investigación dirigida al diseño y a la síntesis de nuevos colorantes ácido/base (compuestos cianínicos), con propiedades ópticas en la zona NIR.

En este trabajo se estudiaron las características de respuesta de dos familias de cianinas, incorporadas en distintos soportes, para su potencial utilización como elementos de reconocimiento en los nuevos sensores integrados. Por un lado, se estudió el comportamiento de heptametincianinas en distintos soportes (membranas poliméricas de PVC y en matrices sol-gel) con el objetivo de mejorar y optimizar su deposición sobre el sensor integrado. Tras los resultados obtenidos y la imposibilidad de obtener membranas de un espesor de 4  $\mu\text{m}$  con la técnica sol-gel, se evaluó, solamente en membranas poliméricas de PVC, una familia de cetocianinas, de propiedades espectroscópicas prometedoras como indicadores de pH.

### *2.3.1 COMPUESTOS CIANÍNICOS COMO INDICADORES DE PH*

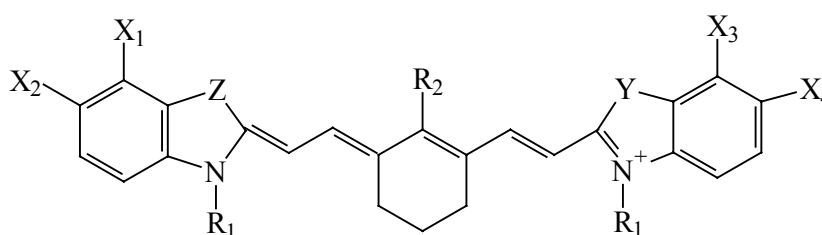
Los compuestos cianínicos son los colorantes sintéticos más antiguos que se conocen. Su principal característica es que pueden cubrir un gran rango espectral dependiendo de la longitud de su cadena polimetínica [33]. Abarcan desde la zona UV-Vis, hasta el infrarrojo cercano (NIR) presentando bandas de absorción estrechas e intensas. Las cianinas evaluadas en este trabajo son sales de amonio cuaternario en que dos átomos de nitrógeno están unidos a través de una cadena polimetínica, de manera que se produce una deslocalización electrónica a través del sistema de dobles enlaces conjugados. Una serie viníloga de estos colorantes está integrada por una familia de compuestos de idéntica estructura que difieren en el número de grupos vinilo - (CH=CH)- de la cadena metínica. En estas series se ha observado que el máximo de absorción se desplaza a longitudes de onda superiores al aumentar la cadena metínica (generalmente unos 100 nm por grupo vinilo en las cianinas simétricas).

Debido a que la carga positiva no puede localizarse en uno de los átomos de nitrógeno de la estructura, es difícil establecer una nomenclatura. El método más conveniente es el propuesto por Beilstein [34] en el que se indica el nombre de los núcleos heterocíclicos entre paréntesis y luego se indica la longitud de la cadena por mono-, tri-, penta-, etc., metincianina. Los colorantes sintetizados en el GSB, y que en este trabajo fueron caracterizados en membranas poliméricas y sol-gel, son heptametincianinas (contienen siete átomos de carbono entre los dos heterociclos). Este hecho, entre otros factores, tales como el sistema cromóforico y los grupos terminales, determina la longitud de onda de máxima absorción, por lo que todas presentan bandas entre 680 y 800 nm.

Se encuentran descritas en la bibliografía numerosas cianinas simétricas con grupos terminales heterocíclicos [42-51], pero pocas de ellas han derivado en cromoionóforos para el desarrollo de sensores ópticos [52-54]. La causa de ello es su baja estabilidad o poca solubilidad en los

plastificantes normalmente utilizados para este fin. Para mejorar su estabilidad térmica y fotoquímica, se puede introducir diferentes modificaciones en su estructura. Se ha incorporando parte de la cadena metínica en uno o más anillos alicíclicos, que pueden contener heteroátomos o grupos heteroatómicos (O, S, NMe<sub>2</sub>), lo que provoca pequeños cambios de posición de las bandas de absorción [48]. También se ha intentado incrementar su estabilidad introduciendo complejos de Ni u otros metales en la composición de las membranas [56-59].

Una propiedad que poseen las cianinas es la posibilidad de modular la longitud de onda de absorción en función de la diferente sustitución de los grupos amino terminal, y particularmente, de los anillos heterocíclicos y sus sustituyentes [18], por lo que en el grupo de investigación se sintetizaron y testaron varias estructuras diferentes a fin de acercar  $\lambda_{\text{máx}}$  a la longitud de onda de emisión del láser de diodo (780 nm), que se utilizaría como fuente lumínica en el sensor integrado. A lo largo de este trabajo, se evaluaron dos familias de compuestos; las heptametincianinas [53] y las cetocianinas [54] cuya estructura general se muestra en las figuras **Figura 2. 21** y **Figura 2. 22** y los diferentes integrantes de cada una de ellas se muestra en las tablas **Tabla 2. 6** y **Tabla 2. 7** respectivamente. Las heptametincianinas se caracterizaron en dos soportes distintos, PVC y de sol-gel, mientras que las cetocianinas lo fueron solamente en PVC.



**Figura 2. 21:** Estructura general de las heptametincianinas evaluadas en matrices de PVC y sol-gel

**Tabla 2. 6:** Estructura química, sustituyentes e identificador de las heptametincianinas caracterizadas

Colorante	Sustituyentes
C1	X <sub>1</sub> = X <sub>2</sub> = X <sub>3</sub> = X <sub>4</sub> =H, Y=Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Cl
C2	X <sub>1</sub> = X <sub>3</sub> = H, X <sub>2</sub> = X <sub>4</sub> = COOH, Y= Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Cl
C4	X <sub>1</sub> = X <sub>2</sub> = X <sub>3</sub> = X <sub>4</sub> = H, Y= Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> =CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = SPhNH <sub>2</sub>
C9	X <sub>1</sub> = X <sub>3</sub> = H, X <sub>2</sub> = X <sub>4</sub> = OH, Y= Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = Cl
C11	X <sub>1</sub> = X <sub>3</sub> = H, X <sub>2</sub> = X <sub>4</sub> = COOH, Y= Z= S, R <sub>1</sub> = (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , R <sub>2</sub> = Cl
C20	X <sub>1</sub> = X <sub>3</sub> = H, X <sub>2</sub> = X <sub>4</sub> = NH <sub>2</sub> , Y= Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =Cl
C21	X <sub>1</sub> = X <sub>3</sub> = H, X <sub>2</sub> = X <sub>4</sub> = NHCOCH <sub>3</sub> , Y= Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> =CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =Cl
C22	X <sub>1</sub> = X <sub>3</sub> = OH, X <sub>2</sub> = X <sub>4</sub> = H, Y= Z= C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , R <sub>1</sub> =CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> =Cl

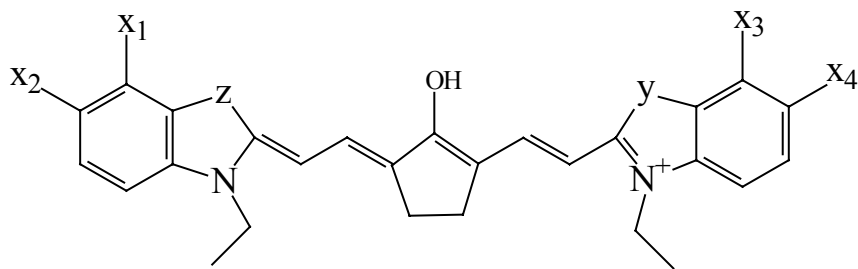


Figura 2. 22: Estructura general de las cetocianinas testadas en membranas de PVC.

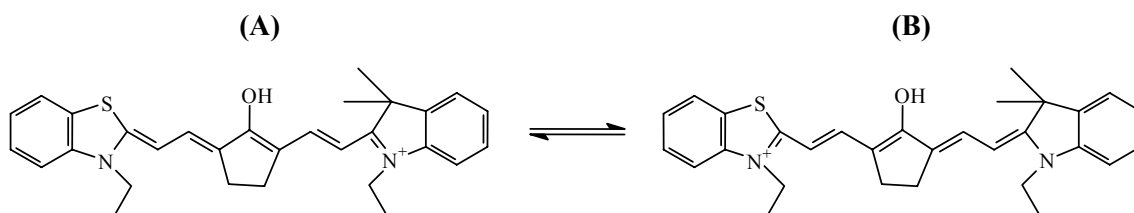
Tabla 2. 7: Estructura química, sustituyentes e identificador de cada uno de las cetocianinas caracterizadas

Colorante	Sustituyentes
5aa	$X_1 = X_2 = X_3 = X_4 = H, Y = Z = C(CH_3)_2$
5bb	$X_1 = X_3 = H, X_2 = X_4 = OH, Y = Z = C(CH_3)_2$
5cc	$X_1 = X_3 = H, X_2 = X_4 = NHCOCH_3, Y = Z = C(CH_3)_2$
5dd	$X_1 = X_2 = X_3 = X_4 = H, Y = Z = S$
5ee	$X_1 + X_2 = (-CH=CH-)_2, X_3 + X_4 = (-CH=CH-)_2, Y = Z = C(CH_3)_2$
5ff	$X_1 = X_3 = OH, X_2 = X_4 = COOC_2H_5, Y = Z = C(CH_3)_2$
5ab	$X_1 = X_2 = X_3 = H, X_4 = OH, Y = Z = C(CH_3)_2$
5ac	$X_1 = X_2 = X_3 = H, X_4 = NCOCH_3, Y = Z = C(CH_3)_2$
5ad	$X_1 = X_2 = X_3 = X_4 = H, Y = S, Z = C(CH_3)_2$
5ae	$X_1 = X_2 = H, X_3 + X_4 = (-CH=CH-)_2, Y = Z = C(CH_3)_2$
5bc	$X_1 = X_3 = H, X_2 = OH, X_4 = NCOCH_3, Y = Z = C(CH_3)_2$
5bd	$X_1 = X_2 = X_3 = H, X_4 = OH, Y = C(CH_3)_2, Z = S$
5be	$X_1 = H, X_2 = OH, X_3 + X_4 = (-CH=CH-)_2, Y = Z = C(CH_3)_2$
5cd	$X_1 = X_2 = X_3 = H, X_4 = NCOCH_3, Y = C(CH_3)_2, Z = S$
5ce	$X_1 = H, X_2 = NHCOCH_3, X_3 + X_4 = (-CH=CH-)_2, Y = Z = C(CH_3)_2$
5de	$X_1 + X_2 = (-CH=CH-), X_3 = X_4 = H, Y = S, Z = C(CH_3)_2$
7bc	$X_1 = X_3 = H, X_2 = OH, X_4 = NH_2, Y = Z = C(CH_3)_2$

Los sustituyentes del heterociclo provocan cambios de posición de la longitud de onda de máxima absorción [48] y el pKa del colorante [62, 63]. Grupos electroaceptores, sustituyentes conjugados y grupos halógeno, alcoxilo y alquilo en posiciones  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$  o  $X_4$ , provocan un aumento de  $\lambda_{m\acute{a}x}$ . Es posible correlacionar el pKa del indicador con las series de Hammett (carácter electrodonador-electroceptor del sustituyente) [41]. En el grupo de investigación se sintetizaron colorantes con bencenos adicionales y heterociclos fusionados como sustituyentes del cromóforo, con el mismo objetivo de acercar la posición de  $\lambda_{m\acute{a}x}$ , a 780 nm, pero en realidad los sustituyentes de la cadena polimetínica son los que provocan cambios espectrales más importantes en las cianinas. Dependiendo del efecto inductivo del sustituyente y de su posición en la cadena polimetínica ( $R_2$ ), se provoca un efecto batocrómico o hipsocrómico, e incluso en algunos casos se puede alterar la sensibilidad del colorante y su pKa. Grupos ciano, formil, y nitro en posiciones  $\alpha$ , disminuyen la longitud de onda del máximo de absorción, mientras que,

grupos alquilo, alcoxilo, alquiltio y halógeno, en posición  $\alpha$  desplazan la banda de absorción a longitudes de onda mayores.

Por otro lado, la conformación de los colorantes cargados, puede sufrir modificaciones en función de la polaridad del solvente y por lo tanto, también sus propiedades espectrales pueden variar dependiendo de la matriz en la que estén ocluidos o disueltos. Se observaron pocos cambios de  $\lambda_{\text{máx}}$  en función del plastificante utilizado para el desarrollo de membranas poliméricas, ya que éstos eran de polaridad parecida [57]. En general, cuanto menor es la polaridad del solvente utilizado, mayor es la absorptividad molar y mayor la longitud de onda del máximo de absorción [41]. Esta variación no se observó en el caso de utilizar matrices sol-gel, pero con los colorantes disueltos en membranas poliméricas se observó un desplazamiento batocrómico de  $\lambda_{\text{máx}}$  respecto de los valores obtenidos en disolución alcohólica. Siendo éste menos acusado en las cianinas simétricas que en las asimétricas. Las cianinas asimétricas suelen tener la longitud de onda del máximo de absorción desplazada a longitudes de onda menores que la media de los correspondientes colorantes simétricos. *Brooker et al.* discutieron este hecho en relación con la capacidad electrodonadora (basicidad) de los heterociclos que las componen en una serie de publicaciones [63, 65]. Los anillos heterocíclicos pueden dividirse en electrodonadores y electroaceptores y la utilización de unos u otros en estructuras asimétricas favorece la estabilidad de una determinada estructura resonante. Este hecho modifica sus propiedades indicadoras y sus características espectrales [41]. Los grupos que constituyen las cianinas evaluadas en este trabajo, favorecen la estructura resonante del heterociclo cargado más electrodonador (**Figura 2. 23B**).



**Figura 2. 23:** Estructuras resonantes de la forma enólica de una cetocianina asimétrica (5ad).

Otros factores que pueden alterar el comportamiento de un colorante son sus impedimentos estéricos. Cuantos más impedimentos estéricos tenga una molécula, más disminuirá su coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) y más se alterará su agregación o cristalización. Existe una relación lineal entre el aumento de impedimentos estéricos y la disminución de  $\epsilon$  y el aumento de  $\lambda_{\text{máx}}$  en cianinas simétricas, aunque en cianinas asimétricas  $\lambda_{\text{máx}}$  suele disminuir.

El espectro de absorción de las cianinas utilizadas en este trabajo se caracteriza por presentar hombros vibracionales a longitudes de onda inferiores a la longitud de onda del máximo de absorción correspondiente a la transición electrónica. En algunos casos, se observaron interacciones moleculares que producían grandes desviaciones de la forma y posición de las

bandas en el espectro. Esto es debido a que los colorantes son capaces de formar dímeros, trímeros, tetrámeros y agregados superiores, que a diferencia de los monómeros, pueden presentar bandas de absorción a longitudes de onda menores (bandas H, efecto hipsocrómico) o mayores (bandas J, efecto batocrómico) respectivamente [40, 66, 67]. Este efecto dependía básicamente de las cargas de los sustituyentes en el plastificante utilizado y se veía favorecido por el aumento de la concentración del colorante de las membranas.

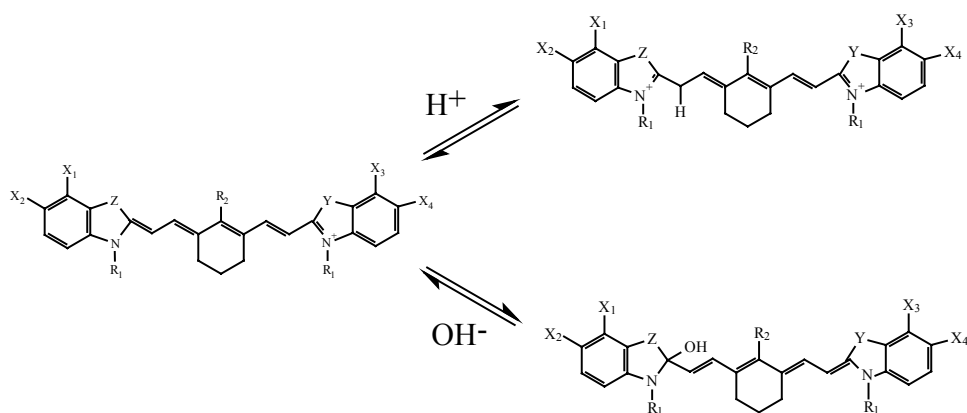
Por último, cabe explicar, que los sustituyentes del ión amidinio derivados de grupos alquilo de las cianinas caracterizadas, permiten solubilizar estas moléculas en los disolventes mediadores poco polares, utilizados en la construcción de las membranas poliméricas de PVC.

Como parte esencial de la caracterización de estos compuestos, en el GSB se estudió previamente el comportamiento ácido/base de estas moléculas en etanol y se calcularon sus valores de pKa. Se estudió también la solubilidad de estos compuestos en los plastificantes normalmente utilizados como disolventes mediadores de membranas poliméricas de PVC y se evaluó su absorptividad molar en forma ácida y básica en este medio [18].

### 2.3.1.1 Comportamiento ácido/base de los colorantes heptametincianínicos

Dependiendo de la acidez del medio [61], se observaron diferentes mecanismos de reacción en las heptametincianinas. En medio extremadamente ácido, un protón se enlaza al carbono de la cadena polimetínica que está directamente unido al heterociclo generando un carbono ácido. En cambio, en medio básico, el grupo hidroxilo ataca el carbono unido a la cadena polimetínica y al heterociclo. En ambos casos, se acorta el sistema conjugado, por lo que la estructura resultante presenta una banda de absorción a longitudes de onda inferiores.

En realidad, sólo interesaban los cambios producidos en medio básico, ya que las condiciones extremas en las que se genera un carbono ácido, provocan la descomposición del colorante. Así pues, para elegir la composición de las membranas, se tuvo en cuenta el equilibrio en medio básico que se ilustra en la **Figura 2. 24**.

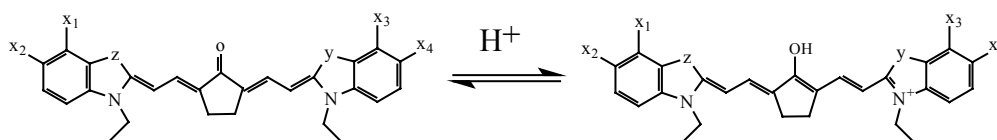


**Figura 2. 24:** Equilibrio ácido/base de las heptametincianinas evaluadas en función del pH del medio

Como puede observarse, desaparece la carga positiva de la estructura, por lo que no fue necesario incorporar aditivos iónicos en la membrana con el fin de compensar cargas y permitir las reacciones por el requerimiento de electroneutralidad.

### 2.3.1.2 Comportamiento ácido/base de los colorantes cetocianínicos

Esta familia de compuestos se caracteriza por contener un grupo ceto/enólico en posición R<sub>2</sub>, responsable de los cambios producidos en las bandas de absorción, en función del pH del medio [37]. Todas las cetocianinas evaluadas se encontraban en forma cetónica en los disolventes utilizados para preparar las membranas, por lo que el equilibrio que se propuso al acidificar el medio se ilustra en la **Figura 2. 25**. Como puede observarse, la formación del grupo enol genera una carga positiva en la molécula, que es necesario compensar mediante aditivos aniónicos para que se lleve a cabo la reacción en el medio membrana por requerimientos de electroneutralidad.



**Figura 2. 25:** Equilibrio ceto/enólico de las cetocianinas evaluadas

### 2.3.2 CARACTERIZACIÓN DE HEPTAMETINCIANINAS EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS Y SOL-GEL

Con el fin de obtener un dispositivo sensor optoquímico de aplicación comercial, se propuso mejorar las membranas utilizadas como matriz de soporte de los elementos de reconocimiento. Uno de los problemas que presentaban las membranas poliméricas como fase reactiva de los sensores desarrollados, era su deposición controlada y reproducible sobre la zona del dispositivo destinada al reconocimiento iónico, ya que es indispensable obtener espesores cercanos a las 4  $\mu\text{m}$  para conseguir un guiado óptimo de la luz hacia el detector y así, obtener una señal de alta sensibilidad. Para mejorar la técnica de deposición utilizada hasta el momento, que simula la deposición de capas delgadas por serigrafía, se decidió iniciar un estudio de nuevas matrices, que permitieran obtener capas de grosor controlado, y que a la vez, mantuvieran las propiedades ópticas de los indicadores inmovilizados. En concreto se construyeron y caracterizaron membranas sol-gel que incorporaban heptametincianinas como indicadores de pH. Previamente éstos colorantes habían sido caracterizados en matrices poliméricas. Una de las tareas de más trascendencia fue establecer una metodología de deposición, sencilla y reproducible de estas membranas sobre el dispositivo transductor. El trabajo de investigación se realizó en colaboración en el grupo de investigación del Prof. John D. Wright del Centro de Investigación de Materiales, de la Universidad de Kent (Canterbury, Inglaterra), que posee una gran experiencia en la construcción de materiales sol-gel para el

desarrollo de sensores ópticos. Los resultados no fueron satisfactorios y no dieron lugar a ninguna publicación, pero se presentan en ese formato en el Anexo II.

### 2.3.2.1 Caracterización de heptametincianinas en matrices poliméricas

Las membranas poliméricas plastificadas de PVC presentan una serie de características ventajosas para el desarrollo de sensores respecto a otros soportes. Por un lado, permiten la movilidad de moléculas e iones en su interior y por lo tanto, proporcionan tiempos de respuesta relativamente rápidos, teniendo siempre en cuenta que la interacción reactivo-analito se localiza en toda la matriz y no solamente en la superficie. Son uno de los soportes más utilizados para el desarrollo de sensores de configuración convencional, porque son ópticamente transparentes y la elección del plastificante permite modular la selectividad y la sensibilidad de la membrana. Además, permiten obtener de forma rápida y sencilla, membranas de un grosor determinado por técnicas reproducibles.

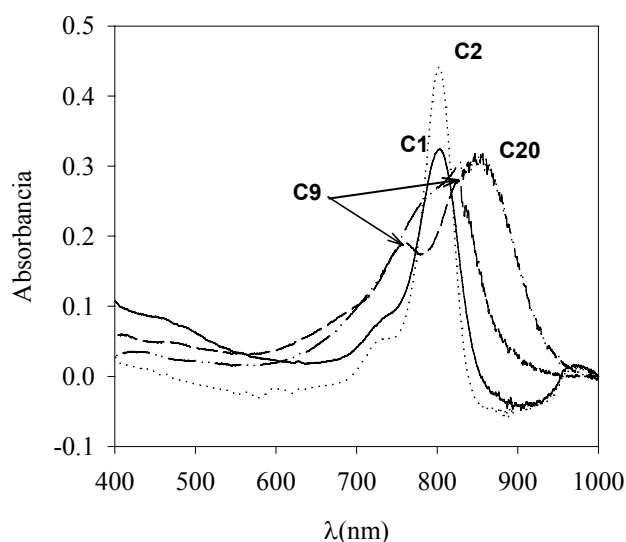
Por otro lado, el hecho de utilizar matrices poliméricas de PVC permite aprovechar el conocimiento acumulado en el desarrollo de membranas potenciométricas para electrodos selectivos de iones, de composición idéntica (exceptuando el componente cromoionofórico). En realidad, se utilizan los mismos portadores iónicos que en membranas potenciométricas para el desarrollo de sensores ópticos selectivos de iones [62].

En función de estas consideraciones, se decidió construir membranas de PVC incorporando las diferentes heptametincianinas. Para cada una de ellas se evaluaron sus características espectrales, sus propiedades ácido/base, su estabilidad y su solubilidad en fase membrana. Se escogió su composición basándose en el equilibrio propuesto en el apartado anterior (véase § 2.3.1.1.), suponiendo que, al interactuar con un ión hidroxilo en medio básico, desaparece la carga positiva deslocalizada entre los átomos de nitrógeno. Los cócteles sensores preparados resultaron ser perfectamente homogéneos, demostrando así la buena solubilidad de los colorantes en el disolvente orgánico utilizado (DOS), exceptuando aquellos que tenían grupos hidroxilo o carboxilo (C11, C22) unidos al heterociclo, que no fueron estables en la matriz, perdiendo su coloración característica. Lógicamente, las heptametincianinas disueltas en las membranas recién depositadas, mostraron un desplazamiento de los picos de absorción característicos de la forma ácida a longitudes de onda superiores (**Tabla 2. 8**). Este incremento, supuso un alejamiento del máximo de absorción de la longitud de onda de trabajo ideal del diodo láser (780 nm). También se observó la agregación inmediata del colorante C20 en la fase membrana, hecho reflejado en la aparición de un máximo de absorción a una longitud de onda superior correspondiente a una banda J. Seguramente, la agregación fue debida a la ionización de los grupos amino unidos al heterociclo (**Figura 2. 26**).

**Tabla 2. 8:** Longitud de onda del máximo de absorción de las heptametincianinas en disolución y en membranas poliméricas

colorante	$\epsilon_{\text{EtOH}} (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot 10^5$	$\lambda_{\text{EtOH}} (\text{nm})$	$\lambda_{\text{MEM}} (\text{nm})$
C1	2.27	788.5	794.0
C2	3.14	789.0	803.0
C4	2.40	791.5	802.5
C9	2.48	813.0	825.0
C11	2.16	804.0	-
C20	9.29	782.0	950.0
C21	2.51	814.5	830.0
C22	2.70	795.0	-

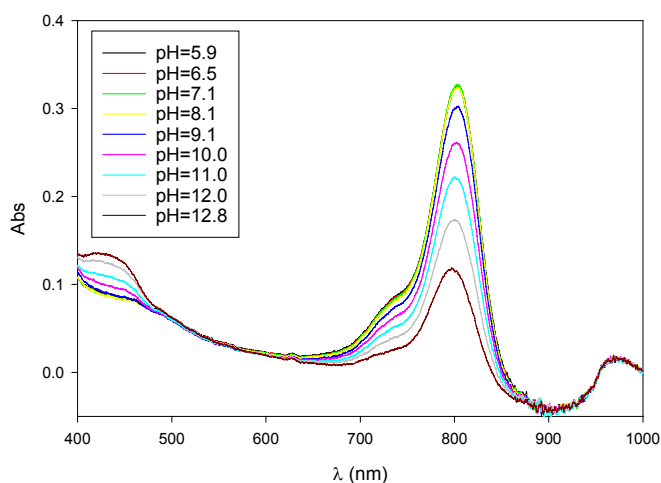
Por este mismo motivo, las heptametincianinas con grupos funcionales carboxílicos también agregaron (C11, C2) o exudaron de la membrana al variar el pH de la disolución. Se observó incluso la pérdida total de uno de los colorantes testados (C2) de la membrana al aumentar el pH de la disolución tampón. Por lo tanto, podría generalizarse la ineficacia de la sustitución de estas heptametincianinas con grupos funcionales capaces de ionizarse, ya que ninguna de las que en principio pareció estable en la membrana, demostró ser sensible a pH (C9, C21). En consecuencia, se desaprobó su posible utilización como indicadores de pH.

**Figura 2. 26:** Espectros de absorción de las membranas recién depositadas, que muestran tanto la agregación de alguna heptametincianina (C9, C20) como los máximos de absorción.

La heptametincianina C1, sin grupos potencialmente ionizables, mostró unas buenas características espectroscópicas frente a variaciones de pH, por lo que se estudió a fondo su respuesta como indicador de pH (**Figura 2. 27**). La banda de absorción correspondiente a la forma ácida (793 nm) disminuye de intensidad al aumentar el pH de la disolución tampón en contacto con la membrana. Simultáneamente, la banda correspondiente a la forma básica (430



nm) aumenta de intensidad, y se observa un solo punto isobéptico invariable a lo largo del ciclo de variación de pH (6-13).



**Figura 2. 27:** Espectros de absorción en función del pH de la disolución de la heptametincianina C1 en membrana polimérica.

No obstante, las curvas de calibración realizadas mostraron que incluso a valores de pH muy básicos no desaparece la forma ácida en su totalidad, lo que implica un importante desplazamiento del valor de pKa en la membrana polimérica. A pesar de la completa reversibilidad de la señal, todas las curvas de calibración indicaron histéresis, obteniéndose valores diferentes de pKa en función del sentido de variación de pH. Además, se calcularon tiempos de respuesta extremadamente largos ( $t_{90\%}=20$  min.) para cada salto de concentración, por lo que finalmente se renunció también a utilizar esta heptametincianina como indicador de pH en membranas poliméricas.

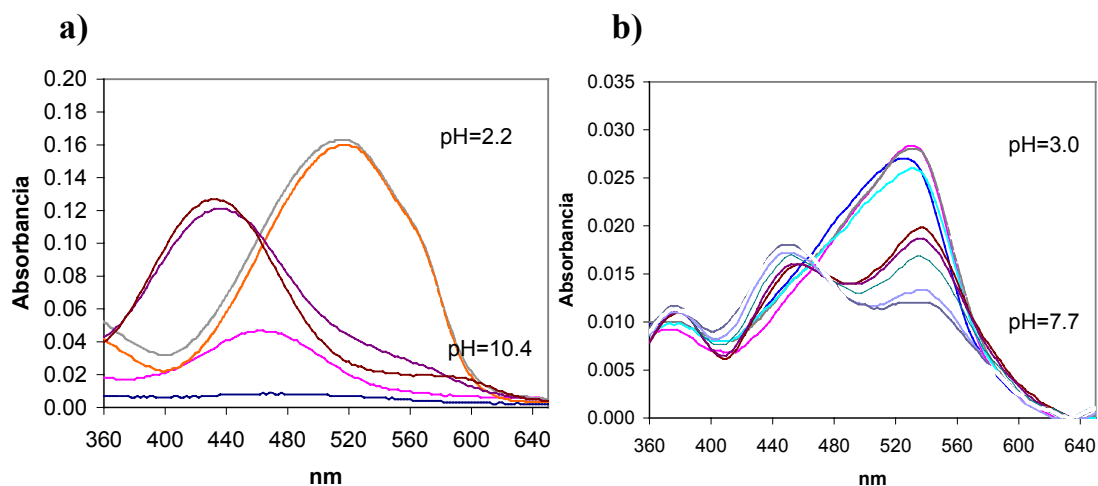
### 2.3.2.2 Caracterización de heptametincianinas en matrices sol-gel

Después de verificar el desfavorable comportamiento de las heptametincianinas disueltas en matrices poliméricas, se decidió iniciar un estudio de nuevos materiales para el desarrollo de membranas. En principio, las especies inmovilizadas en matrices sol-gel no deben modificar sus características espectroscópicas respecto de etanol, porque el medio envolvente es de polaridad muy parecida, por lo que este material pareció ser una buena alternativa a las matrices de PVC. Además, es compatible con la superficie del transductor del sensor óptico integrado y pueden diseñarse sistemas automáticos de deposición.

La tecnología sol-gel es muy versátil, pero requiere un estricto control de todos los parámetros de reacción para obtener un material de características determinadas. Por lo tanto, en primer lugar se estudió el efecto del cambio de precursor, de la temperatura de secado y del tiempo de reacción en soles que incorporaban un colorante comercial (Eriocromo R, ECR). Se halló una

composición óptima ( $r_{\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{TEOS}}$  4:7:1) en unas determinadas condiciones de reacción (3 h para formar el gel,  $\text{pH}=2.2$ ), que permitió demostrar las posibilidades que ofrecía el material sol-gel como matriz de soporte para inmovilizar indicadores de pH. La posición de la banda del máximo de absorción respecto de etanol (520 nm) no se alteró y el valor del  $\text{pK}_a$  en la membrana (7.0) no se alejó demasiado del valor hallado en etanol (8.5). Además, se consiguió preparar capas de tamaño de poro adecuado para evitar la exudación del colorante ECR.

Tras la experiencia adquirida en la primera fase del trabajo, se procedió a realizar el estudio de inmovilización y caracterización de heptametincianinas en matrices sol-gel.



**Figura 2. 28:** Espectros de absorbancia en función del pH de la disolución tampón del colorante ECR en a) etanol y en b) una membrana sol gel.

Se intentó seguir la misma metodología de preparación de las membranas sol-gel con cada heptametincianina, pero la mayoría de ellas mostraron ser inestables en la disolución de reacción, sin seguir un patrón de comportamiento en función de sus grupos funcionales (C4, C9, C11, C20, C21). A pesar de este problema, fue posible caracterizar algunas de las membranas preparadas con los colorantes C1, C2 y C22, aunque todas ellas presentaron bandas de absorción poco intensas. Se estudió su estabilidad química en la matriz, fotoestabilidad, exudación y respuesta a pH, exponiendo la dificultad en su desarrollo.

Tanto los soles como las membranas preparadas debieron almacenarse a resguardo de la luz, por su precaria fotoestabilidad. Incluso las membranas preparadas con una de las heptametincianinas más estables (C1), mostraron una disminución de la intensidad de la banda de absorción del 31 % tras siete horas de exposición a luz blanca. Con este cromoforo se prepararon dos soles en las mismas condiciones de reacción, pero utilizando diferentes precursores; tetraetoxisilano (TEOS) y metiltrietoxisilano (MTES). Se observó una mejoría de las características del material resultante al utilizar TEOS. El sol preparado con el alcoxisilano MTES, tardó mucho más tiempo en adquirir una viscosidad adecuada para la deposición de las

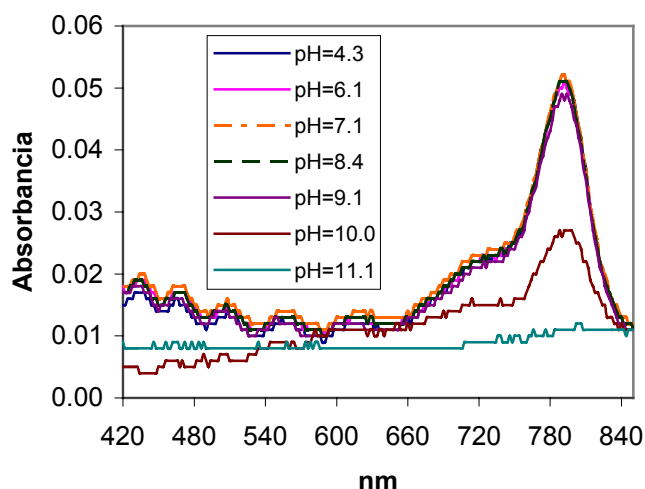
membranas y la heptametincianina C1, incorporada en estas membranas, exudó con bastante rapidez a la disolución (30 % de pérdida a los 90 min.). Este hecho está relacionado con el tamaño de poro obtenido. Utilizando MTES se reduce la funcionalidad del precursor disminuyendo la velocidad de hidrólisis y condensación, con lo que se obtienen poros de mayor tamaño. Los cálculos de porosidad mediante la técnica elipsométrica corroboraron estos resultados, ya que con una membrana preparada con MTES de índice de refracción  $n=1.438$  y grosor de  $0.32 \mu\text{m}$ , se estimó una porosidad de  $\rho=41$ , mientras que la preparada con TEOS, de índice de refracción  $n=1.453$  y grosor de  $0.24 \mu\text{m}$ , se estimó en  $\rho=8$ .

Las heptametincianinas que contenían grupos carboxílicos (C2, C11) mostraron ser inestables en los soles de reacción en el mismo momento de su preparación o tras el período de formación del gel. La incorporación del colorante C11 en el sol provocaba la separación de fases, por lo que no fue posible depositar las membranas. Con el colorante C2 se prepararon soles en catálisis ácida y básica. Ambos, mostraron un tiempo de formación del gel extremadamente largo (24h) respecto a los habitualmente esperados (3h), debido posiblemente a la inhibición de las reacciones de hidrólisis y condensación por los grupos carboxílicos del colorante. Se observaron diferencias claras en los espectros de absorción dependiendo de las condiciones de reacción. En catálisis ácida se observó la forma ácida del colorante mientras que en catálisis básica se observó la forma desionizada típica del colorante.

Finalmente se realizó un estudio completo del efecto del precursor utilizado, la relación molar  $r_{\text{H}_2\text{O}:\text{ETOH}:\text{Prec}}$ , el pH del sol y el tiempo de reacción sobre el material construido con el colorante C22. Éste permaneció estable solamente en los soles de velocidad de reacción más lenta, es decir, los preparados en catálisis ácida, con una relación molar  $r=2$ , un 10 % de MTES y un tiempo de reacción de 3 horas. En otras condiciones se observó la agregación o descomposición del colorante. En catálisis básica se observó su agregación y su rápida exudación (pérdida del 80% del colorante a los 65 min.). Aumentando el contenido de agua, los soles formaron geles rápidamente. El uso de TEOS como precursor provocaba que se formara el gel más rápidamente que al combinarlo con MTES. Finalmente se escogió un tiempo de reacción óptimo de 3 horas, ya que en estados más avanzados de reacción se obtienen membranas más gruesas y frágiles, observándose roturas.

Mediante la composición optimizada fue posible evaluar el comportamiento ácido/base del indicador inmovilizado en la matriz sol-gel. Como se muestra en la figura, tanto la longitud de onda del máximo de absorción  $792 \text{ nm}$ , como el  $\text{pK}_a$  observado (9-11), se corresponden con los respectivos valores obtenidos en etanol ( $795 \text{ nm}$ ,  $\text{pK}_a=10.3$ ), por lo que se demostró la conveniencia de inmovilizar material de reconocimiento en este tipo de matriz.

No obstante, y para hacer compatibles este tipo de membranas con el transductor óptico integrado era necesario establecer una metodología de deposición que permitiera obtener capas de grosor cercano a las  $4 \mu\text{m}$ .



**Figura 2. 29:** Espectros de absorción del colorante inmovilizado en una matriz sol-gel, en función del pH de la disolución tampón. El pKa puede situarse entre el rango de pH=9-11.

### 2.3.2.3 Metodologías de deposición de membranas sol-gel

Como objetivo final del estudio de nuevos soportes tipo sol-gel para el desarrollo de membranas ópticas se pretendió obtener un método de control del espesor de las capas depositadas. Se optimizaron dos técnicas de deposición de membranas; la técnica de rotación controlada y la de inmersión directa. Para ello, se utilizó un sol de composición convencional sin colorante. Desafortunadamente, ninguna de ambas técnicas permitió obtener capas de un grosor superior a una micra sin roturas.

El primer estudio consistió en variar la velocidad del soporte de vidrio, en el que se depositan las membranas por inmersión directa (de 0.73-1.36 mm/s) y determinar su grosor. Se comprobó que al aumentar la velocidad se incrementaba el grosor obtenido, pero incluso en el máximo de velocidad permitido por el instrumento de deposición, no fue posible obtener un grosor superior a 0.5  $\mu\text{m}$ , a menos que la deposición se efectuara a niveles más avanzados de reacción, cuando la viscosidad de la membrana era superior. En estos casos, todas las membranas obtenidas se rompieron al secarse.

Al comprobar la imposibilidad de depositar las capas por la técnica de inmersión directa, se ensayó la técnica de rotación controlada. Se realizó un estudio del efecto de la velocidad de rotación del sustrato (1000-4000 rpm) y del volumen de sol depositado (20, 40  $\mu\text{l}$ ) en el grosor de la membrana resultante. No se observó una gran influencia del volumen depositado y se comprobó que una disminución de la rotación permitía obtener membranas más gruesas. No obstante, tampoco esta técnica permitía obtener membranas óptimas de 4  $\mu\text{m}$ , ya que, cuanto más lenta era la velocidad, las membranas resultantes perdían homogeneidad y rompían durante la etapa de secado. Para solventar estos problemas, existen estudios que pretenden disminuir la tensión capilar del material para disminuir su encogimiento durante el secado. El procedimiento seguido consiste en modificar la composición del gel con otros disolventes o adicionando

agentes estabilizantes. En general estos procesos son complicados y resultan poco apropiados si el propósito es adquirir una metodología de obtención de membranas, rápida y reproducible.

Al comparar los resultados obtenidos con ambos soportes, se optó por utilizar membranas poliméricas activadas en los sensores integrados, ya que a pesar de modificar las características de los colorantes inmovilizados respecto de etanol, permitían al menos, obtener capas del grosor requerido (4  $\mu\text{m}$ ). En cualquier caso, se hizo necesario buscar colorantes con características más adecuadas para su incorporación en la matriz polimérica.

### 2.3.3 CARACTERIZACIÓN DE CETOCIANINAS EN MEMBRANAS POLIMÉRICAS

Debido a los inadecuados resultados obtenidos con las heptametincianinas en matrices poliméricas, se decidió estudiar la preparación de membranas poliméricas indicadoras de pH con nuevos compuestos de la familia de las cetocianinas. Éstos, a pesar de modificar sus características por el hecho de estar disueltos en el plastificante, permitieron obtener membranas altamente sensibles a pH en un rango de trabajo adecuado y con longitudes de onda de absorción cercanas a la longitud de onda de emisión del láser de diodo utilizado como fuente de luz. Las cetocianinas presentaron bandas intensas de absorción cercanas a 780 nm, y mostraron ser altamente sensibles a variaciones de pH. Así pues, se evaluaron sus características espectrales, sus propiedades ácido/base, su estabilidad química y fotoquímica, y su solubilidad en membranas de PVC.

Utilizando como plastificante tris (2-etilhexil) fosfato (TOPH) se obtuvieron membranas perfectamente homogéneas con cada colorante. Este hecho demostraba que los compuestos eran perfectamente solubles en dicho disolvente orgánico. Para regular la respuesta de los optodos, se mantuvo en todas las membranas una relación molar 1:1 de colorante y aditivo iónico. Las membranas se prepararon en las condiciones óptimas de deposición utilizando la técnica de rotación controlada, lo que permitió obtener un grosor reproducible de 4  $\mu\text{m}$ .

Se adquirieron las curvas de calibración de cada membrana efectuando espectros de absorbancia a diferentes valores de pH entre 400-800 nm. Las membranas se mantuvieron en contacto continuo con una disolución tampón empleando una celda de flujo de configuración convencional. Para determinar el tiempo de respuesta se efectuaron registros en función del tiempo a 780 nm variando el pH de este tampón.

Para asegurar una buena sensibilidad y un tiempo de vida de las membranas razonable, es necesario estudiar la estabilidad de los colorantes a lo largo de los calibrados y verificar además que no exuden de la membrana. Con este objetivo, se determinó la estabilidad química en medio ácido (pH=3) y medio básico (pH=8) manteniendo en contacto cada membrana con un flujo continuo de disolución y resguardada de la luz. A intervalos de tiempo prefijados se realizaron espectros de absorbancia para obtener una curva de descomposición con el tiempo.

Uno de los principales problemas que presentan las cianinas es su poca estabilidad fotoquímica. Se estudió su fotodescomposición en condiciones secas y húmedas, y en forma ácida y básica.

Para ello se siguió la disminución del pico de absorbancia de la forma ácida o básica, al irradiar las membranas a la longitud de onda de absorción, o bajo la exposición a luz blanca. Con las curvas obtenidas se calculó el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de cada colorante asumiendo una cinética de descomposición de primer orden, y se compararon los resultados normalizando la absorbancia al 100% en tiempo  $t=0$  s.

Finalmente se depositaron manualmente membranas sobre el dispositivo sensor simulando una técnica serigráfica y se evaluaron los mismos parámetros de calidad que en la configuración convencional: sensibilidad, tiempo de respuesta, tiempo de vida y reproducibilidad. Los resultados fueron comparados y quedó demostrada la efectividad de usar las cetocianinas como indicadores de pH en matrices poliméricas de PVC y en los sensores ópticos integrados.

### 2.3.3.1 Características espectroscópicas de las cetocianinas en membranas poliméricas

Todas las membranas recién preparadas presentaban una banda ancha situada a longitudes de onda cercanas a los 500 nm correspondiente a la forma básica de la cetocianina. No obstante, se mantuvieron siempre en condiciones ácidas y resguardadas de la luz tras comprobar su buena estabilidad en estas condiciones.

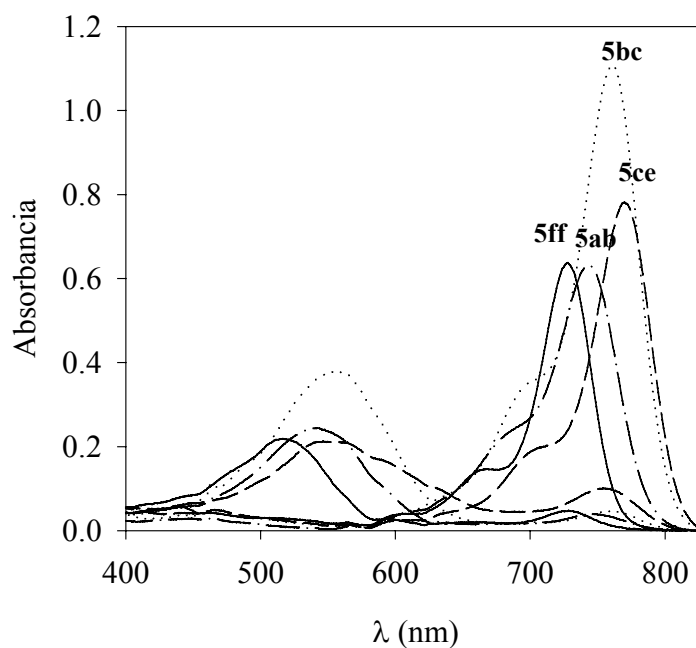
Como era de esperar, el máximo de absorbancia de las cetocianinas en membrana se desplazó a longitudes de onda superiores debido a la diferente polaridad del disolvente orgánico utilizado respecto a etanol. El aumento observado, de entre unos 10 y 35 nm, favorece la aplicación de estos compuestos como elementos de reconocimiento del sensor desarrollado a la longitud de onda de trabajo de 780 nm (**Tabla 2. 9**). Las cetocianinas evaluadas muestran un amplio rango de longitudes de onda entre 727.0-770.5 nm en membrana dependiendo de los sustituyentes de los heterociclos. La **Figura 2. 30** muestra las bandas de absorbancia de las formas ceto/enólicas de cuatro de ellas.

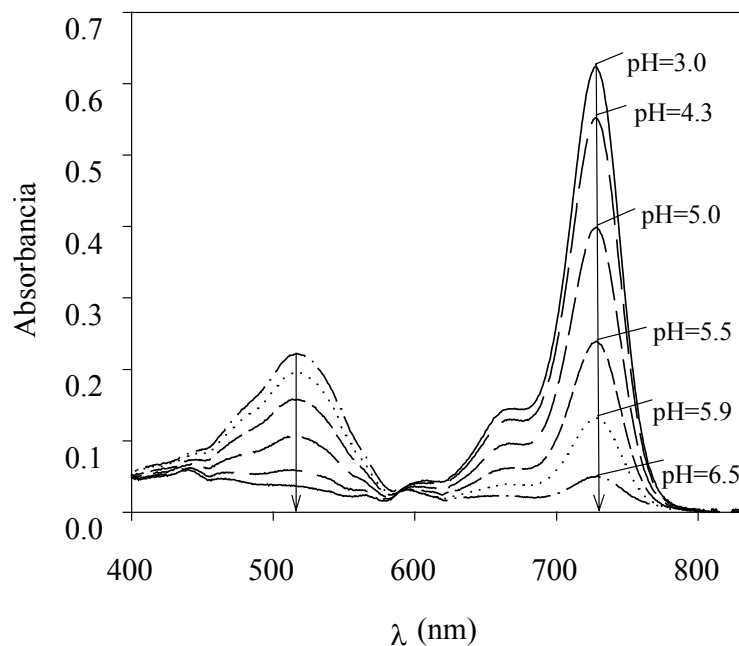
Los espectros de absorbancia obtenidos durante cada ciclo de variación de pH, entre valores de 3-8.5 mostraron el buen comportamiento de las membranas. Se observaron los picos correspondientes a la forma cetónica (en la zona del espectro visible) y la forma enólica (en la zona del espectro NIR) de cada cetocianina, así como el hombro de la forma ácida correspondiente a las transiciones vibracionales de la estructura. En todos los casos, la forma enólica fue la más sensible al cambio de pH debido al mayor coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de esta especie (**Figura 2. 31**). Además, la presencia de un solo punto isobéptico demostró la existencia de un solo equilibrio. No obstante, a valores de pH elevados, se observó un desplazamiento de este punto de referencia, que fue atribuido a la descomposición química de los colorantes en medio básico, ya que no se detectó la presencia de bandas de agregación, ni la exudación de los componentes de la membrana.

**Tabla 2. 9:** Variación de la longitud de onda del máximo de absorción, de las cetocianinas en membranas de PVC

Colorante	$\epsilon_{\text{EtOH}} \cdot 10^5 \text{ (Kg} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})^*$	$\lambda_{\text{EtOH}} \text{ (nm)}$	$\lambda_{\text{MEM}} \text{ (nm)}$
5aa	2.52	717.0	735.0
5bb	2.13	747.0	766.0
5cc	2.79	742.0	765.0
5dd	1.37	743.0	764.0
5ee	1.42	750.5	768.5
5ff	2.39	717.0	727.0
5ab	1.96	731.5	742.5
5ac	2.55	729.5	744.0
5ad	2.51	725.5	745.5
5ae	0.80	733.0	743.0
5bc	0.62	744.5	759.5
5bd	2.32	745.5	757.0
5be	1.57	748.5	766.0
5cd	2.32	741.0	755.0
5ce	2.43	745.5	770.5
5de	2.09	744.0	753.0
7bc	2.13	724.0	760.0

\*Coeficiente de extinción molar de la forma enólica

**Figura 2. 30:** Espectros de absorción de las membranas de cuatro de las cetocianinas testadas en el tampón combinado, en condiciones de equilibrio a pH=3 y pH=8.



**Figura 2. 31:** Espectros de absorbancia de la cetocianina 5ff en membrana de PVC, en función del pH de la disolución tampón, que muestran los máximos de absorción de la forma cetónica y enólica a 518 y 727 nm respectivamente y el punto isobéptico a 587.

### 2.3.3.2 Estabilidad

Un factor limitante de los sensores ópticos es la pérdida de los componentes de la membrana debida a procesos químicos o fotoquímicos. La *fotodescomposición* de los colorantes en monitorizaciones continuas suele ser la causa principal del deterioro de las membranas, por lo que para determinar sus requisitos de almacenamiento, se evaluó tanto la estabilidad de las cetocianinas en condiciones normales de trabajo en el laboratorio, como en condiciones extremas. En primer lugar se evaluó la estabilidad de las cianinas en la matriz polimérica, bajo el efecto combinado de la exposición de una fuente de luz blanca y en contacto con el aire ( $O_2$ ) en condiciones secas. Se realizaron espectros de absorción de las membranas cada pocos minutos durante dos horas y se observó una disminución de intensidad del máximo de absorción de la forma cetónica, forma en la que se encontraban las cetocianinas en esas condiciones, sin que aparecieran otras bandas de absorción como productos de descomposición. Los resultados obtenidos del cálculo del tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de cada membrana demostraron la poca estabilidad de las cetocianinas bajo fuentes de luz de alta intensidad, por lo que se consideró necesario mantenerlas siempre resguardadas de la luz ambiente durante su almacenamiento (**Tabla 2. 10**).

Por otro lado, fue necesario evaluar la fotodescomposición de los colorantes en condiciones de trabajo, por lo que estudió el efecto de la exposición continua a las longitudes de onda de los máximos de absorción, en condiciones húmedas, es decir, habiendo transformado el colorante a su forma cetónica (pH=8) o enólica (pH=3). Los resultados obtenidos fueron muy



satisfactorios, ya que se comprobó que ninguna de las cetocianinas testadas descompone en forma ácida, mientras que, se observó una disminución progresiva de la intensidad de la banda de absorción de la forma cetónica en condiciones básicas. En este último caso se obtuvieron tiempos de vida media superiores a las 20 horas. A partir de este estudio, se decidió almacenar siempre las membranas en condiciones ácidas para mantener las cetocianinas en su forma más estable.

Otros motivos de reducción del tiempo de vida de las membranas son la *formación de agregados* y la *exudación de los componentes de la membrana* a la disolución acuosa. No se observaron bandas de agregación en los espectros de ninguna de las cianinas evaluadas. Se determinó la pérdida de colorante de las membranas, manteniéndolas en contacto con la disolución durante un período de dos horas y realizando espectros de absorción. Se siguió la intensidad tanto de la forma básica (pH=8) como de la forma ácida (pH=3) comprobándose la ausencia de exudación del colorante, ya que los espectros de absorción de la disolución no mostraban sus bandas características. A pesar de ello, se observó una disminución del pico correspondiente a la forma básica de hasta un 3% durante las dos primeras horas, debido a su descomposición química a pH básico. La **Tabla 2. 10** muestra los resultados de estos estudios exceptuando los obtenidos a pH ácido, que no se presentan por no observarse una disminución significativa de las bandas de absorción.

**Tabla 2. 10:** Estudio de fotodescomposición y estabilidad química.

Colorante	fotoestabilidad ( $h\nu^a + O_2$ ) $t_{1/2}$ (min)	fotoestabilidad ( $h\nu^b + H_2O$ ) % pérdida absorbancia	estabilidad química <sup>c</sup> % pérdida absorbancia
5aa	6.86	1.2	0.1
5bb	76.35	16.0	0.7
5cc	15.37	5.6	2.4
5dd	57.07	1.5	-
5ee	15.75	-	-
5ff	9.86	2.2	0.5
5ab	13.51	6.1	1
5ac	12.29	0.5	1.9
5ad	10.15	3.1	1.0
5ae	40.16	3.3	0.7
5bc	31.52	1.9	3.0
5bd	10.42	1.8	0.5
5be	17.10	2.9	1.9
5cd	5.61	0.2	0.5
5ce	22.16	5.4	-
5de	8.82	5.2	1.8
7bc	11.24	2.0	0.7

<sup>a</sup> Las membranas en aire fueron expuestas a luz halógena (500 W) a 150 cm durante dos horas. <sup>b</sup> Las membranas fueron expuestas a la luz monocromada de longitud de onda del máximo de absorción de la forma básica, procedente de la lámpara del espectrofotómetro. <sup>c</sup> Las membranas se mantuvieron en continuo contacto con una disolución tampón a pH = 8.

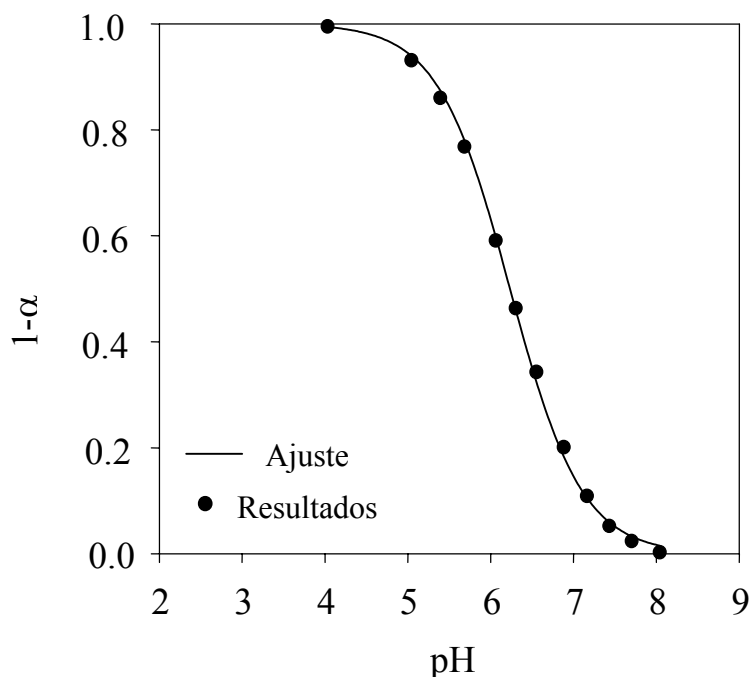
### 2.3.3.3 Características de respuesta analítica

#### *pKa de las cetocianinas en membrana*

La determinación de la constante de acidez de cada colorante es relevante porque define el rango dinámico de respuesta de un optodo cuando éste, actuando como un cromoionóforo se combina con un determinado ionóforo, para el desarrollo de membranas selectivas de iones. El valor observado en membrana no sólo depende de la constante de acidez de cada colorante sino también de la composición de ésta y principalmente del plastificante utilizado, ya que éste facilitará o no el intercambio de protones entre la membrana y la disolución acuosa. La constante de acidez de cada colorante ( $K_{aMEM}$ ), que describimos como aparente, se calculó a partir de la constante de equilibrio del sistema, obtenida de los resultados de calibración experimentales, ajustados a la curva de respuesta teórica, suponiendo un mecanismo de coextracción de iones de carga opuesta, entre la disolución y una membrana compuesta de un solo cromoionóforo selectivo de pH (ec. 17, §1.3.2.1). La **Figura 2. 32** muestra una de las curvas obtenidas, que relaciona el grado de protonación de una determinada cetocianina (5cd) en función del pH. La expresión de la constante de equilibrio teórica ajustada es:

$$(1 - \alpha) = 1 - \left( \frac{1}{(1 + K_{aMEM} \cdot 10^{-pH})} \right). \text{ Su valor para este indicador es:}$$

$$K_{aMEM} = 5.84 \times 10^{-7} \pm 0.13 \times 10^{-7}.$$



**Figura 2. 32:** Curva de calibración obtenida de la representación del grado de protonación de la cetocianina 5cd en función del pH del tampón y cálculo de la constante de coextracción del proceso ( $K_{aMEM}$ ).

Las cetocianinas más básicas (5cc, 5dd, 5bb, 5be) mostraron una gran desviación de los resultados experimentales respecto de la expresión teórica, probablemente por ser inestables en medio básico. Los puntos experimentales correspondientes a valores de pH superiores a 8, o bien no pudieron ser obtenidos, o fueron debidos a la formación de otra especie en equilibrio, por lo que los valores de  $pK_{aMEM}$  calculados para estos colorantes deben considerarse aproximados. Los resultados se compararon con los obtenidos en solución alcohólica, pudiéndose observar un incremento de incluso 3 unidades de pH, que podría explicarse por la menor estabilidad de la forma enólica protonada en la fase orgánica de la membrana (**Tabla 2. 11**).

Se demostró que el hecho de inmovilizar las cianinas en matrices de PVC permite trabajar en condiciones menos agresivas cercanas a pH neutro. Los valores de  $pK_{aMEM}$  obtenidos permiten utilizar estas membranas en un amplísimo rango de aplicaciones prácticas. Además, será posible escoger de entre una amplia familia de colorantes de características semejantes, la que proporcione el mejor rango lineal de concentración para un determinado analito e ionóforo.

**Tabla 2. 11:** Comparación de la acidez de cada cetocianina en etanol y en membrana polimérica

Colorante	$pK_{aEtOH}$	$pK_{aMEM}$
5aa	2.9	$7.32 \pm 0.06$
5bb	$\leq 2.1$	$8.34 \pm 0.10^a$
5cc	$\leq 3.6$	$7.83 \pm 0.06$
5dd	4.3	$7.86 \pm 0.04^a$
5ee	2.9	$7.68 \pm 0.10^a$
5ff	2.0	$4.95 \pm 0.01$
5ab	3.4	$6.91 \pm 0.01$
5ac	2.7	$6.33 \pm 0.01$
5ad	3.8	$7.31 \pm 0.09^a$
5ae	2.9	$6.47 \pm 0.01$
5bc	1.7	$7.01 \pm 0.02$
5bd	3.4	$6.49 \pm 0.03$
5be	3.8	$8.37 \pm 0.12^a$
5cd	2.9	$6.23 \pm 0.01$
5ce	3.6	$7.30 \pm 0.06$
5de	3.3	$6.49 \pm 0.01$
7bc	2.7	$6.90 \pm 0.02$

<sup>a</sup> Valores aproximados

### ***Sensibilidad, intervalo lineal y reproducibilidad***

Para obtener los parámetros de calidad analítica se realizaron calibrados sucesivos a la longitud de onda del máximo de absorción con cada membrana preparada. Las curvas de calibración características eran de forma sigmoidea tal y como se esperaba, excepto las obtenidas con las membranas preparadas con las cetocianinas más básicas, que no alcanzaban la saturación de la señal al valor máximo de pH evaluado (pH=8.5). En ningún caso se observó histéresis durante los ciclos de pH, siendo la respuesta completamente reversible.

La sensibilidad se evaluó como la máxima pendiente en el rango lineal de concentraciones, y éste como las concentraciones límite en las que la pendiente de la función de respuesta se reduce a un cuarto de la máxima pendiente. Las cetocianinas mostraron un intervalo lineal de dos órdenes de magnitud. Además, se evaluó la reproducibilidad de la respuesta, siguiendo la variación de la pendiente de la recta de calibración a lo largo del tiempo. Los resultados de sensibilidad, evaluada como pendiente de la recta de calibración, el intervalo lineal y la reproducibilidad de la medida se resumen en la **Tabla 2. 12**.

**Tabla 2. 12:** Parámetros de calidad de la respuesta a pH de las membranas poliméricas que contienen cetocianinas

cianina	sensibilidad (UA/dec) <sup>a</sup>	intervalo lineal (pH)	reproducibilidad (% n=4)
5aa	0.09	6.07-8.67	4.3
5bb	0.03	8.03-9.85	-
5cc	0.06	7.23-7.90	7.9
5dd	0.16	8.04-8.97	7.2
5ee	0.19	6.05-9.55	6.8
5ff	0.27	4.20-5.83	0.9
5ab	0.27	6.67-7.91	1.8
5ac	0.23	6.04-7.24	2.8
5ad	0.18	7.39-9.02	7.4
5ae	0.22	6.20-7.29	6.4
5bc	0.44	6.90-8.01	1.2
5bd	0.16	5.96-7.50	3.4
5be	0.16	7.88-9.69	0.6
5cd	0.06	6.00-6.95	9.6
5ce	0.18	7.07-8.76	2.8
5de	0.13	6.28-7.31	2.4
7bc	0.11	6.68-7.89	1.5

<sup>a</sup> Valores obtenidos a la longitud de onda del máximo de absorción

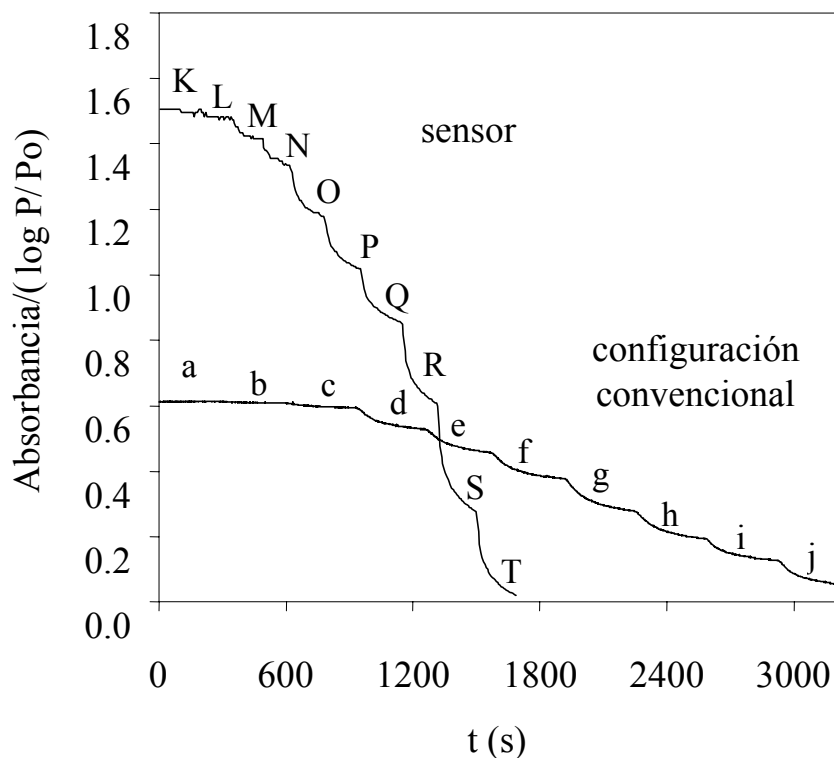
Los buenos resultados analíticos obtenidos permitieron demostrar la alta capacidad de las cetocianinas sintetizadas como indicadores de pH para el desarrollo de membranas ópticas de alta sensibilidad, respuesta rápida y reversible.

#### 2.3.4 RESULTADOS DE LAS MEMBRANAS DESARROLLADAS EN LA NUEVA CONFIGURACIÓN SENSORA

Para aprovechar las características de respuesta de las cetocianinas, las membranas desarrolladas se incorporaron en los sensores integrados. Para ello, se depositaron membranas de la misma composición que las utilizadas en configuración convencional y se llevó a cabo un estudio comparativo de las características de respuesta, y especialmente de la sensibilidad y tiempo de respuesta. La **Figura 2. 33** muestra gráficamente el incremento de sensibilidad de una misma membrana y a la misma longitud de onda de trabajo dependiendo del tipo de configuración utilizada para su caracterización.

Se determinó la sensibilidad como pendiente de la recta de calibración y como variación total de señal en unidades de absorbancia, y se calculó el tiempo de respuesta de cada salto de pH

entre 3-8 ajustando una función exponencial. Estos valores se compararon con los obtenidos mediante la configuración convencional, en las mismas condiciones. De esta manera se demostraron las ventajas inherentes a la nueva configuración sensora, ya que fue posible realizar la sensibilidad sin incrementar la concentración de colorante y sin aumentar el grosor de las membranas. El tiempo de respuesta permaneció inalterado al no modificarse el último parámetro.



**Figura 2. 33:** Experimentos de calibración con membranas poliméricas que contienen la cetocianina 5ce en ambas configuraciones. Los valores de pH corresponden a: a) 3.09, b) 4.04, c) 5.10, d) 6.17, e) 6.64, f) 7.07, g) 7.59, h) 8.04, I) 8.40, j) 8.98 y K) 3.14, L) 5.09, M) 5.99, N) 6.44, O) 6.97, P) 7.29, Q) 7.54, R) 7.94, S) 8.48, T) 8.98.

Los resultados que se presentan en la **Tabla 2. 13** fueron obtenidos a 780 nm en ambas configuraciones. Cuando menos se consiguió doblar la sensibilidad y en algunos casos se incrementó notablemente. Este hecho es debido a la longitud de la zona de interacción del sensor, que proporciona un largo camino óptico. Como puede observarse, este incremento no fue igual para todas las cetocianinas evaluadas y podría relacionarse con la diferencia existente entre la longitud de onda de lectura y la longitud de onda del máximo de absorción para cada uno de los colorantes. Además, no se tuvieron en cuenta los cambios de absorptividad molar de cada colorante en el disolvente utilizado y se consideraron siempre los valores evaluados en disolución alcohólica. Por otro lado, la fluorescencia que presentan estos colorantes podría ser también la causa de estas irregularidades. En cualquier caso se observó un notable incremento tanto de la pendiente de la recta de calibración como de la variación total de absorbancia. Finalmente se comparó el tiempo de respuesta medio de cada salto de pH de las membranas

depositadas sobre el sensor y en configuración convencional. En general los tiempos de respuesta calculados para las membranas depositadas sobre el sensor fueron del mismo orden o menor que los obtenidos con las membranas evaluadas en configuración convencional, lo que indica la utilización de espesores de membrana equivalentes.

Tal y como se comprobó en la caracterización y validación de la respuesta en la nueva configuración sensora, el tiempo de vida de las membranas se ve afectado por la alta intensidad de la fuente de luz utilizada. Este hecho se traduce en una pequeña deriva de la señal para varios cambios de pH consecutivos. No obstante se consiguieron valores de repetitividad con desviaciones estándar relativas aceptables (RSD=0.4-0.8 %).

**Tabla 2. 13:** Comparación de sensibilidad y tiempo de respuesta, obtenidos en configuración convencional y en la nueva configuración sensora

colorante	$\lambda_{\text{max}}$ MEM (nm)	configuración convencional			nuevo sensor		
		Pendiente <sup>a</sup> (UA/dec)	variación de señal <sup>a</sup> ( $\Delta$ pH)	tr (min)	pendiente (UA/ $\Delta$ pH)	variación de señal ( $\Delta$ pH)	tr (min)
5aa	735.0	$6 \times 10^{-3}$	0.014	3.6 $\pm$ 0.7	0.17	0.468	1.0 $\pm$ 0.3
5bb	766.0	0.02	0.079	2.2 $\pm$ 1.7	0.06	0.173	0.5 $\pm$ 0.2
5cc	765.0	0.02	0.059	3.0 $\pm$ 0.5	0.45	0.853	0.8 $\pm$ 0.2
5dd	764.0	0.10	0.228	1.0 $\pm$ 0.5	-	-	-
5ee	768.5	0.19	0.739	3.6 $\pm$ 1.2	0.68	0.709	1.1 $\pm$ 0.3
5ff	727.0	$5 \times 10^{-3}$	0.012	1.5 $\pm$ 0.2	0.09	0.064	1.2 $\pm$ 0.7
5ab	742.5	0.06	0.133	2.1 $\pm$ 0.5	0.10	0.329	1.0 $\pm$ 0.4
5ac	744.0	0.04	0.096	2.4 $\pm$ 0.7	0.51	1.020	0.9 $\pm$ 0.2
5ad	745.5	0.04	0.106	2.4 $\pm$ 0.5	0.24	0.633	2.7 $\pm$ 1.9
5ae	743.0	0.04	0.083	1.5 $\pm$ 0.5	0.40	0.911	1.0 $\pm$ 0.4
5bc	759.5	0.28	0.654	1.6 $\pm$ 0.2	0.68	2.062	1.6 $\pm$ 0.5
5bd	757.0	0.08	0.193	1.2 $\pm$ 1.1	0.65	1.437	0.7 $\pm$ 0.2
5be	766.0	0.04	0.106	1.5 $\pm$ 0.3	0.96	1.741	1.9 $\pm$ 0.4
5cd	755.0	0.03	0.060	2.0 $\pm$ 0.3	0.54	1.058	2.1 $\pm$ 0.8
5ce	770.5	0.14	0.424	1.3 $\pm$ 0.5	0.49	1.480	1.7 $\pm$ 0.5
5de	753.0	0.04	0.090	2.1 $\pm$ 0.4	0.35	0.646	0.8 $\pm$ 0.3
7bc	760.3	0.07	0.168	1.7 $\pm$ 0.6	0.30	1.001	0.7 $\pm$ 0.2

Así pues, se comprobó que los sensores integrados basados en guías de onda planas son una perfecta alternativa a los sensores de configuración convencional. Respecto a los sistemas convencionales basados en medidas de absorbancia, estos dispositivos confieren una mejorada sensibilidad sin afectar al tiempo de respuesta, dotan de robustez y portabilidad al sistema óptico, y permiten la fabricación masiva reduciendo drásticamente el coste de la instrumentación asociada.

## 2.4 DESARROLLO DE UN SENSOR SELECTIVO DE IONES PARA SU APLICACIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

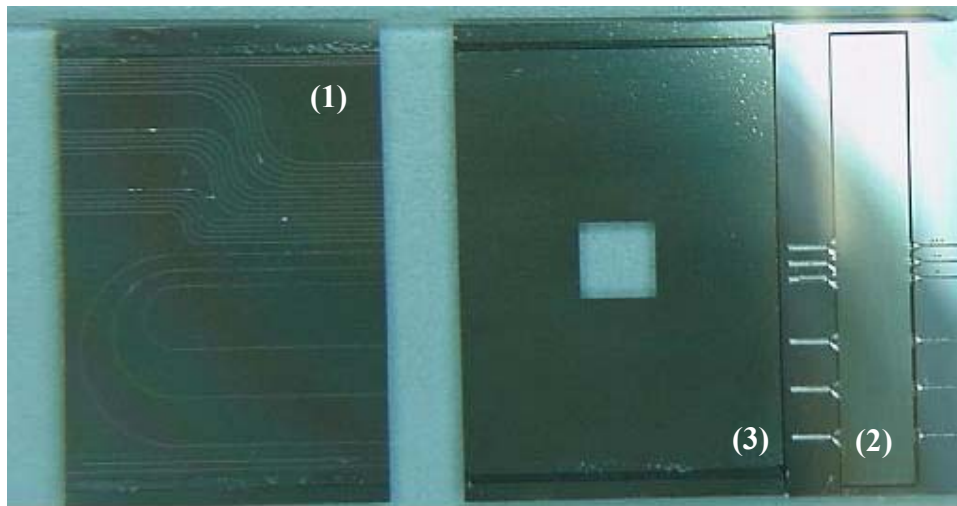
El objetivo final de la tesis fue el desarrollo de un sensor óptico integrado, versátil, portátil, altamente sensible y selectivo a un determinado analito, capaz de realizar análisis químicos *in situ*. Para ello, fue necesario realizar algunas modificaciones tecnológicas del transductor y formular una membrana demostradora, selectiva a un analito de interés medioambiental.

Los sensores utilizados hasta el momento no permitían desacoplar las fibras ópticas del transductor optoelectrónico plano, lo que imposibilitaba la utilización de técnicas reproducibles de deposición de membranas. Variaciones en el espesor de éstas alteraban la eficacia del guiado de luz en la zona de la membrana e impedían aprovechar las ventajas. Además, en este estadio del trabajo se pretendía ya estudiar la reproducibilidad de los dispositivos y era de interés obtener un sistema de medida automatizable y portátil que permitiera realizar análisis de rutina. Por estos motivos se decidió cambiar la configuración del transductor, de forma que fuera posible separar el sistema óptico del sistema de transmisión y tratamiento de señales y así, disponer de un transductor intercambiable y reutilizable, una vez agotado el tiempo de vida de la membrana. La nueva configuración que se presenta permite obtener tanto transductores de activación fácil y reproducible, como transductores desechables de bajo coste, fácilmente integrables como detectores en sistemas de gestión de fluidos.

### 2.4.1 NUEVA CONFIGURACIÓN DE GUÍAS DE ONDA CURVAS

La nueva configuración sensora consistía en un circuito microfabricado de guías de onda planas ARROW en el que tanto la guía de entrada como la de salida parten del mismo extremo del transductor, y por lo tanto, una de ellas debe curvarse. Este diseño ofrece las mismas propiedades que el basado en guías de onda rectas (alta sensibilidad, selectividad adecuada al analito, tiempo de respuesta reducido e inexistencia de interferencias debidas a la matriz de la muestra), y una serie de ventajas adicionales. Por un lado hace viable el diseño de sensores para medidas *in situ* y por otro simplifica el acoplamiento/desacoplamiento de fibras y guías, mediante un soporte adicional de alineamiento y unión, construido con las mismas técnicas de microfabricación utilizadas para la construcción de las guías ARROW. Como se puede observar en la **Figura 2. 36**, es posible distinguir tres partes diferenciadas: (1) el transductor basado en guías de onda planas curvas y rectas, en el que se deposita la membrana, (2) un soporte auxiliar grabado con canales en forma de “V”, que permite fijar las fibras ópticas de entrada y salida, y (3) una plataforma de conexión, que permite el alineamiento de las fibras ópticas y las guías de onda mediante dos resaltes microfabricados, que pueden distinguirse a ambos lados del transductor. La tolerancia de este encaje debe ser de unas pocas micras debido a las dimensiones de guías y fibras. Además, esta plataforma permite el deslizamiento del transductor sobre si misma y por lo tanto, un fácil intercambio de éste.

Tal y como se observa en la figura, el transductor de los prototipos desarrollados estaba formado por diversas guías de onda grabadas con diferentes radios de curvatura y diferentes formas, que sirvieron para una caracterización previa y optimización del confinamiento de la luz antes de la aplicación final de los dispositivos como sensores. Las dimensiones del sensor, teniendo en cuenta los tres componentes básicos ya citados son de 0.06x3.0x3.0 cm. No obstante, el futuro diseño del sensor consistirá en una sola guía de onda de entrada curva y una sola guía de onda de salida recta, con lo que se reducirá el tamaño final del transductor a aproximadamente 0.06x3.0x2.0 cm.



**Figura 2. 34:** Fotografía de los componentes básicos del nuevo sensor intercambiable, basado en una guía de entrada de configuración curva y una de salida recta.

Por otro lado, la **Figura 2. 35** muestra la ventana que permite el contacto de la zona de reconocimiento del transductor con la disolución que contiene el analito, ya que el diseño propuesto para alinear el transductor a las fibras ópticas consiste en el deslizamiento del transductor boca abajo.

Cabe destacar que el sistema de guiado de luz de los nuevos dispositivos formados por guías ARROW curvas y el sistema de guiado de los dispositivos formados por guías rectas es el mismo, por lo que los requisitos en cuanto a índice de refracción y grosor de la membrana, que producen un confinamiento óptimo de la luz en el transductor son equivalentes (1.46 y 4  $\mu\text{m}$ ). Por lo tanto, el mecanismo de transducción consiste en el confinamiento de luz desde la fuente hacia la membrana óptica a través de una guía curva, su modulación en función de la interacción de la membrana con el analito presente en la muestra, y su posterior confinamiento hacia el detector, mediante otra guía de onda recta. Estudios preliminares de las pérdidas de radiación de las guías de onda en función de su radio de curvatura y su anchura, realizados en el Grupo de Espectroscopía y Fibras Ópticas de la Universidad de Zaragoza, demostraron que a igual radio de curvatura, existían más pérdidas de luz cuanto más anchas eran las guías, por lo



que se decidió que la guía de salida fuera la guía recta, para asegurar la recogida del máximo de luz procedente de la membrana.



**Figura 2. 35:** Aspecto final del transductor conectado a la plataforma, que permite el contacto de la membrana y la disolución acuosa.

Es importante hacer notar que, para simplificar la construcción del transductor y permitir una mayor tolerancia en la alineación de las fibras ópticas y las guías de onda, se decidió construir guías de entrada curvas más anchas ( $20\ \mu\text{m}$ ) que las guías de entrada rectas de los sensores previamente desarrollados ( $10\ \mu\text{m}$ ). En estas condiciones, la distribución modal de la luz es multimodo en la dirección lateral a las capas. En realidad, la distribución modal de la luz en las guías de onda no es un factor relevante con relación a los sensores de absorbancia. La señal analítica final es una relación entre la potencia de luz de entrada y la de salida, y no depende del número de modos de propagación si éstos se mantienen invariables. Para que se cumpla esta condición no deben verificarse cambios en el medio en contacto con las guías ni alteraciones de las condiciones de inyección de la luz. Por este motivo, las guías se revistieron de una capa aislante del medio externo de  $\text{SiO}_x$  ( $n=1.465$ ) y se fijó el alineamiento entre las fibras ópticas y las guías de onda planas mediante los canales en forma de V y la plataforma de conexión. Debido a estos cambios, las fibras ópticas utilizadas para estos nuevos sensores son multimodo de  $50/125\ \mu\text{m}$ , utilizadas como estándar en telecomunicaciones.

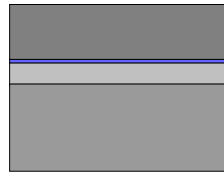
#### **2.4.1.1 Cambios en el proceso de fabricación para la obtención de guías curvas**

Los nuevos dispositivos se construyeron también en el Centro Nacional de Microelectrónica de Barcelona (CNM). El proceso de fabricación de la estructura multicapa basado en tecnología CMOS es idéntico al descrito anteriormente para la fabricación de los dispositivos basados en guías de onda rectas. Respecto al chip transductor, tan solo hubo que modificar las máscaras que definen la forma de la estructura rib curva. A continuación se esquematiza el proceso de fabricación de los nuevos transductores.

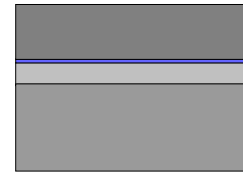
**Etapa 1.** Construcción de la estructura multicapa tal y como se describe en § 2.1.3.1.

4  $\mu\text{m}$   $\text{SiO}_x$  ( $n=1.48$ )  
 0.38  $\mu\text{m}$   $\text{Si}_3\text{N}_4$  ( $n=2.00$ )  
 2  $\mu\text{m}$   $\text{SiO}_2$  ( $n=1.46$ )  
 Silicio (100)

Zona de la guía de onda

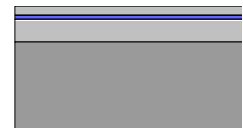
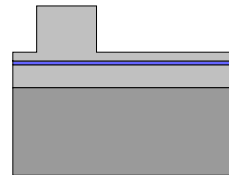
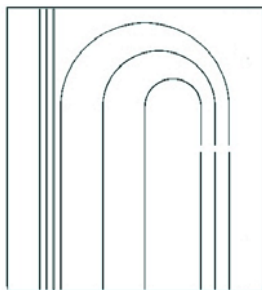


Zona Sensora

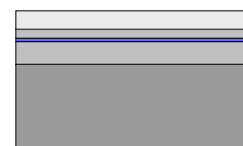
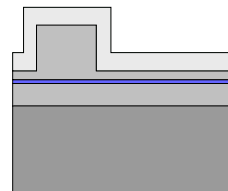


**Etapa 2.** Definición de la zona de grabado mediante un máscara y grabado de la estructura rib (3.5  $\mu\text{m}$ ).

MÁSCARA 1: CNM120-Guía

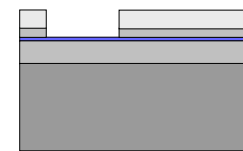
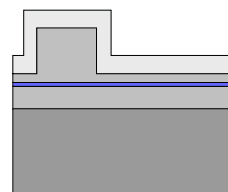
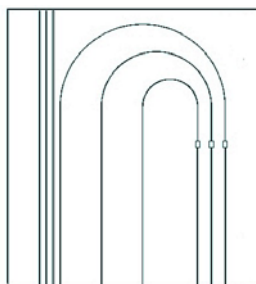


**Etapa 3.** Deposición de una capa de revestimiento de 2  $\mu\text{m}$   $\text{SiO}_x$  ( $n=1.465$ ) sobre el núcleo (pasivación).



**Etapa 4.** Apertura de la pasivación y eliminación de 0.5  $\mu\text{m}$  de  $\text{SiO}_x$  residual para construir la guía cortada.

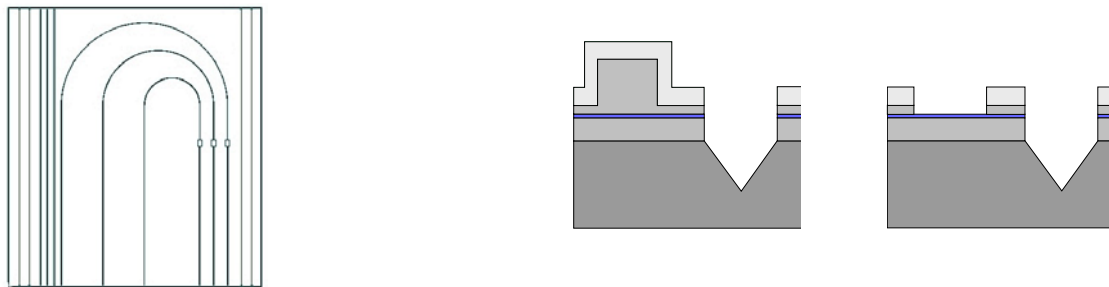
MÁSCARA 2: CNM120-SENS



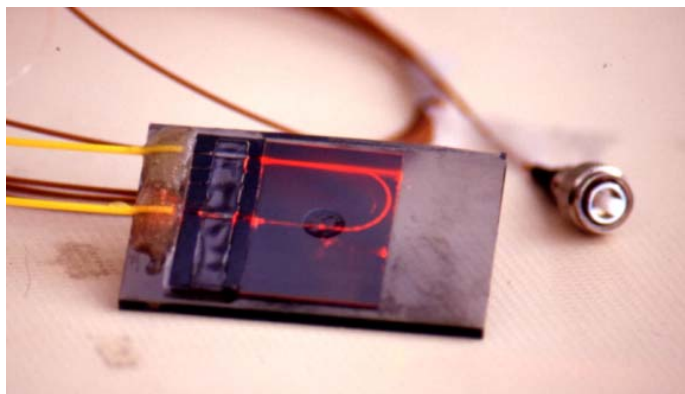
Para grabar las guías de anclaje del transductor que permitirán su deslizamiento sobre la plataforma de conexión se requiere de una etapa adicional en el proceso de fabricación del transductor en la que se grababan unos canales laterales en toda la estructura.

**Etapa 5.** Grabado de las guías de anclaje del transductor.

MÁSCARA 3: CNM120-ANC



Los sensores ópticos basados en una guía de onda de entrada curva y una de salida recta, desarrollados y caracterizados en la última etapa de la tesis, eran dispositivos acoplados irreversiblemente a las fibras ópticas mediante los canales en forma de V, tal y como se describe en el apartado de construcción de los dispositivos basados en guías de onda recta (véase § 2.1.3). Es decir, que no se aprovecharon las ventajas de poder intercambiar el transductor. En la **Figura 2. 36** se muestra uno de los sensores prototipo desarrollados y caracterizados con una membrana óptica selectiva de iones. Se puede observar el confinamiento de la luz a través de la guía curva, de la membrana y de la guía recta de recogida.



**Figura 2. 36:** Fotografía de uno de los sensores integrados construidos basados en guías de onda planas curvadas. Pueden apreciarse pérdidas de luz en la guía curvada, pero la cantidad de luz que entra en la membrana es suficiente para asegurar el funcionamiento del sensor.

#### 2.4.2 DESARROLLO DE UNA MEMBRANA ÓPTICA SELECTIVA DE CADMIO

Como ya se ha comentado, el propósito final del trabajo fue desarrollar una plataforma versátil para la detección óptica, que ofreciera características mejoradas a los sensores ópticos convencionales. Para validar esta propuesta se formuló y desarrolló una membrana óptica selectiva de cadmio como sistema modelo. Muchos de los metales pesados presentes en el medioambiente son altamente tóxicos a bajos niveles de concentración. De entre ellos, los compuestos de cadmio son especialmente dañinos [70-71] y su introducción en el medio ambiente se debe tanto a focos puntuales (áreas cercanas a fabricas de baterías de Ni-Cd, fundiciones y minas) como a la contaminación difusa generada por la práctica agrícola de utilizar fertilizantes contaminados [65] y lodos procedentes del tratamiento de residuos urbanos. La Unión Europea ha establecido el límite admisible de cadmio en lodos para aplicaciones agrícolas en 3 ppm [66], por lo que se requiere un sistema de medida altamente sensible que permita regular la introducción incontrolada de este metal en el medio ambiente.

Con el objetivo de obtener un sistema óptico sensible y portátil para el análisis *in situ* de cadmio en agua y extractos de suelos, se activaron los nuevos dispositivos basados en guías curvas con membranas poliméricas que incorporaban cetocianinas como cromoionóforos. Estas cetocianinas tienen un gran potencial en combinación con ionóforos para el desarrollo de membranas ópticas selectivas a iones ya que cubren un amplio rango de valores de pKa. Este hecho permite modular el intervalo lineal de respuesta del sensor dependiendo del colorante utilizado. Para el desarrollo de la membrana selectiva de cadmio se seleccionó la cetocianina 5ee, que presenta una alta absorptividad molar, una estabilidad adecuada y cuyo máximo de absorción (768.5 nm) está muy cercano a la longitud de onda de emisión del láser de diodo a 780 nm. En combinación con este cromoionóforo, se utilizó un ionóforo comercial (ETH 5435), reportado en diversos trabajos como especie selectiva a ión plomo para el desarrollo de electrodos selectivos de iones [74, 75]. La elección de este ionóforo se basó en su limitada selectividad frente al ión cadmio y en la posibilidad de modularla en función del pH del medio tamponante y del cromoionóforo utilizado [69].

A pesar de que las membranas desarrolladas se siguieron depositando sobre el transductor manualmente, simulando una técnica serigráfica y no mediante técnicas más mecanizadas como la de rotación controlada, se consiguieron espesores cercanos al óptimo de 4  $\mu\text{m}$  en la zona de guía cortada, que permitieron un guiado óptimo de luz.

La composición final optimizada de las membranas consistió en 0.3 % de la cetocianina 5ee como cromoionóforo, 0.3 % de tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio como aditivo aniónico, 12.8 % de ETH 5435 como ionóforo de cadmio, 28.1 % de PVC y 58.5 % de DOS.

### 2.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA DEL SENSOR DE CADMIO DESARROLLADO

Para obtener una metodología analítica simple, automatizable y reproducible para la detección de cadmio en muestras de agua, se integró el nuevo sensor óptico como detector en un sistema de inyección en flujo. Éste tipo de sistemas se basan en la inyección de un volumen conocido de muestra en el seno de una disolución portadora, que circula continuamente en dirección al detector. De esta forma el detector establece una línea base que se ve alterada por los cambios producidos por el analito presente en la muestra [70]. La muestra, en su viaje hacia el detector, sufre una cierta dispersión en contacto con la disolución portadora, pero ésta se mantiene constante si no se modifican las condiciones experimentales. La señal obtenida es transitoria y su altura es proporcional a la concentración de analito en la disolución.

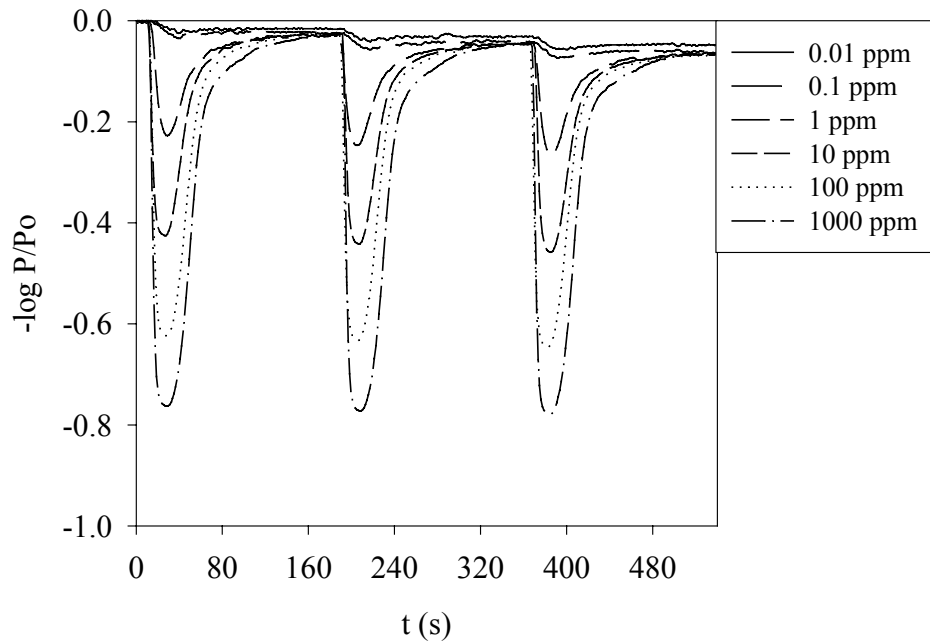
Tal y como se explicó en la introducción, las membranas ópticas selectivas de iones se basan en el intercambio de iones entre la matriz y la disolución acuosa. En este caso, la señal depende de la relación de concentraciones entre el ión cadmio y los protones de la disolución acuosa. Por lo tanto, para el análisis de cadmio en agua, se requiere un canal adicional, que permita tamponar la disolución de la muestra o patrón inyectado antes de llegar al detector, y así poder obtener una señal independiente de la concentración de protones del medio. Para ello se diseñó un sistema FIA bicanal, en el que la muestra se inyecta a un canal portador de agua bidestilada, que, en su viaje hacia el detector, se mezcla con otro canal acondicionador de tampón acético/acetato.

#### 2.4.3.1 Optimización de un sistema FIA para el análisis de cadmio en agua

La técnica FIA se basa en medidas cinéticas y es necesario seleccionar cuidadosamente los parámetros hidrodinámicos para obtener señales reproducibles. Hasta que no se alcanza la señal del estado estacionario, factores como la difusión de los iones en la membrana, la dispersión de la muestra en la disolución portadora, o el lavado de la celda deben seleccionarse cuidadosamente. En este sentido se procedió inicialmente a optimizar el sistema de flujo.

Se inyectaron por triplicado diferentes volúmenes de patrón, a diferentes caudales de disolución portadora, con el fin de obtener los parámetros óptimos que permitieran obtener la máxima señal en el menor tiempo de análisis. Inyectando 300  $\mu\text{L}$  de patrón y utilizando un caudal de 2.1 mL/min se consiguió una frecuencia de muestreo de 55  $\text{h}^{-1}$  en un rango de concentración entre 0.01-1000 ppm de cadmio con una buena reproducibilidad (RSD=0.2-4.5%).

La **Figura 2. 37** muestra uno de los calibrados realizado con uno de los dispositivos en el sistema FIA optimizado.



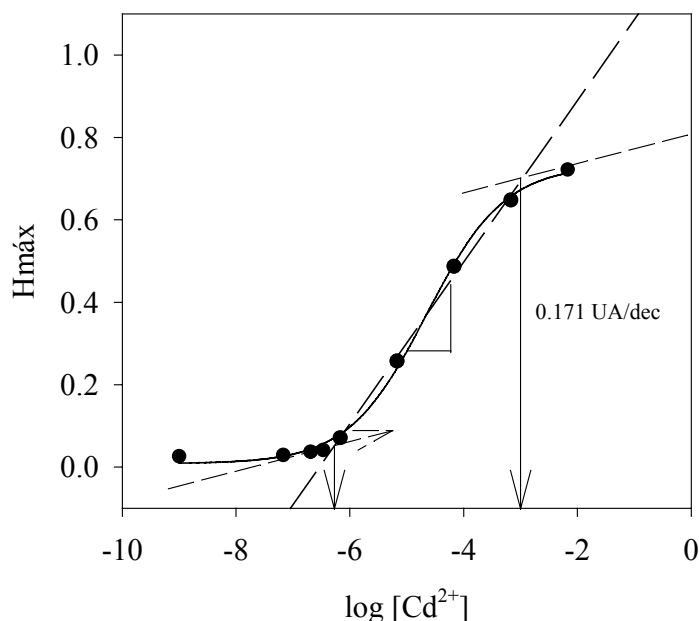
**Figura 2. 37:** Registros FIA obtenidos de la inyección por triplicado de 300  $\mu\text{L}$  de muestras de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$  de concentración diferente a un caudal de 2.5 mL/min.

#### 2.4.3.2 Parámetros de calidad

El propósito del presente estudio fue demostrar que la utilización del sensor desarrollado permite obtener una alta *sensibilidad* en un intervalo de concentraciones adecuado y tiempos de respuesta reducidos, a la vez que se mantienen invariables, respecto a la configuración convencional, otras características analíticas de la membrana, como la *selectividad* frente a otros iones.

Para optimizar el *límite de detección* de la membrana se realizó un estudio del pH de la disolución acondicionadora de acético/acetato entre valores que aseguraran tanto su capacidad tamponante como la presencia de iones cadmio libres en la disolución, capaces de complejar con el ionóforo en la membrana ( $\text{pH}=4.5-6$ ). Teóricamente, al aumentar el pH de la disolución se limita la cantidad de colorante capaz de ceder un protón, pero a la vez, se favorece la formación de la especie básica, por lo que es más fácil el intercambio iónico y disminuye el límite de detección. Los resultados obtenidos mostraron el desplazamiento de las curvas de calibración a concentraciones menores de cadmio a medida que aumentaba el pH de la disolución acondicionadora. No obstante, los límites de detección no variaron excesivamente debido a la interferencia de los iones presentes en el tampón de acetato de magnesio, por lo que el resultado final fue la reducción del intervalo lineal de respuesta del sensor. Existen otras alternativas que permitirían disminuir el límite de detección, como serían reducir la concentración de cromoionóforo de la membrana o utilizar un colorante más básico de esta misma familia. Para la composición particular ensayada y en las condiciones de flujo prefijadas,

se seleccionó el valor de pH=5.0 como óptimo. Este pH permitía obtener un bajo límite de detección ( $L.D=1.6 \times 10^{-7}$  M) y una alta sensibilidad (0.171 UA/dec) en una rango de concentración adecuado con fines medioambientales (**Figura 2. 38**).



**Figura 2. 38:** Calibrado ejemplo del sensor óptico en función de la concentración de cadmio. Los límites de detección se evaluaron gráficamente y la sensibilidad como la pendiente de la zona de respuesta lineal, como a lo largo de todo el trabajo.

En lo relativo a *sensibilidad*, la pendiente obtenida es muy superior a la encontrada mediante la configuración convencional con la misma membrana (0.063 UA/dec). Es importante remarcar que el aumento de sensibilidad obtenido con la nueva configuración plana es notorio debido a la longitud del camino óptico que proporciona la zona de guía cortada. En cambio, en la configuración convencional, el camino óptico viene determinado por el espesor de las membranas en la celda de flujo ( $2 \times 4 \mu\text{m}$ ).

Una vez optimizada la respuesta del sensor, se procedió a evaluar su *selectividad* frente a algunos iones alcalinos, alcalinotérreos y metales pesados. De entre los posibles métodos de determinación de interferencias, se seleccionó el que reproduce mejor la situación final de la medida analítica. Se utilizó el método de las disoluciones mixtas o de interferencia fija (FIM) que consiste en evaluar la respuesta de diversos patrones del analito, preparados en un fondo constante de ión interferente. Las curvas de calibración resultantes mostraron dos zonas claramente diferenciadas. Una zona plana en la que el sensor responde a la concentración de interferente y una zona lineal en la que el sensor responde a la concentración de cadmio. Los coeficientes de selectividad se calcularon por analogía a los electrodos selectivos de iones [71], teniendo en cuenta la concentración obtenida al extrapolar las dos zonas de respuesta obtenidas y la concentración del ión interferente.

En general, podríamos considerar la membrana propuesta como selectiva a ión cadmio frente a los iones alcalinos, alcalinotérreos y metales pesados testados, excepto para los iones plomo y cobre. La membrana detecta indistintamente iones cadmio y plomo en la composición propuesta, aunque es más selectiva de cadmio [67] como demuestra un valor negativo del logaritmo del coeficiente de selectividad ( $\log K_{Cd,Pb} = -0.76$ ). Pensando en su aplicación final y en los niveles de concentración en los que se pueden encontrar estos contaminantes, debe considerarse selectiva de ambos iones, tal y como previamente se reportó [79, 80]. Por otro lado, se observó una gran interferencia del ión cobre, que reacciona irreversiblemente con el cromóforo envenenando la membrana.

El *tiempo de vida de la membrana* depende de nuevo de la velocidad de descomposición de los componentes de la membrana. A lo largo de diversos calibrados, se observó una disminución de la señal. No obstante, cabe destacar que el tiempo de vida de la membrana ya no limita el *tiempo de vida del sensor* porque con el nuevo diseño propuesto, será posible reactivar fácilmente el chip transductor de forma reproducible, o bien utilizar transductores de un solo uso fácilmente intercambiables.

Se evaluó también la *reproducibilidad* de los sensores a partir la señal resultante de la inyección de una determinada concentración de cadmio para cuatro membranas diferentes, y teniendo en cuenta que la técnica de deposición empleada para reactivar el sensor no es la óptima se obtuvo una RSD aceptable (7.5 %).

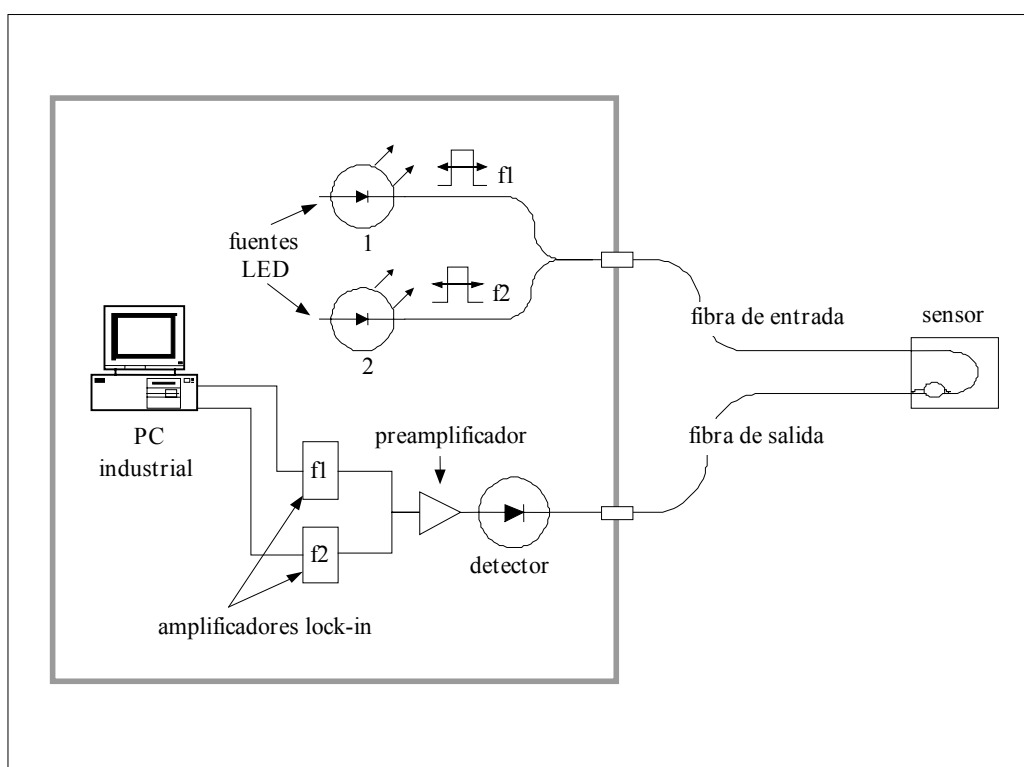
## 2.5 SITUACIÓN ACTUAL Y PERSPECTIVAS DE FUTURO

El trabajo presentado en esta memoria ha permitido demostrar la idoneidad de la nueva configuración plana del transductor, como plataforma versátil para el desarrollo de sensores ópticos de absorbancia, de excelentes propiedades desde el punto de vista de una alta sensibilidad, tiempos de respuesta reducidos, producción masiva y con posibilidad de disponer de sensores de un solo uso o fácilmente reactivables, reproducibles y fácilmente integrables en sistemas de flujo. No obstante, aún es posible explotar sus características si se optimizan tanto la deposición de las membranas ópticas utilizadas, como su composición y se realizan algunos cambios tecnológicos para dotarle de mayor portabilidad y robustez. Incluso parece factible aprovechar la tecnología empleada para la construcción de los sensores integrados de absorbancia, en desarrollar sensores ópticos basados en otros principios de interrogación, como la fluorescencia. A continuación se describen algunos de los trabajos que actualmente están en curso o se prevén abordar.

- Con el fin de mejorar la respuesta de la membrana modelo de cadmio presentada, para su posible aplicación en muestras reales, se formularán nuevas composiciones con colorantes de la misma familia de las cetocianinas y se escogerá aquél que permita mejorar la selectividad de la membrana frente al ión plomo y cobre.



- Basándose en el nuevo mecanismo de transductor intercambiable presentado, ya se ha diseñado un sistema completo de empaquetamiento del sensor que asegura su portabilidad y robustez al mismo tiempo que posibilita la sustitución en campo del chip *transductor*. De cara a una aplicación práctica del sensor optoquímico se precisa compactar la instrumentación asociada para dotar al sistema de robustez y portabilidad. En la **Figura 2. 39** se muestran todos los componentes que, además del sensor en sí, se van a incluir en el equipo de medida. Parte de los componentes ya han sido desarrollados en el Grupo de Espectroscopía y Fibras Ópticas de la Universidad de Zaragoza, encontrándose otros en fase de diseño. Está prevista la transferencia tecnológica de los desarrollos realizados en el marco de diferentes convenios de colaboración empresa-universidad.



**Figura 2. 39:** Esquema completo del futuro sistema de medida compacto para utilizar los sensores ópticos integrados basados en medidas de absorbancia.

La principal novedad que se observa en el esquema es el empleo de dos longitudes de onda ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ) en la fibra de entrada. La función de la segunda longitud de onda será proporcionar una señal de referencia, de modo que no será necesario volver a calibrar el sensor cada vez que se alteren las condiciones de medida. Para ello es imprescindible utilizar cromoforos con bandas de absorción estrechas y lo más cercanas a la longitud de onda de medida ( $\lambda_1$ ) y que no modifiquen sus propiedades espectroscópicas a la longitud de onda de referencia ( $\lambda_2$ ) (idealmente, la membrana debería ser transparente a esta longitud de onda).

Para poder separar las dos longitudes de onda, las fuentes LED se modularán a dos frecuencias diferentes  $f_1$  y  $f_2$ . En la detección se dispondrá de dos amplificadores *lock-in* (diseñados, como los anteriores, en el propio Grupo de Fibras Ópticas), cada uno de los cuales extraerá la señal a una de las dos frecuencias de modulación.

En cuanto al dispositivo sensor en sí, se le va a dotar de protección física mediante unas piezas de acero y teflón, que al mismo tiempo completan el mecanismo de alineamiento manual antes comentado (**Figura 2. 40**).

Las piezas (1) y (2) soportarán, respectivamente, la plataforma de conexión (3) sobre la cual se encajará el sensor y los canales en V (4) donde se pegarán las fibras ópticas. La pieza (1) dispondrá de un orificio que coincidirá con el de la plataforma de conexión, permitiendo el contacto de la disolución y la membrana de reconocimiento. Su parte trasera está diseñada para fijar un pequeño muelle y una pestaña que impidan que el *chip* del sensor se deslice una vez colocado en su posición. La pieza (2) poseerá unas aperturas en su parte frontal por donde saldrán las fibras ópticas desde los canales en V. Las piezas (1) y (2) se pegarán entre sí una vez alineadas, y el dispositivo se cerrará atornillando una tapa de teflón (5).

El proceso de detección se realizará mediante un diodo PIN de silicio, al que seguirá una etapa preamplificadora y los dos amplificadores *lock-in* antes mencionados. Los datos se procesarán desde un PC industrial, que controlará todo el proceso a través de una pantalla táctil.

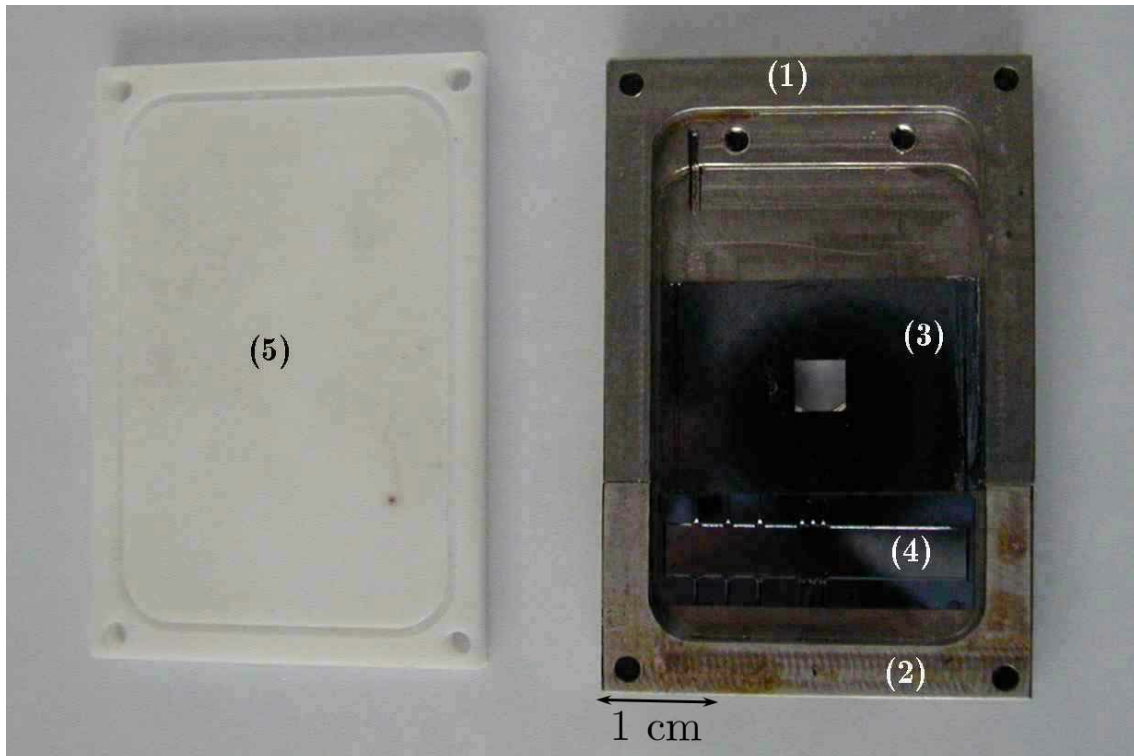
Tanto las fuentes LED como el sistema de detección y el PC industrial estarán integrados en un solo módulo, facilitando la portabilidad del equipo de medida.

- Sería interesante desarrollar un diseño que permita la integración de los sensores en microsistemas de gestión de líquidos, de forma que pudieran obtenerse microanalizadores automatizados. Se podría diseñar una metodología que permitiera la fabricación de microsistemas, que integraran simultáneamente tanto el sistema de gestión de fluidos como la estructura optoelectrónica de guiado del sensor, utilizando la tecnología IC.

- Otra posible línea de investigación sería la de estudiar la posible integración simultánea de múltiples sensores para la detección de diferentes parámetros en un mismo chip transductor.

- Aprovechando la tecnología empleada en el desarrollo de los sensores integrados de absorbancia y la experiencia en su caracterización, sería posible diseñar una plataforma sensora basada en guías de onda planas para realizar medidas de fluorescencia. Los colorantes caracterizados en la memoria presentan fluorescencia, por lo que resultarían moléculas excelentes para incorporar en las membranas de reconocimiento sobre los nuevos transductores de fluorescencia. No obstante, se debería realizar primero un estudio teórico que diera las claves de diseño para conseguir el confinamiento y direccionamiento de la radiación emitida hacia la fibra de recepción. En una primera aproximación se emplearían fibras de plástico para la recogida de la fluorescencia emitida por las membranas, y en los casos que la fibra de plástico

no fuera el sistema de recogida de luz ideal, por problemas de ataque químico o de temperatura, se utilizarían fibras multimodo de silicio. Posteriormente, una vez validado conceptualmente el nuevo transductor basado en fluorescencia, se desarrollarían guías de onda planas con tecnología optoelectrónica, análoga a la previamente utilizada por el grupo para la obtención de los sensores de absorbancia.



**Figura 2. 40:** Fotografía de la celda que protegerá los sensores ópticos

## 2.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dübendorfer, J.; Kunz, R. E.; Jobst, G.; Moser, I.; Urban, G. *Sensors and Actuators B*, **1998**, 50, 210-219
- [2] Wiki, M.; Gao, H.; Juvet, M.; Kunz, R. E. *Biosensors and Bioelectronics*, **2001**, 16 (1-2), 37
- [3] Wiki, M.; Kunz, R. E.; Voirin, G.; Tiefenthaler, K.; Bernard, A. *Biosensors and Bioelectronics*, **1998**, 13 (11), 1181-1185
- [4] Challener, W. A.; Edwards, J. D.; McGowan, R. W.; Skorjanec, J.; Yang, Z. *Sensors and Actuators B*, **2000**, 71, 42-46
- [5] Dostálek, J.; Čtyroký, J.; Homola, J.; Brynda, E.; Skalský, M.; Nekvindová, P.; Špirková, J.; Škvor, J.; Schröfel, J. *Sensors and Actuators B*, **2001**, 76, 8-12
- [6] Homola, J.; Yee, S.; Gauglitz, G. *Sensors and Actuators B*, **2000**, 54, 3-15
- [7] Slavík, R.; Homola, J.; Čtyroký, J. *Sensors and Actuators B*, **1998**, 51, 311-315
- [1] Qi, Z-M.; Matsuda, N.; Itoh, K.; Murabayashi, M.; Lavers, C. R. *Sensors and Actuators B*, **2002**, 81 (2-3), 254-258
- [2] Rowe, C. A.; Tender, L. M.; Feldstein, m. J.; Golden, J. P.; Scruggs, S. B.; MacCraith, B. D.; Cras, J. J.; Liegler, F. S. *Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 3846-3852
- [3] Lehmann, H.; Schwotzer, G.; Czerney, P.; Mohr, G. J. *Sensors and Actuators B*, **1995**, 29, 392-400
- [4] Hecht, H.; Kölling, M. *Sensors and Actuators B*, **2001**, 81, 76-82
- [5] Werner, T.; Klimant, I.; Huber, Ch.; Krause, Ch.; Wolfbeis, O. S. *Mikrochimica Acta*, **1999**, 131, 25-28
- [6] Stangelmayer, A.; Klimant, I.; Wolfbeis, O. S. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1998**, 362, 73-76
- [7] Ahmad, M.; Hamzah, H.; Sufliza Marsom, E. *Talanta*, **1998**, 47 (2), 275-283
- [8] Michael, K. L.; Taylor, L. C.; Schultz, S. L.; Walt, D. R. *Analytical Chemistry*, **1998**, 70, 1242
- [9] Vaughan, A. A.; Narayanaswamy, R. *Sensors and Actuators B*, **1998**, 51, 368-376
- [10] Hisamoto, H.; Kim, K-H.; Manabe, Y.; Sasaki, K.; Minamitani, H.; Suzuki, K. *Analítica Chimica Acta*, **1997**, 342, 31-39
- [11] Kim, K.; Minamitani, H.; Hisamoto, H.; Suzuki, K.; Kang, S. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 343, 199-208
- [12] Tóth, K.; Nagy, G.; Lan, B. T. T.; Jeney, J.; Choquette, S. J. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 353, 1-10
- [13] Saavedra, S.; Yang, L. *Analytical Chemistry*, **1995**, 67, 1307-1314
- [14] Garcés, I. *Tesis Doctoral*. Universidad de Zaragoza, **1996**
- [15] Benaissa, K.; Nathan, A. *Sensors and Actuators A*, **1998**, 65, 33-44
- [16] Kang, L.; Dessy, R. E. *Analytical Chemistry*, **1990**, 21, 377-388

- [17] Kovacs, G. T. A.; Petersen, K.; Albin, M. *Analytical Chemistry News & Features*, **1996**, 407A-412A
- [18] Encinas, C. *Trabajo de investigación*. Universidad Autónoma de Barcelona, **1998**
- [19] Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Reviews*, **1997**, 97, 3083-3132
- [20] März, R. En: *Integrated Optics: Design and Modeling*; Artech House Publishers: Boston, **1994**, Capítulo 3
- [21] Moreno, M.; Domínguez, C.; Muñoz, F.; Calderer, J.; Morante, J. R. *Sensors and Actuators A*, **1997**, 62, 524-528
- [22] Moreno, M.; Garcés, I.; Muñoz, J.; Domínguez, C.; Calderer, J.; Villuendas, F.; Pelayo, J. En: Vicencini, P.; Righini, G. *Advances in Science and Technology: advanced materials in optics, electrooptics and communication technologies*; Techna: Faenza, Italia, **1995**, vol. 11, pp. 465-472
- [23] Moreno, M.; Muñoz, J.; Garrido, B.; Samitier, J.; Calderer, J.; Domínguez, C. En: *Advances in science and technology: Advances in inorganic films and coatings*, Vol. 5. Faenza: P. Vincencini, **1995**. pp. 149-154
- [24] Domínguez, C.; Muñoz, J.; González, R.; Tudanca, M. *Sensors and Actuators A*, **1993**, 37-38, 779-783
- [25] O'Haver, T. C. *Chemical Instrumentation*, **1972**, 49 (3), A131-A134
- [26] O'Haver, T. C. *Chemical Instrumentation*, **1972**, 49, (4), A211-A222
- [27] Seiler, k. *Ion-Selective Optode Membranes*. Buchs, Switzerland: Fluka Chemie AG, **1993**
- [28] Puyol, M. *Trabajo de investigación*. Universidad Autónoma de Barcelona, **1998**
- [29] Olsen, E. D. En: *Métodos ópticos de análisis*. Barcelona: REVERTÉ, S. A., **1990**. pp. 216-217
- [30] Piel, J-P.; Lecat, J-H.; Stehlé, J-L. En: Bernoux, F. *Techniques de l'Ingénieur, Traité Mesures et Contrôle*. Paris: **1990**. Report R-6490, pp.1-16
- [31] Laguarda, F.; Artigas, R.; Pintó, A.; Al-Khatib, I. *SPIE*, **1998**, 3520, 149-160
- [32] Artigas, R.; Pintó, A.; Laguarda, F. *SPIE*, **1999**, 3824, 93-104
- [33] Fabian, J. *Chemical Reviews*, **1992**, 92, 1197-1226
- [34] Fry, D. J. En: S. Coffey (ed.), *Rodd's Chemistry of Carbon Compounds*; Elsevier: New York, **1977**, Capítulo 15
- [35] Beretta, P.; Jaboli, A. *Photographic Science and Engineering*, **1974**, 18, 197-206
- [36] Herz, A. H. *Photographic Science and Engineering*, **1974**, 18, 207-215
- [37] Patonay, G.; Casay, G.A.; Lipowska, M.; Strekowski, L. *Talanta*, **1993**, 40, 935-942
- [38] Feldman, L. H.; Herz, A. H.; Regan, T. H. *The Journal of Physical Chemistry*, **1968**, 72, 2008-2013
- [39] Boyer, A. E.; Devanathan, S.; Hamilton, D.; Patonay, G. *Talanta*, **1992**, 39, 505-510
- [40] Kasatani, K.; Sato, H. *Bulletin of Chemical Society of Japan*, **1996**, 69, 3455-3460
- [41] Sturmer, D. M. En: Kirk-Othmer. *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol.7, John Wiley & Sons, Inc: New York, **1979**, pp.335-358

- [42] Balogh, I. S.; Maga, I. M.; Hargitai-Tóth, A.; Andruch, V. *Talanta*, **2000**, 53, 543-549
- [43] Pivovarenko, V. G.; Klueva, A. V.; Doroshenko, A. O.; Demchenko, A. P. *Chemical Physics Letters*, **2000**, 325, 389-398
- [44] Tarazi, L.; George, A.; Patonay, G.; Streckowski, L. *Talanta*, **1998**, 46, 1413-1424
- [45] Citterio, D.; Rásonyi, S.; Spichiger, U. E. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1996**, 354, 836-840
- [46] Lindauer, H.; Czerney, P.; Mohr, G. J.; Grummt, U-W. *Dyes and Pigments*, **1994**, 26, 229-235
- [47] Šimon, P.; Secretar, S.; MacCraith, B. D.; Kvasnik, F. *Sensors and Actuators B*, **1997**, 38-39, 252-255
- [48] Knott, E. B. *Part I, Journal of Chemical Society*, **1951**, pp.1024-1030
- [49] Shiozaki, H.; Nakazumi, H.; Nakado, Y.; Kitao, T. *Chemistry Letters*, **1987**, 2393-2396
- [50] Schrauer, G. N.; Mayweg, P. *Journal of the American Chemical Society*, **1965**, 87, 1483-1489
- [51] Nakazumi, H.; Hamada, E.; Ishiguro, T.; Shiozaki, H.; Kitao, T. *Journal of the Society of Dyers and Colorists*, **1989**, 105, 26-29
- [52] Nakazumi, H.; Shiozaki, H.; Kitao, T. *Chemistry Letters*, **1989**, 1027-1030
- [53] Miltsov, S.; Encinas, C.; Alonso, J. *Tetrahedron Letters*, **1998**, 9253-9254
- [54] Miltsov, S.; Encinas, C.; Alonso, J. *Tetrahedron Letters*, **2001**, 6129-6131
- [55] Lifshits, É. B.; Karpova, Y. M.; Ushomirskii, M. N. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **1990**, 9, 1071-1078
- [56] Brooker, L. G. S.; White, F. L.; Sprague, R. H. *Journal of American Chemical Society*, **1951**, 73, 1087-1093
- [57] Eugster, R.; Rosatzin, T.; Rusterholz, B.; Aebersold, B.; Pedrazza, U.; Rüegg, D.; Schmid, A.; Spichiger, U. E. *Analytica Chimica Acta*, 1994, 289, 1-13
- [58] Broker, L. G. S.; White, F. L.; Keyes, G. H.; Smyth, C. P.; Oesper, P. F. *Journal of American Chemical Society*, **1941**, 63, 3192-3202
- [59] Kometani, N.; Nakajima, H.; Asami, K.; Yonezawa, Y.; Kajimoto, O. *Chemical physics Letters*, **1998**, 294, 619-624
- [60] García-Jiménez, F.; Khramov, M. I.; Sánchez-Obregón, R.; Collera, O. *Chemical Physics Letters*, **2000**, 331, 42-46
- [61] Lipowska, M.; Patterson, S. E.; Patonay, G. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **1993**, 30, 1177-1180
- [62] Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chemical Reviews*, **1998**, 98, 1593-1687
- [63] Casarett, D. *Toxicology: The Basic Science of Poisons*, 5th ed.; MacGraw-Hill: New York, **1996**
- [64] Katzung, B. G. *Basic and Clinical Pharmacology*, 3<sup>rd</sup> ed.; Appleton and Lauge: Norwalk, CT, **1987**

- [65] The Fertilizer Industry of the European Industry. *Agriculture, Fertilizers and the Environment*; EFMA: Brussels, **1997**
- [66] Directive 86/278/EEC.  
[http://europa.eu.int/comm/environment/sludge/sludge\\_disposal2.pdf](http://europa.eu.int/comm/environment/sludge/sludge_disposal2.pdf)
- [67] Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Analytical Chemistry*. **1992**, 64, 1534-1540
- [68] Bakker, E.; Willer, M.; Pretsch, E. *Analytica Chimica Acta*, **1993**, 282, 265-271
- [69] Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Reviews*, **1997**, 97, 3083-3132
- [70] Ruzicka, J.; Hansen, E. H. *Flow Injection Analysis*, John Wiley & Sons, Inc.: USA, **1988**
- [71] Bakker, E. *Analytica Chimica Acta*, **1997**, 350, 329-340
- [72] Hisamoto, H.; Satoh, S.; Satoh, K.; Tsubuku, M.; Siswanta, D.; Shichi, Y.; Koike, Y.; Suzuki, K. *Analytica Chimica Acta*. **1999**, 396, 131-141
- [73] Sotomayor, P. T.; Raimundo Jr., I. M.; Neto, G. de O.; de Oliveiira, W. A. *Sensors and Actuators B*, **1998**, 51, 382-390

## **CONCLUSIONES GENERALES**

---



## CONCLUSIONES GENERALES

---

Los resultados obtenidos en las diversas etapas del trabajo descrito en la presente tesis confirmaron la validez del diseño conceptual inicial. Su concreción experimental ha permitido desarrollar un nuevo tipo de transductor óptico integrado que ha demostrado su idoneidad como plataforma versátil para la obtención de sensores ópticos basados en medidas de absorbancia. El dispositivo presenta excelentes propiedades analíticas como, una alta sensibilidad, tiempos de respuesta reducidos, buena reproducibilidad y una gran versatilidad para su posible uso en la detección de diversos analitos en función de la membrana óptica formulada. Así mismo, esta dotado de robustez, portabilidad, y capacidad de fabricación automática y masiva a bajo coste. Las conclusiones a las que se llegó se presentan siguiendo el esquema de objetivos inicial. De este modo, las referentes a la caracterización espectroscópica de una membrana óptica modelo como herramienta de validación del nuevo concepto de sensor óptico, de configuración plana, y de su respuesta fueron las siguientes:

- Se definieron las condiciones óptimas de trabajo de una membrana óptica selectiva de ión potasio para lograr la máxima sensibilidad (0.1 UA/dec) en un rango de trabajo lineal idóneo ( $1 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-1}$ M). Para ello se comprobó que las soluciones que contienen el analito debían ser tamponadas con una disolución de tampón acético/acetato 0.05 M, ajustada a pH=5.5. Se estableció un caudal óptimo para realizar las medidas en continuo de 3 mL/min.
- Se examinó la dependencia del tiempo de vida de las membranas ópticas en función de la irradiación de las fuentes de luz, que provocaban la fotodescomposición del cromoforo empleado (ETH 5294). Se determinó una disminución de la sensibilidad, evaluada como la pendiente de la recta de calibración, de un 10% en cada calibración.
- Se realizó un diseño experimental para predecir el grosor de las capas depositadas por la técnica de rotación controlada. Las condiciones óptimas de deposición de capas de un grosor de 4  $\mu$ m fueron de 100  $\mu$ L de cóctel sensor, sobre un sustrato a una velocidad de rotación 2000 rpm y una aceleración de 20  $\text{m/s}^2$  durante 1 minuto. Con estas membranas se establecieron tiempos de respuesta del orden de 1 minuto.

Una vez se dispuso de un procedimiento experimental adecuado, se procedió a la caracterización, evaluación y validación de la respuesta del sensor óptico basado en estructuras planas rectas de guiado. El nuevo concepto de sensor quedó plasmado experimentalmente en una microconfiguración plana optoelectrónica en la que la transmisión de luz se verifica a través de la membrana, en la dirección transversal a la dirección de difusión de los analitos entre la disolución y la membrana. En el proceso de fabricación y dependiendo de la longitud de la zona de guía cortada entre las guías de entrada y salida, queda fijado un camino óptico, que es independiente del grosor de la membrana.

De la comparación de los resultados obtenidos en la caracterización espectroscópica de la membrana óptica selectiva a potasio, utilizando tanto la configuración convencional como el sensor desarrollado en este trabajo, pudo concluirse que:

- Gracias a la novedosa configuración del sensor construido, se consigue la resolución de los problemas de sensibilidad que presentan los dispositivos miniaturizados basados en medidas de absorbancia. La sensibilidad se aumentó notablemente (0.9 UA/dec) sin incrementar paralelamente, y de forma inaceptable, el tiempo de respuesta ( $\approx 1$  min.).
- Se evitaron los problemas derivados de interferencias (absorbancia o turbidez) de la matriz de la muestra, debido a que el haz de luz no atraviesa la disolución.
- Las dimensiones reducidas del dispositivo hicieron que pudiera plantearse la fabricación de configuraciones multisensoras. Además, la tecnología microelectrónica utilizada permite asegurar la posibilidad de automatizar los procesos de fabricación, abaratando drásticamente el coste por unidad (1€).

En relación con el estudio y la formulación de membranas poliméricas y sol-gel que incorporaban cromoforos NIR, sintetizados en el GSB, sensibles al ión protón (indicadores de pH), pudo resolverse que:

- Los resultados obtenidos con heptametincianinas funcionalizadas, en membranas de PVC no fueron satisfactorios debido a la inestabilidad de estas, derivada tanto de la formación de agregados como de su exudación de la membrana. Las no funcionalizadas, en cambio, resultaron ser estables aunque implicaban equilibrios ácido/base excesivamente lentos y con valores de pKa demasiado elevados para su utilización en condiciones óptimas de trabajo (valores de pH cercanos a la neutralidad).
- Los resultados obtenidos con heptametincianinas en matrices sol-gel tampoco fueron adecuados, puesto que o no fueron estables en las primeras etapas de reacción para dar lugar a la formación del gel, o descomponían durante el proceso de secado. Solamente pudo caracterizarse la respuesta de pH de una membrana que incorporaba una heptametincianina no funcionalizada (C1), pero su estabilidad también se vio comprometida al exudar a la disolución.
- En cuanto al estudio de una metodología de deposición de capas sol-gel de un grosor de 4  $\mu\text{m}$ , susceptibles de ser integradas como elemento de reconocimiento de los sensores desarrollados, se testaron dos técnicas: la técnica por inmersión directa y la técnica de rotación controlada. Ninguna de ellas demostró ser idónea para depositar capas sin roturas en las condiciones experimentales testadas (distinta  $r_{\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}:\text{TEOS}}$ , distinto catalizador y pH de reacción, y distinto  $t_{\text{gel}}$ ) con los precursores utilizados (TEOS y MTES), por lo que se descartó la utilización del material sol-gel para el desarrollo de las membranas como elementos de reconocimiento de los sensores integrados.
- Se formularon diversas membranas poliméricas que incorporaban otros cromoforos NIR sensibles a protón de la familia de las cetocianinas. Su caracterización

espectroscópica (estabilidad química y fotoquímica, posición de bandas, respuesta a pH, pKa, tiempo de respuesta) demostró su excelente comportamiento analítico. Se obtuvieron membranas completamente reversibles, de alta sensibilidad (0.03-0.40 UA/dec) y respuesta rápida (del orden de minutos) y reproducible ( $RSD_{n=4} < 8\%$ ).

Para aprovechar las características de respuesta óptimas de las membranas poliméricas desarrolladas, que incorporaban cetocianinas como cromoforos de protón, éstas se incorporaron como elemento de reconocimiento de sensores ópticos integrados.

- Se comprobó que los sensores integrados basados en guías de onda planas son una perfecta alternativa a los sensores de configuración convencional. Respecto a los sistemas convencionales basados en medidas de absorbancia, estos dispositivos confieren una mejor sensibilidad (0.06-0.96 UA/dec) sin afectar al tiempo de respuesta (del orden de minutos), dotan de robustez y portabilidad al sistema óptico, y permiten la fabricación masiva reduciendo costes de la instrumentación asociada.

Finalmente se diseñó y construyó una plataforma versátil, viable para el desarrollo de dispositivos sensores basados en óptica integrada, para la determinación selectiva de diferentes analitos.

- Se diseñó un prototipo de sensor óptico basado en guías de onda planas curvas para realizar medidas de absorbancia en el que chip transductor fuera intercambiable o de fácil reactivación por técnicas de deposición reproducibles.
- Se formuló y caracterizó una membrana modelo selectiva de ión cadmio compuesta por la combinación de una de las cetocianinas (5ee) evaluadas previamente en un sensor integrado, con un ionóforo comercial (ETH 5435) selectivo de cadmio. Se demostró la viabilidad de las cetocianinas, como indicadores de pH sensibles, para el desarrollo de membranas ópticas selectivas de iones en combinación con determinados ionóforos.
- Se diseñó un sistema de análisis por inyección en flujo como metodología simple, automática y reproducible para la caracterización de las membranas desarrolladas, y se integró el sensor basado en guías curvas como detector.
- Se caracterizó la respuesta de las membranas selectivas de cadmio en los nuevos sistemas ópticos de medida y se demostraron las ventajas inherentes de la nueva configuración sensora. La sensibilidad se realzó (0.17 UA/dec) sin incrementar el tiempo de respuesta en relación con otras membranas y otros sistemas de medida convencionales que emplean el mismo ionóforo (0.06 UA/dec) y se mantuvieron invariables las demás propiedades analíticas (selectividad).

**ANEXO I**

**INTEGRATED WAVEGUIDE ABSORBANCE OPTODE  
FOR CHEMICAL SENSING**

---

*Analytical Chemistry*, **1999**, 71, 5037-5044

Mar Puyol, Manel del Valle, Ignacio Garcés, Francisco Villuendas, Carlos Domínguez,  
Julián Alonso

## **ANEXO II**

### **INMOVILIZACIÓN DE HEPTAMETINCIANINAS EN MATRICES DE PVC Y SOL-GEL PARA SU USO EN OPTODOS INTEGRADOS DE GUÍAS DE ONDA BASADOS EN MEDIDAS DE ABSORBANCIA**

---

**KETOCYANINE DYES: H<sup>+</sup>-SELECTIVE IONOPHORES FOR USE IN INTEGRATED  
WAVEGUIDES ABSORBANCE OPTODES**

---

*Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 570-576

Mar Puyol, Serguei Miltsov, Iñigo Salinas, Julián Alonso

**IMPROVED INTEGRATED WAVEGUIDE ABSORBANCE OPTODES FOR  
ION-SELECTIVE SENSING**

---

*Analytical Chemistry*, **2002**, 74, 3354-3361

Mar Puyol, Iñigo Salinas, Ignacio Garcés, Francisco Villuendas, Andreu Llobera,  
Carlos Domínguez, Julián Alonso

## **ANEXO V**

### **PROGRAMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS**

---



## CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA

```
500,700,10,1000
500,300,2,0
1,9600,8,"None","1","None"
2,9600,8,"None","1","None"
```

## MODULE 1 (procedimientos compartidos)

```
Global salir, Index As Integer
Global FileName As String
Global BDNAMe As String
Global LCK, oplaser As Integer
Global DA$, Z$
Global lamini, lamfin, numpuntos, incr, Tesp As Integer
Global laminic, lamfinc, incrc, Tespc As Integer
Global lamb, incv As Integer
Global tiempoint, sensib As Integer
Global guardarMed1, guardarMed2, cargar As Integer
Global con, intcalc As Integer
Global referen(), med1(), med2(), As Double
Global abs1(), p1(), p2(), ploade(), abs2(), absloade(),
blanco As Double
Global puertoM, baudM, bitdatM, paridadM, bitspM, flujoM As
String
Global puertoL, baudL, bitdatL, paridadL, bitspL, flujoL,
phase, freq, ampl As String
Global tipo, Numpfitx As Integer
Global final, A, B, res(), res2(), resload(), max1, low1 As
Single
```

## PORTFORM

```
Sub baudlistL_Change ()
End Sub

Sub baudlistM_Change ()
End Sub
Sub bitdatlistL_Change ()
End Sub
Sub bitdatlistM_Change ()
End Sub
```

```
Sub bitparlistL_Change ()
End Sub

Sub bitparlistM_Change ()
End Sub
Sub FlujolistL_Change ()
End Sub

Sub FlujolistM_Change ()
End Sub

Sub Form_Load ()
PortlistM.AddItem CStr(1)
PortlistM.AddItem CStr(2)
PortlistM.AddItem CStr(3)
PortlistM.AddItem CStr(4)
PortlistM.Text = CStr(PuertoM)
baudlistM.AddItem CStr(110)
baudlistM.AddItem CStr(300)
baudlistM.AddItem CStr(600)
baudlistM.AddItem CStr(1200)
baudlistM.AddItem CStr(2400)
baudlistM.AddItem CStr(4800)
baudlistM.AddItem CStr(9600)
baudlistM.AddItem CStr(19200)
baudlistM.Text = CStr(baudM)
bitdatlistM.AddItem CStr(4)
bitdatlistM.AddItem CStr(5)
bitdatlistM.AddItem CStr(6)
bitdatlistM.AddItem CStr(7)
bitdatlistM.AddItem CStr(8)
bitdatlistM.Text = CStr(bitdatM)
parlistM.AddItem "Par"
parlistM.AddItem "Impar"
parlistM.AddItem "None"
parlistM.Text = paridadM
bitparlistM.AddItem CStr(1)
bitparlistM.AddItem CStr(1.5)
bitparlistM.AddItem CStr(2)
```

```

bitparlistM.Text = CStr(bitspM)
flujolistM.AddItem "None"
flujolistM.AddItem "Xon/Xoff"
flujolistM.AddItem "RTS"
flujolistM.AddItem "RTS & Xon/Xoff"
flujolistM.Text = flujoM
PortlistL.AddItem CStr(1)
PortlistL.AddItem CStr(2)
PortlistL.AddItem CStr(3)
PortlistL.AddItem CStr(4)
PortlistL.Text = CStr(PuertoL)
baudlistL.AddItem CStr(110)
baudlistL.AddItem CStr(300)
baudlistL.AddItem CStr(600)
baudlistL.AddItem CStr(1200)
baudlistL.AddItem CStr(2400)
baudlistL.AddItem CStr(4800)
baudlistL.AddItem CStr(9600)
    baudlistL.AddItem CStr(19200)
    baudlistL.Text = CStr(baudL)
    bitdatlistL.AddItem CStr(4)
    bitdatlistL.AddItem CStr(5)
    bitdatlistL.AddItem CStr(6)
    bitdatlistL.AddItem CStr(7)
    bitdatlistL.AddItem CStr(8)
    bitdatlistL.Text = CStr(bitdatL)
    parlistL.AddItem "Par"
    parlistL.AddItem "Impar"
    parlistL.AddItem "None"
    parlistL.Text = paridadL
    bitparlistL.AddItem CStr(1)
    bitparlistL.AddItem CStr(1.5)
    bitparlistL.AddItem CStr(2)
    bitparlistL.Text = CStr(bitspL)
    flujolistL.AddItem "None"
    flujolistL.AddItem "Xon/Xoff"
    flujolistL.AddItem "RTS"
    flujolistL.AddItem "RTS & Xon/Xoff"
    flujolistL.Text = flujoL
End Sub

```

```

Sub Frame3D1_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub

```

```

Sub Framepuerto_DragDrop (Source As Control, X As
Single, Y As Single)
End Sub

```

```

Sub ParlistL_Change ()
End Sub

```

```

Sub ParlistM_Change ()
End Sub

```

```

Sub PortlistL_Change ()
End Sub

```

```

Sub PortlistM_Change ()
End Sub

```

```

Sub Text1_Change (Index As Integer)
End Sub

```

### **FORM 1 (menú inicio)**

```
' escoge modo espectro
```

```

Sub espec_Click ()
tipo = 1
principal.Show
End Sub

```

```

Sub exit_Click ()
End
End Sub

```

```

Sub Form_Load ()
End Sub

```

```

Sub Image2_Click ()
End Sub

```

```
Sub Label1_Click ()
End Sub
```

```
Sub Label2_Click ()
End Sub
```

```
Sub Label3_Click ()
End Sub
```

```
Sub Picture1_Click ()
End Sub
```

```
' escoge modo registro
Sub reg_Click ()
tipo = 2
principal.Show
End Sub
```

### **MONOCFOR**

```
Sub Form_Load ()
    laminiTB.Text = CStr(laminic)
    lamfinTB.Text = CStr(lamfinc)
    incTB.Text = CStr(incrc)
    TespTB.Text = CStr(Tespc)
End Sub
```

```
Sub Framemedida_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub
```

```
Sub incTB_Change ()
End Sub
```

```
Sub Label2_Click (Index As Integer)
End Sub
Sub lam_Click (Index As Integer)
End Sub
```

```
Sub lamfinTB_Change ()
End Sub
```

```
Sub laminiTB_Change ()
End Sub
```

```
Sub TespTB_Change ()
End Sub
```

### **MAIN (menú principal)**

```
Option Explicit
Dim i, j, k As Integer
Dim lamact, lnow, contasi, contapbs, convez As
Integer
Dim mododib As Integer
Dim conmatriz As Integer
Dim mbl, inc As Single
```

```
Sub acab_Click ()
    Framemedida2.Enabled = False
    lamb = CInt(lon.Text)
If oplaser = False Then
    inimonoc
    retromonoc
    espera (15)
    posmonoc (lamb)
    espera (CInt(8 * lamb / 500))
End If
    Opción.Visible = False
    Optionref.Enabled = True
    optionmed1.Enabled = True
    optionmed2.Enabled = True
    Beep
End Sub
```

```

Sub afase_Click ()
Z$ = "APHS"
CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)

End Sub

Sub again_Click ()
Z$ = "AGAN"
CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
espera (4)
Z$ = "SENS?"
CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
espera (.1)
da$ = CommLockin.Input
sensib = CInt(da$)
presensens (sensib)
End Sub

Sub areserve_Click ()
Z$ = "ARSV"
CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
End Sub

Sub Borr_Click ()
Picture1.Cls
timermed3.Enabled = False
timermed4.Enabled = False
If optionmed1.Value = True Then
For j = 0 To Numpuntos
Grid1.Row = j + 1
Grid1.Col = 0
Grid1.Text = ""
Grid1.Col = 1
Grid1.Text = ""
Next j
End If
If optionmed2.Value = True Then
For j = 0 To Numpuntos
Grid1.Row = j + 1
Grid1.Col = 2
Grid1.Text = ""

```

```

Grid1.Col = 3
Grid1.Text = ""
Next j
End If
If Representar.Value = True Then
For j = 0 To Numpuntos
Grid1.Row = j + 1
Grid1.Col = 4
Grid1.Text = ""
Grid1.Col = 5
Grid1.Text = ""
Next j
End If
medir_bot.Value = False
Framemedida2.Visible = True
Framemedida2.Enabled = True
Optionref.Enabled = False
optionmed1.Enabled = False
optionmed2.Enabled = False
lon.Text = CSng(lamb)
tiemf.Text = CStr(final)
model.Text = CStr(max1)
model2.Text = CStr(low1)
Form_paint
End Sub

Sub CommLockin_OnComm ()
End Sub

Sub CommMonoc_OnComm ()
End Sub

Sub E0Command_Click ()
Dim A, B As String
A = "E0"
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (1)
B = CommMonoc.Input
End Sub

```

```

Sub ElCommand_Click ()
Dim A, B As String
A = "E1"
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (.5)
B = CommMonoc.Input
End Sub

```

```

Sub EnvOrd3D_Click (Value As Integer)
Dim A, B As String
If Value = True Then
A = OrdenMonocText.Text
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (.1)
B = CommMonoc.Input
End If
EnvOrd3D.Value = False
End Sub

```

```

Sub Form_Load ()
Dim A, i As Integer
Dim paridad, texto As String
'Lee configuración por defecto
Open "c:\control\config.ini" For Input As #7
Input #7, laminic, lamfinc, incrc, Tespc
Input #7, lamb, final, max1, low1
Input #7, PuertoM, baudM, bitdatM, paridadM, bitspM, flujoM
Input #7, PuertoL, baudL, bitdatL, paridadL, bitspL, flujoL
'Input #7, phase, freq, ampl
Close #7

```

```

Select Case tipo
Case 1
Framemedida2.Visible = False
Framemedida2.Enabled = False
Opción.Visible = False
Opción.Enabled = False
Picture1.Visible = False
Text1.Visible = False
Text2.Visible = False

```

```

Text3.Visible = False
Text8.Visible = False
Text9.Visible = False
Text10.Visible = False
Text4.Visible = False
Text5.Visible = False
Text6.Visible = False
Text7.Visible = False
Label7.Visible = False
Label16.Visible = False
Borr.Visible = False
Borr.Enabled = False
Redib.Enabled = False
Redib.Visible = False
rad.Enabled = False
rad.Visible = False
Representar.Visible = False
Representar.Enabled = False
laminiTB.Text = CStr(laminic)
lamfinTB.Text = CStr(lamfinc)
inctTB.Text = CStr(incrc)
TespTB.Text = CStr(Tespc)
Numpuntos = (lamfinc - laminic) / incrc
Grid1.Col = 0
Grid1.Row = 0
Grid1.Text = "lamda"
Grid1.Col = 1
Grid1.Text = "Med1"
Grid1.Col = 2
Grid1.Text = "Med2"
Grid1.Col = 3
Grid1.Text = "Fich."
'Configura el puerto del monocromador
If paridadM = "Par" Then
paridad = "e"
ElseIf paridadM = "Impar" Then
paridad = "o"
Else
paridad = "n"
End If

```

```

CommMonoc.CommPort = CInt(PuertoM)
texto = CStr(baudM) + "," + paridad + "," + CStr(bitdatM) +
"," + CStr(bitsspM)
CommMonoc.Settings = texto
If flujoM = "None" Then
CommMonoc.Handshaking = 0
ElseIf flujoM = "Xon/Xoff" Then
CommMonoc.Handshaking = 1
ElseIf flujoM = "RTS" Then
CommMonoc.Handshaking = 2
Else
CommMonoc.Handshaking = 3
End If

Case 2
framemedida.Visible = False
framemedida.Enabled = False
MonocFrame.Visible = False
MonocFrame.Enabled = False
ReprFrame3D.Visible = False
ReprFrame3D.Enabled = False
Optionref.Caption = "Blanco"
Optionref.Enabled = False
optionmed1.Enabled = False
optionmed2.Enabled = False
Gaugel.Visible = False
Shape4.Visible = False
ProgressLabel.Visible = False
frameboton.Top = 4920
frameboton.Left = 0
Framemedida2.Visible = False
lon.Text = CStr(lamb)
model.Text = CStr(max1)
model2.Text = CStr(low1)
tiemf.Text = CSng(final)
Grid1.Col = 0
Grid1.Row = 0
Grid1.Text = "time1"
Grid1.Col = 1
Grid1.Text = "Med1"

```

```

Grid1.Col = 2
Grid1.Text = "time2"
Grid1.Col = 3
Grid1.Text = "Med2"
Grid1.Col = 4
Grid1.Text = "Tfich."
Grid1.Col = 5
Grid1.Text = "Afich"
End Select

'Configura el puerto del Lock-In
If paridadL = "Par" Then
paridad = "e"
ElseIf paridadL = "Impar" Then
paridad = "o"
Else
paridad = "n"
End If
CommLockin.CommPort = CInt(PuertoL)
texto = CStr(baudL) + "," + paridad + "," +
CStr(bitdatL) + "," + CStr(bitsspL)
CommLockin.Settings = texto

If flujoL = "None" Then
CommLockin.Handshaking = 0
ElseIf flujoL = "Xon/Xoff" Then
CommLockin.Handshaking = 1
ElseIf flujoL = "RTS" Then
CommLockin.Handshaking = 2
Else
CommLockin.Handshaking = 3
End If

'Establece comunicación con el Lock-In
CommLockin.PortOpen = True
On Error Resume Next
Z$ = "SENS?" 'Lee y presenta la sensibilidad
CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
espera (.1)
da$ = CommLockin.Input

```

```

sensib = CInt(da$)
presensens (sensib)
Z$ = "OFLT?" 'Lee y presenta el tiempo de integración
CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
espera (.1)
da$ = CommLockin.Input
tiempoint = CInt(da$)
presentime (tiempoint)
A = CInt(medida())
'Z$ = "PHAS?"
'CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
'Z$ = "FREQ?"
'CommLockin.Output = Z$ + Chr(13)
End Sub

```

```

Sub Frameboton_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub

```

```

Sub Framemedida_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub

```

```

Sub Framemedida2_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub

```

```

Sub Gauge1_Change ()
End Sub

```

```

Sub Graph1_Click ()
End Sub

```

```

Sub Grid1_Click ()
End Sub

```

```

Sub guardarTB_Change ()
End Sub
Sub incTB_Change ()
End Sub

```

```

Sub Label1_Click (Index As Integer)
End Sub

```

```

Sub Label16_Click ()
End Sub

```

```

Sub Label2_Click (Index As Integer)
End Sub

```

```

Sub Label3_Click (Index As Integer)
End Sub

```

```

Sub Label4_Click ()
End Sub

```

```

Sub Label5_Click ()
End Sub

```

```

Sub Label6_Click ()
End Sub

```

```

Sub Label7_Click ()
End Sub

```

```

Sub lam_Click (Index As Integer)
End Sub

```

```

Sub lamfinTB_Change ()
End Sub

```

```

Sub laminiTB_Change ()
End Sub

```

```

Sub lockin_Click ()
Dim j As Double
j = medida()
End Sub

```

```

Sub lon_KeyPress (KeyAscii As Integer)
If (KeyAscii = 13) Then
tiemf.SetFocus
End If
End Sub

Sub low_Click ()
End Sub

Sub max_Click ()
End Sub

Sub medir_bot_Click (Value As Integer)
If Value = False Then Exit Sub
Select Case tipo
Case 1
timermed3.Enabled = False
timermed4.Enabled = False
timerref.Interval = CInt(TespTB.Text)
Timermed1.Interval = CInt(TespTB.Text)
Timermed2.Interval = CInt(TespTB.Text)
lamini = CInt(laminiTB.Text): lamfin = CInt(lamfinTB.Text)
incr = CInt(incTB.Text): Tesp = CInt(TespTB.Text)
Numpuntos = (lamfin - lamini) / incr
ReDim Preserve abs1(Numpuntos), abs2(Numpuntos),
absloaded(Numpuntos)
ReDim Preserve med1(Numpuntos), med2(Numpuntos),
Referen(Numpuntos)
If guardarTB.Text <> "" Then Open guardarTB.Text For Output
As #8
Gauge1.Value = 0
ProgressLabel.Caption = "0 %"
ProgressLabel.Refresh
inimonoc
retromonoc
espera (20)
posmonoc (lamini)
lnow = lamini
espera (15)
conmatriz = 0

```

```

If Optionref.Value = True Then
timerref.Enabled = True
ElseIf optionmed1.Value = True Then
Timermed1.Enabled = True
ElseIf optionmed2.Value = True Then
Timermed2.Enabled = True
End If
Case 2
Dim i As Integer
Timermed1.Enabled = False
Timermed2.Enabled = False
Framemedida2.Visible = False
Opción.Visible = False
lamb = CInt(lon.Text)
final = CSng(tiemf.Text)
max1 = CSng(model.Text)
low1 = CSng(model2.Text)
ReDim Preserve abs1(500), abs2(500)
ReDim Preserve med1(500), med2(500)
If Optionref.Value = True Then
Screen.MousePointer = 11
mbl = 0
For i = 0 To 9
mbl = mbl + medida()
Next i
blanco = mbl / 10
frameboton.Visible = True
optionmed1.Enabled = True
optionmed2.Enabled = True
Optionref.Enabled = True
medir_bot.Value = False
Screen.MousePointer = 0
Beep

ElseIf optionmed1.Value = True Then
A = Timer
j = 0
timermed3.Enabled = True
intcalc = 950 / 300 * final - 940
If intcalc < 0 Then intcalc = 10

```



```

intcalc = Int(intcalc / 10 + 5.5) * 10
timermed3.Interval = intcalc
conmatriz = 0
ElseIf optionmed2.Value = True Then
A = Timer
j = 0
timermed4.Enabled = True
intcalc = 950 / 300 * final - 940
If intcalc < 0 Then intcalc = 10
intcalc = Int(intcalc / 10 + 5.5) * 10
timermed4.Interval = intcalc
conmatriz = 0
ElseIf Representar.Value = True Then
For j = 1 To Numpfitx
Picture1.PSet (resload(j), absloaded(j)), &HFFFFFF
Next j
End If
End Select
End Sub

Sub mnuConfig_Click ()
End Sub

Sub mnuConfigItem_Click (Index As Integer)

CommLockin.PortOpen = False
If CommMonoc.PortOpen Then CommMonoc.PortOpen = False
Select Case Index
Case 0
Portform.Top = 1800
Portform.Left = 1700
Portform.Show 1
Case 1
Monocform.Top = 1800
Monocform.Left = 1700
Monocform.Show 1
End Select
End Sub

```

```

Sub mnuEdit_Click ()
End Sub

Sub mnuEditItem_Click (Index As Integer)
Select Case Index
Case 0 ' If Index = 0, user chose "Cut"
Clipboard.Clear
Clipboard.SetText Grid1.Clip ' Copy selected text to
Clipboard.
Grid1.Clip = "" ' Clear selected text from the document.
Case 1 ' If Index = 1, user chose "Copy"
Clipboard.Clear
Clipboard.SetText Grid1.Clip ' Copy selected text to
Clipboard.
Case 2 ' If Index = 2, user chose "Paste"
Grid1.Clip = Clipboard.GetText() ' Paste Clipboard text
(if any) into document.
End Select
End Sub

Sub mnuFile_Click ()
End Sub

Sub mnuFile_Array_Click (Index As Integer)
End Sub

Sub mnuFileItem_Click (Index As Integer)
Dim copias As Integer
Select Case Index ' Check index value of selected
menu item.
Case 0 ' If index = 0, the user chose "New"
Case 1 ' If index = 1, the user chose "Open..."
cargar = True
frmOpenSave.Caption = "Open"
' Set caption of Open/Save dialog to "Open"
frmOpenSave!txtOpenSave.Text = "*.*"
' Set default text in File Name text box.
frmOpenSave!txtOpenSave.SelLength = 3
' Show default text selected.
frmOpenSave.Show 1

```

```

' Show the File Open dialog.

Case 2 ' If index = 2, the user chose "Save As..."
guardarMed1 = True
frmOpenSave.Caption = "Guardar Med1"
' Set caption of Open/Save dialog to "Save"
frmOpenSave!txtOpenSave.Text = filename
' Set default text in File Name text box.
frmOpenSave!txtOpenSave.SelLength =
Len(frmOpenSave!txtOpenSave.Text)
' Show default text selected.
frmOpenSave.Show 1
' Show the File Open dialog.

Case 3
guardarMed2 = True
frmOpenSave.Caption = "Guardar Med2"
' Set caption of Open/Save dialog to "Save"
frmOpenSave!txtOpenSave.Text = filename
' Set default text in File Name text box.
frmOpenSave!txtOpenSave.SelLength =
Len(frmOpenSave!txtOpenSave.Text) ' Show default text
selected.
frmOpenSave.Show 1
' Show the File Open dialog.

Case 4 ' If index = 3, the user chose "Imprimir"
Graph1.DrawMode = 5
Case 5 ' This menu item is a separator bar,
no code needs to be written here
' because it cannot be selected and therefore
cannot receive a Click event.
Case 7 ' If index = 5, the user chose "Exit"
End ' End this application and return to the Windows
operating system.
End Select
End Sub

```

```

Sub model_KeyPress (KeyAscii As Integer)
If (KeyAscii = 13) Then
model2.SetFocus
End If
End Sub

Sub model2_KeyPress (KeyAscii As Integer)
If (KeyAscii = 13) Then
lon.SetFocus
End If
End Sub

Sub ModRepOption_Click (Index As Integer,
Value As Integer)
End Sub

Sub MonocFrame_DragDrop (Source As Control,
X As Single, Y As Single)
End Sub

Sub MovMonocText_Change ()
End Sub

Sub Nomod_Click ()
Framemedida2.Enabled = False
Framemedida2.Visible = False
max1 = CSng(model.Text)
low1 = CSng(model2.Text)
acab.Enabled = True
tiemf.Enabled = True
lon.Enabled = True
Optionref.Enabled = True
optionmed1.Enabled = True
optionmed2.Enabled = True
Form_paint
End Sub

```

```

Sub Op1_Click ()
lon.Text = 780
Framemedida2.Visible = True
Op2.Enabled = False
oplaser = True
End Sub

Sub Op2_Click ()
Dim paridad, texto As String
Op1.Enabled = False
oplaser = False
'Configura el puerto del monocromador
If paridadM = "Par" Then
paridad = "e"
ElseIf paridadM = "Impar" Then
paridad = "o"
Else
paridad = "n"
End If
CommMonoc.CommPort = CInt(PuertoM)
texto = CStr(baudM) + "," + paridad + "," + CStr(bitdatM) +
"," + CStr(bitspM)
CommMonoc.Settings = texto

If flujoM = "None" Then
CommMonoc.Handshaking = 0
ElseIf flujoM = "Xon/Xoff" Then
CommMonoc.Handshaking = 1
ElseIf flujoM = "RTS" Then
CommMonoc.Handshaking = 2
Else
CommMonoc.Handshaking = 3
End If
'inimonoc
'retromonoc
'espera (15)
Framemedida2.Visible = True
End Sub

```

```

Sub Opción_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub

Sub Optionmed1_Click (Value As Integer)
End Sub

Sub Optionmed2_Click (Value As Integer)
End Sub

Sub optionref_Click (Value As Integer)
End Sub

Sub OrdenMonocText_Change ()
End Sub

Sub Panel3D1_DragDrop (Index As Integer,
Source As Control, X As Single, Y As Single)
End Sub

Sub Picture1_paint ()
Grid1.Row = 1
Grid1.Col = 2
If Grid1.Text = "" Then
For j = 0 To Numpuntos
Picture1.PSet (res(j), abs1(j)), &HFFFF00
Next j
Else
For j = 0 To Numpuntos
Picture1.PSet (res(j), abs1(j)), &HFFFF00
Picture1.PSet (res2(j), abs2(j)), &H80FFFF
Next j
End If
End Sub

Sub ProgressLabel_Click ()
End Sub

```

```

Sub rad_Click ()
Picture1.Cls
Framemedida2.Visible = True
Framemedida2.Enabled = True
tiemf.Enabled = False
lon.Enabled = False
acab.Enabled = False
Optionref.Enabled = False
optionmed1.Enabled = False
optionmed2.Enabled = False
model.Text = CStr(max1)
model2.Text = CStr(low1)
End Sub

Sub Redib_Click()
Picture1_paint
End Sub

Sub Repr_bot_Click (Value As Integer)
Dim min, max As Single
Dim i, inclabel As Integer
On Error Resume Next
lamini = CInt(laminiTB.Text): lamfin = CInt(lamfinTB.Text)
incr = CInt(incTB.Text): Tesp = CInt(TespTB.Text)
Numpuntos = (lamfin - lamini) / incr
ReDim Preserve abs1(Numpuntos), abs2(Numpuntos),
absloaded(Numpuntos)
If Value = True Then
ModRepOption(0).Enabled = False
ModRepOption(1).Enabled = False
ReprCheck(0).Enabled = False
ReprCheck(1).Enabled = False
ReprCheck(2).Enabled = False

Graph1.RandomData = 0
Graph1.AutoInc = 0
Graph1.NumPoints = Numpuntos + 1
If CInt((Numpuntos + 1) / 10) > 0 Then
Graph1.LabelEvery = CInt((Numpuntos + 1) / 10)
Graph1.TickEvery = CInt((Numpuntos + 1) / 10)

```

```

Else
Graph1.LabelEvery = 1
Graph1.TickEvery = 1
End If
For i = 1 To Numpuntos + 1
Graph1.ThisPoint = i
Graph1.LabelText = ""
Next i
inclabel = CInt((Numpuntos + 1) / 10)
For i = 0 To 9
Graph1.ThisPoint = CInt(1 + inclabel * i)
Graph1.LabelText = CStr(lamini +
(lamfin - lamini) / 10 * i)
Next i
Graph1.NumSets = 3

'Busca el máximo y el mínimo
min = 100: max = 0
For i = 0 To Numpuntos
If abs1(i) < min And abs1(i) <> 0 Then min = abs1(i)
If abs1(i) > max Then max = abs1(i)
If abs2(i) < min And abs2(i) <> 0 Then min = abs2(i)
If abs2(i) > max Then max = abs2(i)
If absloaded(i) < min And absloaded(i) <> 0
Then min = absloaded(i)
If absloaded(i) > max Then max = absloaded(i)
Next i

If ModRepOption(0) = True Then
'Representa absorbancia
Graph1.YAxisMax = max
Graph1.YAxisMin = min
If ReprCheck(0) = True Then
Graph1.ThisSet = 1
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = abs1(i)
Next
Else
Graph1.ThisSet = 1

```

```

For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = 0
Next
End If
If ReprCheck(1) = True Then
Graph1.ThisSet = 2
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = abs2(i)
Next
Else
Graph1.ThisSet = 2
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = 0
Next
End If
If ReprCheck(2) = True Then
Graph1.ThisSet = 3
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = absloaded(i)
Next
Else
Graph1.ThisSet = 3
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = 0
Next
End If
Else 'Representa T(%)
Graph1.YAxisMax = 100
Graph1.YAxisMin = 0
If ReprCheck(0) = True Then
Graph1.ThisSet = 1
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = Exp(-abs1(i)) * 100
Next

```

```

Else
Graph1.ThisSet = 1
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = 0
Next
End If
If ReprCheck(1) = True Then
Graph1.ThisSet = 2
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = Exp(-abs2(i)) * 100
Next
Else
Graph1.ThisSet = 2
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = 0
Next
End If
If ReprCheck(2) = True Then
Graph1.ThisSet = 3
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i
Graph1.GraphData = Exp(-absloaded(i)) * 100
Next
Else
Graph1.ThisSet = 3
For i = 0 To Numpuntos
Graph1.ThisPoint = i + 1
Graph1.GraphData = 0
Next
End If
End If
Graph1.DrawMode = 3
frameboton.Visible = False
framemedida.Visible = False
MonocFrame.Visible = False
Gaugel.Visible = False
Shape4.Visible = False

```

```

ProgressLabel.Visible = False
Graph1.Visible = True
Else
Graph1.Visible = False
ModRepOption(0).Enabled = True
ModRepOption(1).Enabled = True
ReprCheck(0).Enabled = True
ReprCheck(1).Enabled = True
ReprCheck(2).Enabled = True
frameboton.Visible = True
framemedida.Visible = True
MonocFrame.Visible = True
Gauge1.Visible = True
Shape4.Visible = True
ProgressLabel.Visible = True

End If
End Sub

Sub ReprCheck_Click (Index As Integer, Value As Integer)
End Sub
Sub Representar_Click (Value As Integer)
End Sub

Sub ReprFrame3D_DragDrop (Source As Control, X As Single,
Y As Single)
End Sub

Sub RetroCommand_Click ()
inimonoc
retromonoc
End Sub

Sub SensDown_Click (Value As Integer)
If sensib = 0 Then SensDown.Value = False: Exit Sub
sensib = sensib - 1
presensens (sensib)
SensDown.Value = False
End Sub

```

```

Sub SensUP_Click (Value As Integer)
If sensib = 26 Then SensUp.Value = False: Exit Sub
sensib = sensib + 1
presensens (sensib)
SensUp.Value = False
End Sub

Sub Spin1_SpinDown ()
Dim A, B As String
Dim nmetros As Single
nmetros = CSng(MovMonocText.Text)
A = "+" + CStr(4 * nmetros)
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (.1)
B = CommMonoc.Input
End Sub

Sub Stop_bot_Click (Value As Integer)
Select Case tipo
Case 1
timerref.Enabled = False
Timermed1.Enabled = False
Timermed2.Enabled = False
If guardarTB.Text <> "" Then Close #8
Case 2
timermed3.Enabled = False
timermed4.Enabled = False
End Select

medir_bot.Value = False

If CommMonoc.PortOpen Then ClosePortMonoc
Stop_bot.Value = False
End Sub

Sub TrespTB_Change ()
End Sub

Sub Text1_Change ()
End Sub

```

```

Sub Text10_Change ()
End Sub

Sub Text2_Change ()
End Sub

Sub Text3_Change ()
End Sub

Sub Text4_Change ()
End Sub

Sub Text5_Change ()
End Sub

Sub Text6_Change ()
End Sub

Sub Text7_Change ()
End Sub
Sub Text8_Change ()
End Sub

Sub Text9_Change ()
End Sub

Sub tiemf_KeyPress (KeyAscii As Integer)
If (KeyAscii = 13) Then
model.SetFocus
End If
End Sub

Sub TimeDown_Click (Value As Integer)
If tiempoint = 0 Then TimeDown.Value = False: Exit Sub
tiempoint = tiempoint - 1
presentime (tiempoint)
TimeDown.Value = False
End Sub

```

```

Sub Timermed1_Timer ()
Dim i As Integer
If lnow <= lamfin Then
med1(conmatriz) = medida()
If guardarTB.Text <> "" Then Write #8, lnow,
med1(conmatriz)
lnow = lnow + incr: conmatriz = conmatriz + 1
mueve_monoc (incr)
Gauge1.Value = CInt((conmatriz - 1) / Numpuntos * 100)
ProgressLabel.Caption = CStr(CInt((conmatriz - 1) /
Numpuntos * 100)) + " %"
Else
If guardarTB.Text <> "" Then Close #8
ClosePortMonoc
medir_bot.Value = False
Timermed1.Enabled = False
For i = 0 To Numpuntos
Grid1.Row = i + 1
Grid1.Col = 0
Grid1.Text = lamini + i * incr
Grid1.Col = 1
abs1(i) = (-Log(med1(i) / Referen(i))) / Log(10)
Grid1.Text = CInt(abs1(i) * 1000) / 1000
Next
End If
End Sub

Sub Timermed2_Timer ()
If lnow <= lamfin Then
med2(conmatriz) = medida()
If guardarTB.Text <> "" Then Write #8, lnow,
Referen(conmatriz)
lnow = lnow + incr: conmatriz = conmatriz + 1
mueve_monoc (incr)
Gauge1.Value = CInt((conmatriz - 1) / Numpuntos * 100)
ProgressLabel.Caption = CStr(CInt((conmatriz - 1) /
Numpuntos * 100)) + " %"
Else
If guardarTB.Text <> "" Then Close #8
ClosePortMonoc

```

```

medir_bot.Value = False
Timermed2.Enabled = False
For i = 0 To Numpuntos
Grid1.Row = i + 1
Grid1.Col = 0
Grid1.Text = lamini + i * incr
Grid1.Col = 2
abs2(i) = (-Log(med2(i) / Referen(i))) / Log(10)
Grid1.Text = CInt(abs2(i) * 1000) / 1000
Next
End If
End Sub

Sub Timermed3_Timer ()
ReDim Preserve res(500), med1(500), abs1(500)
med1(conmatriz) = medida()

B = Timer
res(j) = B - A
Grid1.Row = j + 1

Grid1.Col = 0
Grid1.Text = CLng(res(j) * 1000 + .5) / 1000
Grid1.Col = 1
abs1(j) = (-Log(med1(j) / blanco)) / Log(10)
Grid1.Text = CLng(abs1(j) * 1000 + .5) / 1000
Picture1.PSet (res(j), abs1(j)), &HFFFF00
Numpuntos = j
j = j + 1
conmatriz = conmatriz + 1
If B - A >= final Then
timermed3.Enabled = False
medir_bot.Value = False
Beep
End If
End Sub

Sub Timermed4_Timer ()
ReDim Preserve res2(500), med2(500), abs2(500)
med2(conmatriz) = medida()

```

```

B = Timer
res2(j) = B - A
Grid1.Row = j + 1
Grid1.Col = 2
Grid1.Text = CLng(res2(j) * 1000 + .5) / 1000
Grid1.Col = 3
abs2(j) = (-Log(med2(j) / blanco)) / Log(10)
Grid1.Text = CLng(abs2(j) * 1000 + .5) / 1000
Picture1.PSet (res2(j), abs2(j)), &H80FFFF
Numpuntos = j
j = j + 1
conmatriz = conmatriz + 1
If B - A >= final Then
timermed4.Enabled = False
medir_bot.Value = False
Beep
End If
End Sub

Sub Timerref_Timer ()

If lnow <= lamfin Then
Referen(conmatriz) = medida()
If guardarTB.Text <> "" Then Write #8, lnow,
Referen(conmatriz)
lnow = lnow + incr: conmatriz = conmatriz + 1
mueve_monoc (incr)
Gauge1.Value = CInt((conmatriz - 1) / Numpuntos * 100)
ProgressLabel.Caption = CStr(CInt((conmatriz - 1) /
Numpuntos * 100)) + " %"
Else
If guardarTB.Text <> "" Then Close #8
ClosePortMonoc
medir_bot.Value = False
timerref.Enabled = False
End If
End Sub

```



```

Sub timeUP_Click (Value As Integer)
If tiempoint = 19 Then TimeUp.Value = False: Exit Sub
tiempoint = tiempoint + 1
presentime (tiempoint)
TimeUp.Value = False
End Sub

```

```

Sub V10Command_Click ()
Dim A, B As String
A = "V1000"
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (.5)
B = CommMonoc.Input
End Sub

```

```

Sub V500Command_Click ()
Dim A, B As String
A = "V500"
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (.5)
B = CommMonoc.Input
End Sub

```

```

Sub V7Command_Click ()
Dim A, B As String

A = "V750"
CommMonoc.Output = A + Chr(13)
espera (.5)
B = CommMonoc.Input
End Sub

```

#### **OPENSAVE**

```

Sub cmdOpenSave_Click (Index As Integer)
Dim l, i, j As Integer
Dim x As String
Dim Y As Single
If Index = 0 Then
' OK button pressed.

```

```

On Error Resume Next

```

```

Select Case tipo
Case 1
lamini = CInt(Principal!laminiTB.Text)
incr = CInt(Principal!incTB.Text)

```

```

If guardarMed1 = True Then
filOpenSave.FileName = txtOpenSave.Text
Open txtOpenSave.Text For Output As #9
Write #9, "lambda", "Absorbancia"
For i = 0 To Numpuntos
l = lamini + i * incr
Write #9, l, abs1(i)
Next i
Close #9

```

```

guardarMed1 = False
End If

```

```

If guardarMed2 = True Then
filOpenSave.FileName = txtOpenSave.Text
Open txtOpenSave.Text For Output As #9
Write #9, "lambda", "Absorbancia"
For i = 0 To Numpuntos
l = lamini + i * incr
Write #9, l, abs2(i)
Next i
Close #9
guardarMed2 = False
End If

```

```

If cargar = True Then
ReDim absloaded(500)
Open txtOpenSave.Text For Input As #9
i = 0
Input #9, x, x
Do Until EOF(9)
Input #9, l, absloaded(i)
Principal!Grid1.Row = i + 1
Principal!Grid1.Col = 0
Principal!Grid1.Text = lamini + i * incr

```

```

Principal!Grid1.Col = 3
Principal!Grid1.Text = CInt(absloaded(i) * 1000) / 1000
i = i + 1
Loop
Close #9
cargar = False
End If
Case 2
If guardarMed1 = True Then
filOpenSave.FileName = txtOpenSave.Text
Open txtOpenSave.Text For Output As #9
Write #9, "tiempo", "Absorbancia"
For j = 0 To Numpuntos
Y = CLng(res(j) * 1000 + .5) / 1000
Write #9, Y, abs1(j)
Next j
Close #9
guardarMed1 = False
End If
If guardarMed2 = True Then
filOpenSave.FileName = txtOpenSave.Text
Open txtOpenSave.Text For Output As #9
Write #9, "Tiempo", "Absorbancia"
For j = 0 To Numpuntos
Y = CLng(res2(j) * 1000 + .5) / 1000
Write #9, Y, abs2(j)
Next j
Close #9
guardarMed2 = False
End If

If cargar = True Then
ReDim absloaded(500)
ReDim resload(500)
Open txtOpenSave.Text For Input As #9
i = 0
Input #9, x, x
Do Until EOF(9)
Input #9, l, absloaded(i)
resload(i) = l

```

```

Principal!Grid1.Row = i + 1
Principal!Grid1.Col = 4
Principal!Grid1.Text = CLng(1 * 1000 + .5) / 1000
Principal!Grid1.Col = 5
Principal!Grid1.Text = CLng(absloaded(i) * 1000 + .5) / 1000
i = i + 1
Loop
Close #9
Numpfitx = i
cargar = False
End If
End Select
Unload frmOpenSave
If Err Then
' Something wrong with supplied path or filename.
Err = 0
If Dir(txtOpenSave.Text) = "" Then
If Err Then
' Bad path or filename,
MsgBox Error, 48
' so report that error.
ElseIf Caption = "Save" Then
' Error was file didn't exist, but saving so that's ok.
'CloseFile (txtOpenSave.Text)
Unload frmOpenSave
Else
' File doesn't exist, and opening file, so report error.
MsgBox "File doesn't exist.", 48
End If
Exit Sub
End If
End If
Else
Unload frmOpenSave
' If the OK button wasn't pressed then
' Cancel must have been so unload the dialog.
End If
End Sub

```

```

Sub dirOpenSave_Change ()
filOpenSave.Path = dirOpenSave.Path
' When the directory path changes, update the
file list box path
lblOpenSave(2).Caption = dirOpenSave.Path
' and the path displayed above the directory list box.
ChDir dirOpenSave.Path
' Set the current working directory to the new path.
End Sub
Sub drvOpenSave_Change ()
dirOpenSave.Path = drvOpenSave.Drive
' When drive changes, update path of directory list box
ChDrive drvOpenSave.Drive
' and set the current working drive to the new drive.
End Sub

Sub filOpenSave_Click ()
' Display the file selected in the text box
up in the File Name text box.
txtOpenSave.Text = filOpenSave.List
(filOpenSave.ListIndex)
End sub

```

```

Sub Form_Load ()
' The form is horizontally and vertically centered
when loaded.
frmOpenSave.Left = Screen.Width /
2 - frmOpenSave.Width / 2
frmOpenSave.Top = Screen.Height /
2 - frmOpenSave.Height / 2
' Set current drive and directory.
drvOpenSave.Drive = CurDir
dirOpenSave.Path = CurDir
' Display the current path.
lblOpenSave(2).Caption = dirOpenSave.Path
End Sub

Sub lblOpenSave_Click (Index As Integer)
End Sub
Sub txtOpenSave_Change ()
End Sub

```