

**DESARROLLO DE LENGUAS ELECTRÓNICAS
POTENCIOMÉTRICAS PARA LA DETERMINACIÓN
SIMULTÁNEA DE METALES PESADOS EN MUESTRAS
AMBIENTALES**

Memoria presentada por

Deivy Wilson Massó

Tesis Doctoral

Programa de Doctorado en Química

Directores

Manel del Valle Zafra

Antonio Florido Pérez

Departamento de Química

Facultad de Ciencias

2013



Memoria presentada para aspirar al Grado de Doctor por **Deivy Wilson Massó**

Con el visto bueno de los directores de la tesis doctoral,

Manel del Valle Zafra, profesor titular de la Universitat Autònoma de Barcelona y

Antonio Florido Pérez, profesor titular de la Universitat Politècnica de Catalunya

Bellaterra, enero de 2013

**A mi madre,
y a Yordania**

Agradecimientos

Con estas palabras espero reconocer humildemente el extraordinario esfuerzo depositado en esta tesis por muchas buenas personas a lo largo de estos años

Mis agradecimientos a la Universitat Autònoma de Barcelona, por la concesión de una beca predoctoral para la formación de personal investigador (FPI)

A los proyectos que financiaron la investigación: Estrategias en el desarrollo y aplicación de lenguas electrónicas empleando biosensores y nuevos materiales de reconocimiento, MICINN, CTQ2010-17099

Utilización de residuos industriales para la depuración de efluentes contaminados con metales pesados, MICINN, CTM2008-06776-C02-02

A mis directores de tesis, Manel del Valle y Antonio Florido

A todos los colegas del grupo de Sensores y Biosensores

A mis amigos

ÍNDICE

Abreviaturas y símbolos	1
Resumen	5
Abstract.....	7
1 INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Sensores químicos	9
1.1.1 Sensores electroquímicos	10
1.1.2 Sensores potenciométricos	11
1.2 Los derivados de tioureas como portador móvil neutro	15
1.3 Matrices de sensores.....	16
1.4 Lenguas electrónicas (ETs)	17
1.5 Procesamiento multivariante	20

1.5.1	Preprocesamiento de la señal.....	20
1.5.2	Redes neuronales artificiales	22
1.6	Las ETs en FIA y en la monitorización de procesos.....	29
1.7	ET en sistemas de valoraciones automatizados.....	31
1.8	Principios de la biosorción	33
1.8.1	Mecanismos de biosorción	34
1.9	Bibliografía.....	36
2	OBJETIVOS.....	45
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	51
3.1	Reactivos	51
3.2	Síntesis y caracterización de los derivados de bis-tioureas propuestos.....	53
3.2.1	Síntesis de los ionóforos propuestos (derivados de las bis-tioureas).....	53
3.2.2	Caracterización de las bistioureas obtenidas	54
3.3	Construcción de los electrodos.....	55
3.3.1	Electrodos de membrana polimérica y de configuración convencional	55
3.3.2	Electrodos de configuración tubular.....	57
3.4	Instrumentación	60
3.4.1	Mediciones potenciométricas en batch.....	60
3.4.2	Mediciones potenciométricas en flujo	61
3.4.3	Experimentos de monitorización de procesos biosorción mediante el sistema FIP-ET.	62
3.4.4	Sistema de valoración automático	63
3.4.5	Equipos empleados en otras determinaciones	64
3.5	Metodologías de cálculo.....	64
3.5.1	Caracterización de los ISEs	64
3.5.2	Características de desempeño en valoraciones potenciométricas con ET	70
3.6	Ajuste de los modelos de respuesta de los ISEs con ANN	70

3.6.1	Generación de la información multivariante	70
3.6.2	Procesamiento de datos multivariante	76
3.7	Determinación de parámetros de biosorción	78
3.8	Determinación de trazas de metales en suelos	80
3.9	Bibliografía.....	81
4	DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS.....	85
4.1	Introducción.....	85
4.2	Dos nuevas bis-tioureas empleadas como ionóforos en electrodos de membranas poliméricas para determinación de plomo en suelos	88
4.2.1	Síntesis y caracterización de las bis-tioureas.....	88
4.2.2	Optimización de la composición de la membrana.....	90
4.2.3	Características de respuesta	91
4.2.4	Aplicación de los sensores propuestos a la determinación de plomo en suelos.....	96
4.3	Lengua Electrónica potenciométrica para la resolución de mezclas de sulfuro y perclorato.....	98
4.3.1	Composición de las membranas poliméricas.....	98
4.3.2	Caracterización de los ISEs empleados en la ET.....	99
4.3.3	Construcción del modelo de respuesta con ANN.....	100
4.3.4	Aplicación a muestras reales	102
4.4	Construcción y caracterización de los electrodos selectivos de iones para las determinaciones en batch	103
4.4.1	Caracterización de los ISEs de configuración convencional para mediciones en batch.....	104
4.5	Determinación simultánea de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras de suelo empleando una matriz de sensores potenciométricos y redes neuronales artificiales	105
4.5.1	Construcción del modelo de respuesta con ANN.....	106

4.5.2	Aplicación de la matriz de sensores en la determinación de metales en suelos.....	109
4.6	Valoración complexométrica de Cu(II), Cd(II) y Pb(II) utilizando un método rápido de adiciones fijas de agente valorante y una lengua electrónica potenciométrica para detectar el punto final	113
4.6.1	Construcción del modelo de respuesta con ANN.....	114
4.6.2	Determinación de las características de desempeño de método	116
4.6.3	Determinación simultánea de Cu ²⁺ , Cd ²⁺ y Pb ²⁺ en muestras reales	117
4.7	Construcción, caracterización de los electrodos selectivos de iones para determinaciones en flujo y optimización del equipamiento utilizado.....	119
4.7.1	Caracterización de los ISEs de configuración tubular.....	119
4.7.2	Verificación de los principales parámetros analíticos del FIP y selección de las condiciones de trabajo.....	120
4.8	Monitorización del proceso de biosorción de cobre y de la salida del calcio del raspo de uva con un sistema basado en FIP-ET	122
4.8.1	Construcción del modelo de respuesta con ANN.....	124
4.8.2	Monitorización del proceso de biosorción.....	125
4.8.3	Modelación del mecanismo de biosorción	127
4.9	Monitorización del proceso de biosorción de mezclas multimetálicas y de la liberación de calcio del raspo de uva con un sistema basado en FIP-ET	129
4.9.1	Construcción del modelo de respuesta con ANN.....	129
4.9.2	Evaluación de la monitorización de los procesos de biosorción de mezclas multimetálicas con FIP-ET	132
4.9.3	Rendimiento de la sorción para mezclas multicomponentes.....	135
4.10	Bibliografía.....	137
5	CONCLUSIONES GENERALES	141
6	ARTÍCULOS PUBLICADOS	149

Índice de Tablas

Tabla 1.1. Clasificación IUPAC de los ISEs según el tipo de membrana que utilizan ...	13
Tabla 3.1. Reactivos empleados en los experimentos y sus proveedores	52
Tabla 3.2. Composición de las membranas empleadas durante la optimización de los ISEs basados en las bis-tioureas propuestas.....	57
Tabla 3.3. Composición de las membranas empleadas en las aplicaciones con ET.....	59
Tabla 3.4. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa en la determinación de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} en muestras de suelo.....	72
Tabla 3.5. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa en la monitorización del proceso de biosorción de mezclas cuaternarias con el sistema FIP-ET	75
Tabla 4.1. Caracterización de las bis-tioureas sintetizadas	89

Tabla 4.2. Comparación de las características de respuesta para diferentes ISEs de Pb(II).	96
Tabla 4.3. Determinación de la concentración de plomo en muestras de suelo empleando los ISEs propuestos y su comparación con el método de referencia (ICP-MS).	97
Tabla 4.4. Composición de las membranas de los ISEs empleados en la ET	98
Tabla 4.5. Características de respuesta de los ISEs que forman la matriz de sensores.	100
Tabla 4.6. Características de respuesta de los ISEs de configuración convencional.	104
Tabla 4.7. Logaritmo de los coeficientes de selectividad potenciométricos de los ISEs de configuración convencional	105
Tabla 4.8. Comparación de las concentraciones máximas permisibles de metales pesados en suelos básicos vs. el rango de concentración obtenido para las ocho muestras de suelos	111
Tabla 4.9. Características de desempeño del método de valoración propuesto	117
Tabla 4.10. Caracterización de los ISEs tubulares	119
Tabla 4.11. Logaritmo de los coeficientes de selectividad potenciométricos de los ISEs tubulares.	120
Tabla 4.12. Comparación de los modelos teóricos de Thomas, BDST y Yoon-Nelson y los parámetros experimentales para la sorción de Cu^{2+} en el raspo de uva.	128
Tabla 4.13. Optimización de las arquitecturas de las ANNs	132
Tabla 4.14. Capacidad de sorción.	136

Índice de Figuras

Figura 1.1. Esquema básico de un sensor químico.....	10
Figura 1.2. Composición típica de una membrana selectiva de iones.....	15
Figura 1.3. Estructura de un derivado de tiourea.....	15
Figura 1.4. Tipos de sensores empleados en lenguas electrónicas y tipos de análisis realizado en publicaciones del 2011	19
Figura 1.5. Representación esquemática de un perceptrón.	23
Figura 1.6. Funciones de transferencias más comunes: (A) lineal (<i>purelin</i>), (B) tan- sigmoidal (<i>tansig</i>) y (C) log-sigmoidal (<i>logsig</i>).....	24
Figura 1.7. Representación de una ANN multicapa o perceptrón multicapa.	26
Figura 1.8. (A) ANN bien ajustada y (B) ANN con sobreentrenamiento	28
Figura 1.9. Elementos básicos de un equipo de FIA.	30

Figura 1.10. Elementos básicos de un sistema automático de valoración potenciométrica.	32
Figura 3.1. Esquema de síntesis de las bis-tioureas propuestas.....	54
Figura 3.2. Esquema de construcción de un ISE convencional o de <i>batch</i>	56
Figura 3.3. Esquema de construcción de un ISE en disposición tubular de membrana polimérica.....	58
Figura 3.4. Fotografía del sistema de medición potenciométrica.....	60
Figura 3.5. Esquema del equipo de FIA.	61
Figura 3.6. Fotografía del valorador automático	63
Figura 3.7. Curva de calibración típica de un ISE.....	65
Figura 3.8. Efecto provocado por la presencia de Cu^{2+} en la respuesta de un ISE de Pb^{2+}	68
Figura 3.9. Respuesta transitoria exponencial típica de un ISE	69
Figura 3.10. Esquema de las ANNs empleadas en las diferentes aplicaciones realizadas durante la investigación	71
Figura 3.11. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa en la valoración complexométrica de Cu^{2+} , Cd^{2+} , y Pb^{2+} empleando una ET	73
Figura 3.12. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa en la monitorización del proceso de biosorción de Cu^{2+} empleando el sistema FIP-ET	74
Figura 3.13. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa de la monitorización del proceso de biosorción de mezclas ternarias con el sistema FIP-ET	74
Figura 3.14. Visualización de las disoluciones estándar preparadas para el entrenamiento de la lengua electrónica empleada en la determinación de sulfuro y perclorato.....	76
Figura 4.1. Estructura de las bis-tioureas empleadas como ionóforos, (a) 1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno (BTB) y (b) 1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno (FTB)	88

Figura 4.2. Respuesta de los ISEs basados en BTB y FTB a iones Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}	90
Figura 4.3. Respuesta dinámica de los ISEs basados en BTB y FTB. Respuesta correspondiente a saltos de cuatro décadas de concentración	92
Figura 4.4. Influencia del pH en la respuesta de un ISE-Pb(II) basado en membrana de BTB.	93
Figura 4.5. Patrón de selectividad para los ISEs-Pb(II) basados en los ionóforos BTB y FTB	94
Figura 4.6. Superficie de respuesta obtenida para un ISE-Pb(II) basado en BTB, calibraciones obtenidas para mezclas de Cu^{2+} y Pb^{2+}	95
Figura 4.7. Respuesta de los ISEs que componen la matriz de sensores a sus respectivos iones primarios	99
Figura 4.8. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN en la modelación de la determinación de sulfuro y perclorato.....	101
Figura 4.9. Desempeño del modelo de ANN optimizado para el subconjunto de validación externa. (A) ion perclorato y (B) ion sulfuro	102
Figura 4.10. Error relativo obtenido para la determinación simultánea de sulfuro y perclorato en las muestras sintéticas.....	103
Figura 4.11. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN en la modelación de la determinación de Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}	107
Figura 4.12. Recta de regresión comparativa para el subconjunto de validación externa con la ANN optimizada, (A) Pb^{2+} , (B) Cd^{2+} , (C) Cu^{2+} y (D) Zn^{2+}	109
Figura 4.13. Recta de regresión comparativa para la determinación de Pb^{2+} (A), Cd^{2+} (B), Cu^{2+} (C) y Zn^{2+} (D) en las muestras de suelo.....	110
Figure 4.14. Resultados de la ET propuesta para la determinación de Cd^{2+} en las muestras de suelo dopadas.....	112
Figura 4.15. Curvas de valoración complejométrica de tres disoluciones individuales que contienen Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} y una mezcla de los tres componentes con detección potenciométrica del punto final.....	113

Figura 4.16. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN en la modelación del sistema de valoración de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} con ET	115
Figura 4.17. Rectas de regresión comparativas para el subconjunto de validación externa con la ANN optimizada, (A) Pb^{2+} , (B) Cd^{2+} y (C) Cu^{2+}	116
Figura 4.18. Rectas de regresión comparativas para la determinación de Pb^{2+} (A), Cd^{2+} (B) y Cu^{2+} (C) en las muestras de suelo dopadas	118
Figura 4.19. Efecto del caudal en la respuesta del ISE- Ca^{2+} (1)	121
Figura 4.20. Efecto del tiempo de apertura de válvulas (volumen de muestra inyectado) en la respuesta del ISE- Ca^{2+} (1).....	122
Figura 4.21. Fiagrama obtenido durante la calibración de los 5 ISEs que componen la ET para diferentes niveles de concentración de Cu^{2+} (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M)	123
Figura 4.22. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN en la modelación del proceso de monitorización de Cu^{2+} y Ca^{2+} mediante el sistema FIP-ET	124
Figura 4.23. Rectas de regresión comparativas para el subconjunto de validación externa con la ANN optimizada, (A) Cu^{2+} , (B) Ca^{2+}	125
Figura 4.24. Curvas de rupturas para la biosorción de ion Cu^{2+} en el raspo de uva; y el perfil de salida del ion Ca^{2+}	127
Figura 4.25. Curva de ruptura para sorción de Cu^{2+} en el raspo de uva y perfil de salida del Ca^{2+} , ambos obtenidos por el sistema on-line FIP-ET.....	129
Figura 4.26. Curvas de ruptura para biosorción de Zn^{2+} y Cu^{2+} en el raspo de uva. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+}	133
Figura 4.27. Curvas de ruptura para biosorción de Pb^{2+} y Cu^{2+} en el raspo de uva. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+}	133
Figura 4.28. Curvas de ruptura para biosorción de Zn^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} en el raspo de uva. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+}	134
Figura 4.29. Curvas de ruptura para biosorción de Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} en el raspo de uva. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+}	134

Abreviaturas y símbolos

ET	lengua electrónica
EN	nariz electrónica
ISE	electrodo selectivo de iones
$ISFET$	transistor de efecto de campo sensible de iones
E_{cel}	potencial de la celda
E_{cel}^0	potencial estándar de la celda
a_i	actividad del ion i
z_i	carga del ion i
R	constante de los gases ($8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)
F	constante de Faraday ($9.6446 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$K_{i,j}^{pot}$	coeficiente de selectividad potenciométrico
<i>IUPAC</i>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<i>ANN</i>	red neuronal artificial
<i>PCA</i>	análisis de componentes principales
<i>PLS</i>	mínimos cuadrados parciales
<i>DA</i>	análisis de discriminante
<i>LDA</i>	análisis de discriminante lineal
<i>SVM</i>	máquina de soporte vectorial
<i>PCR</i>	regresión de los componentes principales
<i>DFT</i>	transformada discreta de Fourier
<i>FFT</i>	transformada rápida de Fourier
$w_{j,i}$	pesos de conexión
θ_j	sesgo
<i>FT</i>	función de transferencia
<i>GD</i>	algoritmo del gradiente descendiente
α	velocidad de aprendizaje
β	momento
<i>RB</i>	algoritmo de regularización bayesiana
<i>RMSE</i>	error cuadrático medio
<i>FIA</i>	análisis por inyección en flujo
<i>FIP</i>	potenciometría por inyección en flujo
<i>SIA</i>	análisis por inyección secuencial
<i>IR</i>	espectroscopia infrarroja
1H NMR	resonancia magnética nuclear protónica
<i>DOS</i>	dioctil sebacato
<i>oNPOE</i>	orto-nitrofeniloctil éter
<i>KTpClPB</i>	tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio
<i>NaTPB</i>	tetrafenilborato de sodio
<i>PVC</i>	cloruro de polivinilo
<i>DOP</i>	dioctil ftalato
<i>DBBP</i>	dibutilbutilfosfonato
<i>BBPA</i>	bis(1-butyl-pentil) adipato
<i>DBP</i>	dibutilftalato

<i>PAA</i>	poliacrilamida
<i>EDTA</i>	sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
<i>OA</i>	ácido oleico
<i>CTMAB</i>	bromuro de cetiltrimetilamonio
<i>FIM</i>	método de interferencia fija
<i>ICP-OES</i>	espectroscopia de emisión de plasma acoplado inductivamente
<i>FAAS</i>	espectrometría de absorción atómica con llama
<i>LD</i>	límite de detección
<i>BTB</i>	1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno
<i>FTB</i>	1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno
<i>ABPAH</i>	[<i>N'</i> -acetil-2-(benzotiazol-2il)-3-(3-cloro-5-metil-4 <i>H</i> -pirazol-4-il)acrilohidracida]

Resumen

La presente tesis doctoral está enfocada al desarrollo de herramientas analíticas avanzadas, basadas en lenguas electrónicas potenciométricas y redes neuronales artificiales, para la determinación de trazas de metales de transición, específicamente Cu(II), Cd(II), Pb(II) y Zn(II) en muestras ambientales. En la búsqueda de nuevos elementos de reconocimiento, se sintetizaron y caracterizaron dos nuevos derivados de bis-tioureas, que fueron empleados como ionóforos en electrodos selectivos a plomo. Los dos electrodos obtenidos fueron caracterizados completamente y se obtuvieron muy buenos parámetros analíticos. La aplicabilidad de los dos dispositivos construidos se comprobó en la determinación de plomo en muestras de suelos, los resultados obtenidos se contrastaron de forma satisfactoria frente a un método de referencia (ICP-MS).

Con los electrodos construidos previamente y con otros formulados mediante membranas comerciales, se conformaron las matrices de sensores que fueron empleadas

en diversas aplicaciones. En la primera de ellas, se desarrolló una lengua electrónica potenciométrica para la determinación simultánea de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} a nivel de trazas en muestras de suelos. El modelo fue construido mediante redes neuronales artificiales, con muy buen ajuste y habilidad predictiva. La estrategia propuesta fue aplicada a la determinación de los 4 analitos en muestras de suelos. Los resultados obtenidos se compararon con un método de referencia (FAAS).

En la segunda aplicación se empleó una lengua electrónica como método de detección del punto final en un sistema de valoración complexométrica, para resolver mezclas ternarias de metales de transición. Con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis, se utilizó una metodología de valoración con un número reducido de adiciones fijas de agente valorante. La información multivariada obtenida fue tratada con redes neuronales artificiales, y se pudo determinar simultáneamente en muestras de suelos dopadas el contenido de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} , lo que representa un aporte considerable, ya que estas aplicaciones son prácticamente imposibles con las metodologías convencionales de valoración.

Las aplicaciones posteriores estuvieron enfocadas al desarrollo de un sistema automatizado, basado en lenguas electrónicas y análisis por inyección en flujo; para la monitorización de procesos de biosorción de mezclas de metales de transición en raspo de uva, residual de la industria vinícola. Se emplearon diferentes lenguas electrónicas como método de detección y se lograron monitorizar satisfactoriamente diferentes mezclas, de dos, tres y cuatro componentes. Con la información adquirida, se obtuvieron los principales parámetros termodinámicos de los procesos estudiados, la capacidad de sorción (q_0), la capacidad de sorción del volumen del lecho (N_0) y el tiempo requerido para alcanzar el 50 % del sorbato (θ_r). Estos fueron comparados con los modelos teóricos de Thomas, Yoon-Nelson y BDST, en todos los casos se obtuvo un buen ajuste. También se determinó el orden de selectividad del raspo de uva (biosorbente) hacia los diferentes metales estudiados y el mecanismo predominante y responsable de la biosorción fue el intercambio iónico.

Abstract

This thesis is focused on the development of advanced analytical tools based on potentiometric electronic tongues and artificial neural networks, for the determination of transition metal traces, particularly Cu(II), Cd(II), Pb(II) and Zn(II) in environmental samples. In the search for new recognition elements, two new bis-thiourea derivatives were synthesized and characterized, which were used as ionophores in lead selective electrodes. The electrodes obtained were fully characterized and yielded very good analytical parameters. The applicability of the two devices constructed was verified in the determination of lead in soil samples, the results obtained were compared successfully against a reference method (ICP-MS).

Using these previously constructed electrodes in concert with additional electrodes exploiting commercially fabricated sensory elements, a sensor array was formed and thus used in various applications. The first of these applications was a potentiometric

electronic tongue for the simultaneous determination of Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} at trace levels in soil samples. The model was constructed with the use of artificial neural networks and exhibited a very good fit and predictive ability. The proposed strategy was applied to the determination of these 4 analytes in soil samples. The results were also compared with a reference method (FAAS).

In the second application, the electronic tongue was employed as end point detection method in titration system, to resolve ternary mixtures of transition metals. In order to reduce the analysis time, a complexometric fixed volume titration methodology was used. The multivariate information obtained was treated with artificial neural networks, and the Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} volumes were simultaneously determined in soil spiked samples, which represents a significant contribution to the state-of-the-art, as these applications are virtually impossible to achieve with conventional titration methodologies.

Subsequent applications were focused on the development of an automated system based on electronic tongues and flow injection analysis, for the monitoring of biosorption processes of mixtures of transition metals in grape stalk, wine industry waste. Several electronic tongues were used as a detection method, and achieved the satisfactorily monitoring of different mixtures of two, three and four components. Using the obtained information, the main thermodynamic parameters of the studied processes were successfully determined; these were the sorption capacity (q_0), the sorption capacity of the bed volume (N_0) and the time required to reach 50% of the sorbate (θ_r). These were then compared to theoretical models of Thomas, Yoon-Nelson and BDST in all cases a good fit was achieved. The mechanism responsible for biosorption, ion exchange, and the order of selectivity grape stalk (biosorbent) towards different metals studied was also determined.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Sensores químicos

El elevado progreso tecnológico ha generado nuevos escenarios en los que se hace imprescindible caracterizar analíticamente sustancias y procesos en condiciones no convencionales. La aplicación de sensores químicos actualmente es cada vez más habitual en muchos de los ámbitos de la sociedad. La determinación de contaminantes, la monitorización de procesos complejos, los análisis clínicos, la prevención de actos de terrorismo y bioterrorismo son algunos de los ejemplos más significativos.

Se conoce como sensor químico a un dispositivo analítico que permite tomar medidas de parámetros químicos o biológicos, y se caracteriza por su simplicidad, tener pequeñas dimensiones, bajo coste y ser capaz de generar información química prácticamente en tiempo real. Los sensores integran la mayoría de las etapas de los

procedimientos analíticos tradicionales reduciéndolas simplemente a dos: el reconocimiento y la transducción.

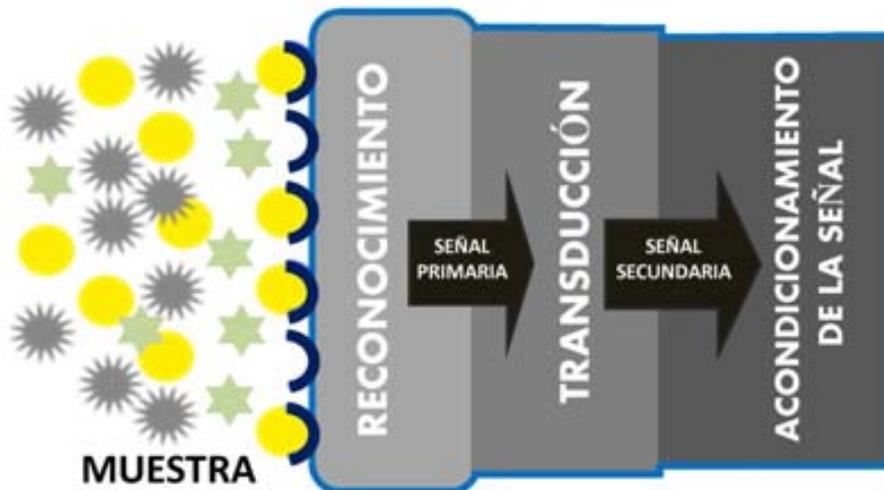


Figura 1.1. Esquema básico de un sensor químico.

Generalmente, los sensores químicos (Figura 1.1) están formados por dos partes bien diferenciadas: el elemento de reconocimiento o receptor y el transductor. La primera parte es la responsable de la interacción selectiva con el analito generando una señal primaria, y la segunda es la que traduce esta señal primaria en una señal procesable (señal secundaria). Los sensores químicos se pueden clasificar en: electroquímicos, ópticos, térmicos o másicos en función del dominio de la señal primaria.

1.1.1 Sensores electroquímicos

La investigación en el campo de los sensores electroquímicos ha sido una de las ramas más fructíferas, extensas y multidisciplinarias de la química analítica. Los grandes logros obtenidos en este campo se deben, entre otras causas a la integración de varias ciencias: la física, la química orgánica, la química biológica, la ingeniería, entre otras. Los sensores electroquímicos tienen varias ventajas sobre los otros sensores químicos, la más significativa es que suministran directamente la señal en dominio eléctrico, fácilmente procesable por métodos electrónicos, por lo que se utiliza instrumentación típica de laboratorio (potenciómetros y potenciostatos) sin necesidad del empleo de

otros equipos más sofisticados. Además, en muchos casos este tipo de sensores se pueden fabricar con técnicas de producción en serie a muy bajo coste, por lo que puede ser económicamente viable comercializarlos como dispositivos de un solo uso.

Los sensores electroquímicos se clasifican en potenciométricos y voltamperométricos, los sensores potenciométricos se encuentran representados por los electrodos selectivos de iones (ion-selective electrodes, ISEs) y también por los transistores de efecto de campo sensibles de iones (ion-sensitive field-effect transistors, ISFETs), que tienen como señal secundaria una intensidad de corriente, aunque el origen es un potencial de membrana. A los sensores voltamperométricos los representan los electrodos modificados químicamente, que tienen como señal primaria la intensidad de corriente de una reacción electroquímica.

1.1.2 Sensores potenciométricos

Los sensores potenciométricos, son aquellos en los que la señal primaria (potencial eléctrico) se genera en la superficie de un sólido al estar en contacto con una disolución con iones que pueden interaccionar (intercambiándose) con los de la superficie. La actividad de estos iones en la disolución está relacionada directamente con la magnitud de este potencial mediante la ecuación de Nernst.

$$E_{cel} = E_{cel}^0 + \frac{RT}{z_i F} \cdot \ln a_i \quad (1.1)$$

donde E_{cel} es el potencial de la celda, E_{cel}^0 es el potencial estándar de la celda, R es la constante de los gases ($8.314 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$), T es la temperatura (K), F es la constante de Faraday ($9.6446 \cdot 10^4 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$), z_i y a_i son la carga y la actividad respectivamente de la especie que interviene en el proceso. Experimentalmente esta diferencia de potencial es medida entre dos electrodos de una celda galvánica (un electrodo *indicador* y uno de *referencia*) bajo condiciones de corriente nula, gracias a la alta impedancia del equipo de medición (potenciómetro).

1.1.2.1 Electroodos selectivos de iones

Los electrodos selectivos de iones basan su funcionamiento en una membrana que separa dos disoluciones y que sólo interacciona de forma selectiva con un único ion. De esta manera, se produce un intercambio de iones que provoca una separación de cargas a lo largo de la interface membrana-disolución, produciendo a su vez, un potencial interfacial llamado potencial de membrana. La selectividad, que es la contribución fundamental de este tipo de sensores, se logra mediante la incorporación de un elemento de reconocimiento. El reconocimiento se lleva a cabo, a través, de una reacción química selectiva y reversible que se consigue mediante un reactivo inmovilizado e integrado a la membrana. La ecuación que relaciona la magnitud de la diferencia de potencial medida y la actividad de los iones que intervienen en la reacción permselectiva es la siguiente:

$$E_{cel} = cte + \frac{RT}{z_i F} \cdot \ln a_{i(ext)} \quad (1.2)$$

donde *cte* es una constante (que está relacionada con la actividad de los iones implicados en el interior de la membrana, el potencial de unión líquida y el potencial del electrodo de referencia) y $a_{i(ext)}$ es la actividad en la disolución de la especie que interviene en el proceso.

Ésta es la ecuación básica de trabajo con sensores potenciométricos, aunque en presencia de otros iones la selectividad no es ideal y esto hace que en la respuesta del ISE contribuyan iones secundarios o interferentes, de manera que el potencial medido sigue ahora la ecuación de Nikolskii-Eisenmann [1], que tiene en cuenta también la contribución de otros iones:

$$E_{cel} = cte + \frac{RT}{z_i F} \cdot \ln(a_i + \sum_{j \neq i} K_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{z_i/z_j}) \quad (1.3)$$

donde z_i y z_j son la carga del ion principal y del interferente respectivamente, a_i es la actividad del ion principal, a_j la del ion interferente y $K_{i,j}^{pot}$ es el coeficiente de selectividad potenciométrico, que da la medida de la influencia del ion interferente en la respuesta final.

En la búsqueda de materiales para mejorar la selectividad de las membranas potenciométricas, como elemento fundamental en los ISEs, se han producido notables aportes. Justamente la clasificación de los electrodos selectivos se basa en la naturaleza de los materiales empleados en la membrana selectiva. En la Tabla 1.1 se muestra la clasificación reportada por la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) [2].

Tabla 1.1. Clasificación IUPAC de los ISEs según el tipo de membrana que utilizan.

Electrodos selectivos de iones					
Primarios				Compuestos	
Cristalinos		No cristalinos			
Membrana homogénea	Membrana heterogénea	Matriz rígida	Portador móvil	Sensibles a gases	De substrato enzimático

Las membranas cristalinas contienen sitios fijos cargados de un signo, e iones móviles de carga opuesta. Los materiales empleados en este tipo de electrodos son sales inorgánicas como el LaF_3 o el Ag_2S o mezclas de diversos componentes, que tienen la propiedad de ser conductores iónicos a temperatura ambiente.

Los electrodos de membrana heterogénea se preparan mezclando algunas de las formas cristalinas mencionadas anteriormente con un elemento aglutinante o inerte [3]. *El electrodo selectivo de membrana no cristalina* (de matriz rígida) por excelencia es el electrodo de vidrio sensible al pH de uso generalizado en todos los laboratorios químicos. *Las membranas de portador móvil* actualmente son una familia de sensores de especial importancia en el mundo científico. La gran versatilidad de usos y diversidad de sustancias que se pueden determinar avalan su aceptación. En la versión moderna éstos se basan en una matriz polimérica de soporte que contiene al elemento electroactivo conocido como portador iónico o ionóforo disuelto en un disolvente

orgánico llamado plastificante, como componentes principales. En función de la naturaleza del ionóforo empleado, la IUPAC recomienda la clasificación de este último tipo de sensores en electrodos de portador móvil cargado positivamente (catiónico), cargado negativamente (aniónico), neutro y de par iónico hidrofóbico.

En la presente tesis se diseñaron y utilizaron electrodos de portador móvil neutro empleando derivados de tioureas y otros ionóforos comerciales, dependiendo de la aplicación requerida. Es por ello que este grupo será tratado en detalle en el siguiente epígrafe.

1.1.2.2 ISEs basados en portador móvil neutro

Los ISEs de membrana líquida con portador móvil neutro son la variante más popular dentro de esta familia de sensores. En este caso la especie responsable del reconocimiento es una molécula neutra, generalmente un agente complejante. El mecanismo de reconocimiento se basa en principios de la química supramolecular sustrato/receptor (*host/guest*).

Las moléculas utilizadas para este fin (éteres corona, ligandos macrocíclicos, entre otros) tienen la característica de poseer una cavidad polar, con átomos electrodonadores que interaccionan con el ion y otros grupos apolares que permiten la solubilidad en la matriz polimérica. La esfera de coordinación tiene entre 5 y 8 puntos de coordinación con geometría específica, y el ionóforo debe ser lo suficientemente grande para que no presente hidrofiliidad y lo suficientemente pequeño para tener movilidad dentro de la membrana [4-6]. El reconocimiento selectivo se explica porque iones demasiado grandes están impedidos para acceder a esta cavidad y los demasiados pequeños no se pueden enlazar con la fuerza adecuada a los puntos de coordinación.

La composición típica de la membrana contiene un 66% de plastificante, un 33% de PVC, un 1% de ionóforo y en ciertos casos se puede incluir un 0.5% aproximadamente de aditivos iónicos para mejorar las características de la respuesta de los ISEs [7].

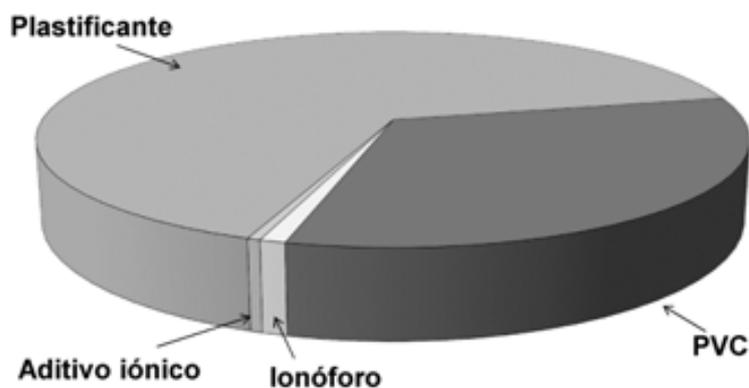


Figura 1.2. Composición típica de una membrana selectiva de iones.

1.2 Los derivados de tioureas como portador móvil neutro

Hoy en día, existe un creciente interés por el desarrollo de materiales para el reconocimiento de especies químicas contaminantes. En ese sentido, los derivados de tioureas han sido utilizados como agentes complejantes de metales de transición [8-10]. La química de coordinación de los derivados de tioureas (ver Figura 1.3) es diversa; contienen heteroátomos (S y N), sitios electrodonadores disponibles para coordinar con iones metálicos, además de otros efectos presentes, provocados por el isomerismo conformacional, los impedimentos estéricos, la presencia de sitios electrodonadores en los grupos sustituyentes o la existencia de interacciones intramoleculares.

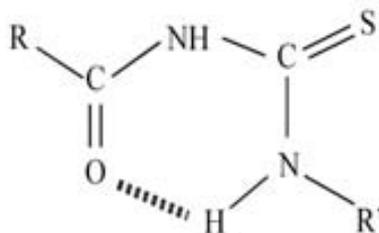


Figura 1.3. Estructura de un derivado de tiourea

Estas propiedades han dirigido el uso de estos ligandos hacia nuevas aplicaciones en el campo de los sensores químicos. Al revisar la literatura científica encontramos un gran número de contribuciones en este sentido. Como el trabajo desarrollado por Otazo, en el que describe la síntesis de 46 derivados de tioureas como ionóforos potenciales para

metales pesados, algunos de ellos fueron empleados en electrodos de membrana potenciométrica selectivas a Pb(II), Cd(II) y Hg(II) con muy buenos resultados [11].

1.3 Matrices de sensores

La resolución de mezclas multicomponentes es una tarea muy importante en la química analítica, en el campo de los sensores este objetivo ha podido ser abordado gracias a la incorporación de matrices de sensores en lugar de un sensor individual. Esta nueva tendencia proporciona mucho más información, lo que permite realizar análisis simultáneos y resolver otras problemáticas que de otro modo serían mucho más difícil de lograr. Existen tres tipos de matrices de sensores: la matriz de sensores redundantes, la matriz de sensores selectivos y la matriz de sensores con selectividad cruzada.

La matriz de sensores redundantes como su nombre lo indica están formadas por sensores del mismo tipo, por lo que proporcionan una señal replicada. Uno de los usos más frecuentes de estos dispositivos es la construcción de sistemas de autodiagnóstico, que se encargan de detectar malfuncionamiento y/o degradación en la respuesta de los sensores [12].

La matriz de sensores selectivos están formadas por una serie de sensores selectivos a diferentes analitos. Permiten la determinación de varias especies en paralelo gracias a la adquisición multicanal de la señal, aunque para cada sensor hay que realizar una calibración independiente. El principal aporte de este tipo de matriz es que permite una reducción importante de los costes de análisis, gracias a la reducción del volumen de muestra, reactivos y tiempos de análisis [13, 14].

La matriz de sensores con selectividad cruzada es la primera bioinspirada y es la base de las narices y lenguas electrónicas. En ésta se incorporan sensores de baja selectividad que muestran una respuesta cruzada a un cierto número especies [15]. El éxito de estos dispositivos está en la habilidad de generar información multidimensional en tiempo real y permitir la identificación y compensación del efecto de matriz.

Dentro de las aplicaciones más significativas de este tipo de matrices está la determinación simultánea de un número de analitos en muestras complejas. Para este propósito, la baja selectividad de los sensores debe ser compensada con el procesamiento de los datos obtenidos; lo que hace necesario emplear herramientas de calibración multivariante. Sin embargo, la aplicación más peculiar de las matrices de selectividad cruzada es la de reconocer percepciones complejas, como los olores o los gustos, que no se basan en concentraciones concretas de especies. Estas matrices, debido a las similitudes con los sistemas biológicos similares, reciben el nombre de nariz electrónica (Electronic Nose, EN) o lengua electrónica (Electronic Tongue, ET) según se apliquen a muestras gaseosas o líquidas, respectivamente [16-20].

1.4 Lenguas electrónicas (ETs)

La aparición de las narices electrónicas en la década de los 80 y las lenguas electrónicas unos años después, se pueden considerar como aportes más que beneficiosos para la química analítica. Estos dos sistemas que mimetizan los sentidos del olfato y el gusto respectivamente se han popularizado gracias a su eficacia en una variedad de aplicaciones. Han sido aprovechados en las industrias alimentarias, de bebidas, farmacéutica y cosmética; donde el sabor y olor son parámetros que influyen directamente en la calidad del producto y por tanto en su éxito comercial. También han recibido atención en otros campos como la criminalística, el medio ambiente, la monitorización de procesos productivos, tanto para la determinación de los olores y sabores, como para determinaciones simultáneas de especies de interés.

Una nariz electrónica se puede definir como un sistema de análisis de muestras gaseosas formada por una matriz de sensores con selectividad cruzada o poco selectivos y un procesamiento matemático capaz de reconocer olores [16, 17]. En el año 1982 se publicó el primer artículo, en el que se simulaba el sentido del olfato [21]. En este trabajo se utilizaron varios sensores químicos que hacían el papel de receptores biológicos y métodos de reconocimiento de patrones para discriminar diferentes olores.

Pocos años después de la aparición de la EN surgió la versión de estos sistemas de análisis para muestras líquidas: la lengua electrónica [22]. La IUPAC define la ET como "un sistema multisensor formado por una matriz de sensores de baja selectividad, que utiliza procedimientos matemáticos avanzados para procesar las señales, basados en el reconocimiento de patrones y/o en el análisis multivariado, como las redes neuronales artificiales (Artificial Neural Network, ANN), el análisis de componentes principales (Principal Component Analysis, PCA), etc" [15].

Los antecedentes históricos de las ETs se remontan a las investigaciones realizadas por Otto y Thomas en el año 1985 [23], que fueron los primeros autores en presentar el término de respuesta cruzada. En la década de los 90, Toko propuso el primer dispositivo analítico capaz de imitar el sentido del gusto [24]. El primer trabajo de aplicación cuantitativa que combina el procesamiento con ANN y matrices de sensores potenciométricos fue publicado por Van der Linden [25]; posteriormente Vlasov propone el concepto de ET [26]. En los años posteriores las lenguas electrónicas se fueron popularizando; según del Valle el número de publicaciones desde 1995 hasta 2009 se fue incrementando hasta cerca de 40 artículos por año [20].

Las lenguas electrónicas siguen siendo un tema de investigación por el que apuestan muchos grupos de investigación. En una búsqueda realizada en Scopus (con las palabras claves: lengua electrónica) para el año 2011, se encontraron 51 artículos de la temática. La Figura 1.4 muestra la distribución de las publicaciones en función del tipo de lengua electrónica empleada (en base a la naturaleza de la señal primaria de los sensores empleados en la ET) y del tipo de análisis realizado (cuantitativo o cualitativo).

De forma general, el comportamiento es similar a los años anteriores. Según el gráfico, las ET basadas en sensores potenciométricos son las más utilizadas [27-31], seguramente por la gran variedad y versatilidad de ionóforos disponibles comercialmente. Las lenguas voltamperométricas también son bastante comunes, especialmente cuando se trata de detectar especies con propiedades redox [32, 33]. Los otros grupos de sensores empleados en ET pero con una menor participación, son los impedimétricos [34, 35], ópticos [36], piezoeléctricos [37] y biosensores [38, 39].

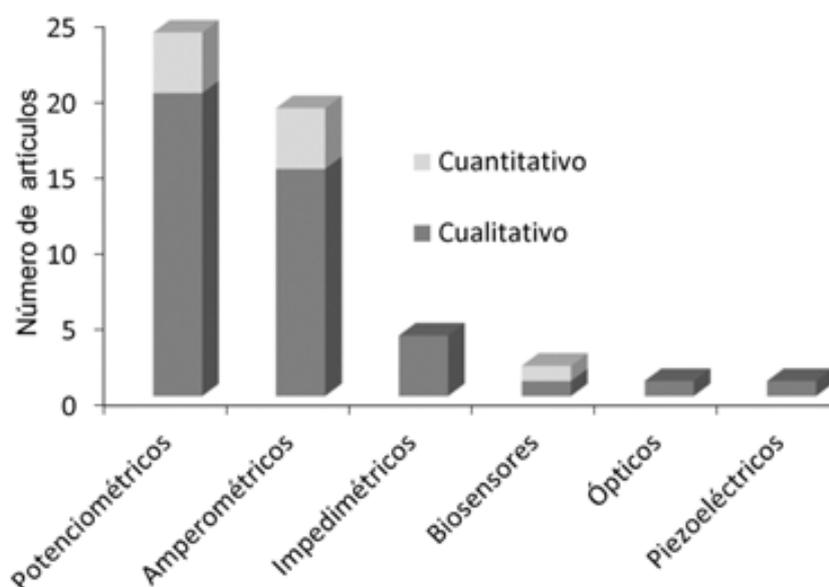


Figura. 1.4. Tipos de sensores empleados en lenguas electrónicas y tipos de análisis realizado en publicaciones del 2011.

Las aplicaciones más extendidas son las relacionadas con el análisis cualitativo, como la clasificación de variedades de muestras o identificación de especies [33, 40-43], el control de la calidad de alimentos o productos farmacéuticos [44] y el reconocimiento de productos adulterados [45]. La otra aplicación importante pero menos desempeñada de las ET es la cuantificación de varios analitos en una muestra de forma simultánea [46-48].

El reconocimiento de las ventajas mostradas por estos sistemas ha traspasado la frontera del campo de las ciencias y se han llevado a la sociedad. Los dispositivos más comercializados han sido las narices electrónicas; se pueden encontrar decenas de ellas en el mercado [49, 50]. Sin embargo, solo cuatro empresas se encargan de comercializar sistemas analíticos basados en lenguas electrónicas, los cuales se citan a continuación:

- Taste Sensing System producida por Anritsu/Atsugi Corp. en Japón, consta de una matriz de sensores compuesta por 7 transductores con diferentes membranas lípido/polímero [51, 52].

- α -ASTREE desarrollada por la compañía francesa Alpha M.O.S., emplea una matriz de 7 ISFETs con respuesta cruzada a compuestos orgánicos e inorgánicos [43, 53].
- MACS-multi-array producido por McScience en Corea del Sur, compuesta por 7 ISEs de contacto sólido [54, 55].
- Electronic Tongue, una empresa rusa asociada a la Universidad de San Petersburgo, que es proveedora de diferentes componentes de lenguas electrónicas [56].

1.5 Procesamiento multivariante

Para el procesamiento multivariante de las señales obtenidas a partir de las matrices de sensores se utilizan herramientas quimiométricas avanzadas. Los métodos de tratamiento de datos empleados para las EN son esencialmente los mismos que se emplean para las ET. Sin embargo, existen algoritmos de procesamientos más indicados para las aplicaciones cualitativas (identificación y clasificación) como por ejemplo el análisis de componentes principales, el análisis de discriminante de los mínimos cuadrados parciales (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA), el análisis de discriminante lineal (Linear Discriminant Analysis, LDA), las máquinas de soporte vectorial (Support Vector Machine, SVM), entre otros. Sin embargo, cuando se trata de análisis cuantitativo los más usados son la regresión con componentes principales (Principal Component Regression, PCR), la regresión por los mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, PLS) y las redes neuronales artificiales. De todos ellos será detallado el último, por ser el utilizado en la presente tesis.

1.5.1 Preprocesamiento de la señal

El procesamiento de los datos es uno de los pasos más importante en el trabajo con lenguas electrónicas. Durante un análisis con estos sistemas analíticos se generan señales complejas y con una gran cantidad de información que requieren a su vez, de un

eficiente preprocesamiento de los datos obtenidos. La preparación o preprocesamiento de los datos engloba a todos aquellos métodos de análisis que permiten mejorar la calidad de un conjunto de datos, de modo que las técnicas de extracción de pautas puedan obtener mayor y mejor información [57].

Uno de los puntos importantes en la obtención de datos de calidad es evitar efectos aleatorios no deseados, como es el caso del ruido. El método más común para evitar el ruido es replicar las medidas, ya que la media de la señal replicada compensa los errores aleatorios, con lo cual se consigue aumentar la relación señal/ruido (S/N).

En el caso específico de las ETs potenciométricas hay que tomar precaución de dos fenómenos que son frecuentes en los sensores de esta tipología, nos referimos al efecto de memoria o histéresis y a la deriva. Estos fenómenos típicos de los ISEs hacen que los parámetros de respuesta no permanezcan estables durante el tiempo de los experimentos, aspecto de suma importancia para obtener información analítica fiable, sobre todo cuando la medición se realiza durante un largo intervalo de tiempo. Una manera de abordar estos problemas es considerar el día de medición como una variable más del sistema. La otra es realizar correcciones frente a una disolución de referencia, de composición constante, conocida y con una concentración de analito mucho más baja que cualquier muestra a medir; de esta manera, se puede tratar la histéresis. La deriva queda también compensada porque las mediciones de la disolución de referencia y las muestras se realizan en las mismas condiciones.

Para evitar que algunas variables tengan más peso que las otras, por el hecho de tener unidades diferentes, como por ejemplo: el potencial (mV) y la temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pueden emplearse diferentes estrategias, como el centrado, la estandarización, el autoescalado y la normalización.

- En el centrado todos los datos se refieren a la media aritmética de los mismos.
- La estandarización consiste en conseguir que los datos tengan desviación estándar igual a la unidad.
- El autoescalado se basa en aplicar el centrado y la estandarización.

- La normalización consiste en conseguir que los datos estén dentro del intervalo $[-1, 1]$, es decir, que el valor mínimo de los datos se refiere al límite inferior del intervalo (-1) y el máximo al superior (1).

Muchas veces es necesario realizar una compactación de los datos, sobre todo cuando la señal es compleja y voluminosa. El PCA es uno de los métodos que se utiliza con más frecuencia [58, 59]. Otras técnicas empleadas por los especialistas son: la descomposición por wavelets [60], por polinomios de Legendre [61, 62] o por la transformada de Fourier [63].

La transformada discreta de Fourier (Discrete Fourier Transform, DFT) es un método de tratamiento de señales muy empleado en muchos campos de la ciencia, utilizado generalmente para hacer análisis de frecuencias. La transformada rápida de Fourier (Fast Fourier Transform, FFT) es el algoritmo empleado generalmente para hacer el análisis de Fourier o su inversa (FFT^{-1}) ya que la DFT no es un algoritmo lo suficientemente rápido como para hacer los análisis en tiempo real.

En términos generales la FFT, descompone la señal original en una serie de coeficientes que corresponde cada uno a una cierta frecuencia. Las señales siempre se pueden reconstruir aplicando la FFT^{-1} a los coeficientes de Fourier obtenidos, también se pueden reconstruir las señales originales con bastante fidelidad empleando pocos coeficientes. De esta manera, utilizando un número reducido de coeficientes podemos efectuar una eficiente compactación de la información de partida.

1.5.2 Redes neuronales artificiales

Una red neuronal es un modelo computacional con un conjunto de propiedades específicas, como son: la habilidad de adaptarse o aprender, generalizar u organizar la información, todo ello basado en un procesamiento eminentemente paralelo y que intenta reproducir el comportamiento del cerebro. Muchos autores prefieren el uso de las redes neuronales artificiales para procesar datos obtenidos en matrices de sensores [25, 64], tanto para aplicaciones cualitativas como cuantitativas. La respuesta cruzada

proveniente de los ISEs en las matrices de sensores es de naturaleza no lineal y las ANNs tienen la habilidad de modelar de forma efectiva este tipo de datos [65]. Estos modelos constan de dispositivos elementales de proceso: *las neuronas*.

1.5.2.1 El perceptrón

El perceptrón llamado también neurona artificial es la unidad básica en las ANN; fue desarrollado en analogía directa a la neurona biológica como un método capaz de realizar tareas de clasificación [65, 66].

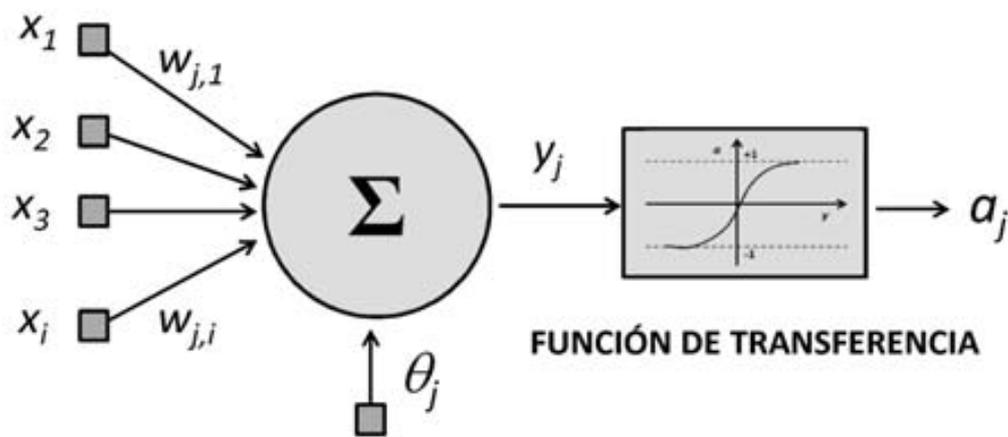


Figura 1.5. Representación esquemática de un perceptrón.

El perceptrón es un elemento de procesamiento formado por un conjunto de entradas y generalmente una única salida. El mecanismo de funcionamiento se encuentra esquematizado en la Figura 1.5 y se puede explicar de la siguiente manera: para un perceptrón j se realiza la suma ponderada de las entradas x_i multiplicada por ciertos pesos de conexión $w_{j,i}$ y se suma también un valor θ_j correspondiente al sesgo, que da como resultado un cierto valor y_j . La suma de las entradas y_j se calcula según la ecuación 1.4.

$$y_j = \sum w_{j,i} \cdot x_i + \theta_j \quad (1.4)$$

Al igual que con la neurona biológica, si este valor no supera a cierto valor umbral el perceptrón sigue inactivo, y si lo consigue superar se aplica una función de transferencia FT al valor para obtener la salida a_j como resultado.

$$a_j = FT\{y_j\} \quad (1.5)$$

Gracias al uso de funciones de transferencia continuas podemos hacer que las neuronas respondan con una salida gradual y no limitarlas a la respuesta binaria propia del sistema biológico. Las condiciones básicas para llevar a cabo el aprendizaje implican emplear una función matemática como función de transferencia neuronal, que debe ser monótona, creciente dentro del intervalo de aplicación y tener la derivada continua en el intervalo [67]. En la Figura 1.6 se representan las funciones de transferencia más empleadas.

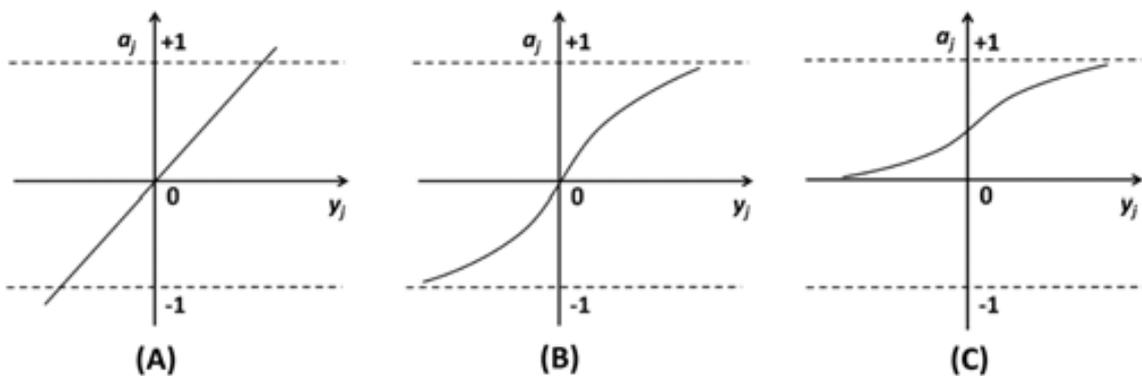


Figura 1.6. Funciones de transferencias más comunes: (A) lineal (*purelin*), (B) tan-sigmoidal (*tansig*) y (C) log-sigmoidal (*logsig*).

El conocimiento necesario para resolver los problemas planteados en el perceptrón se almacenan en la matriz de pesos; éstos se ajustan para minimizar una función de error que compara los valores obtenidos en la salida con los valores esperados para una serie de patrones. No obstante, las dificultades del perceptrón para resolver problemas sencillos de clasificación no lineal, como la función lógica XOR o problemas reales más complejos, fue causa de un primer abandono de este modelo.

1.5.2.2 Las ANN multicapa o perceptrón multicapa

Las deficiencias del perceptrón se lograron resolver conectando varias capas sucesivas de perceptrones. Esta nueva estrategia tiene más similitudes al funcionamiento del cerebro humano, donde el procesamiento de la información se hace paralelamente por diferentes canales mediante la interconexión de muchas neuronas. A partir de ellas, se pueden generar representaciones específicas, de tal forma que un estado conjunto de ellas puede significar una letra, un número u otro objeto. Generalmente, se pueden encontrar tres tipos de neuronas: Aquellas que reciben estímulos externos relacionados con el aparato sensorial, que tomarán la información de entrada (*unidades de entrada*). Dicha información se transmite a ciertos elementos internos que se ocupan de su procesamiento. Es en la sinapsis donde las neuronas correspondientes a este segundo nivel, generan cualquier tipo de representación interna de información. Como no tienen relación directa con la información de entrada ni con la de salida, estos elementos se denominan *unidades ocultas*. Una vez finalizado el período de procesamiento, la información llega a las *unidades de salida*, cuya misión es dar la respuesta al sistema. Por la disposición de las conexiones siempre en un mismo sentido, este tipo de ANN se llama también red unidireccional o *feedforward*. Las ANNs multicapas pueden disponer de más de una capa oculta, pero se ha demostrado que muchos problemas químicos se pueden resolver con una única capa oculta, simplificando así el modelo [65]. A continuación, en la Figura 1.7 se puede ver un esquema de una red neuronal multicapa.

La generación del modelo mediante las ANNs se obtiene de buscar la mejor combinación de pesos de las conexiones sinápticas, mediante interacciones sucesivas con los datos de una serie de patrones destinados al entrenamiento de la red. Una vez encontrado el modelo óptimo, éste se puede emplear para la predicción de muestras desconocidas.

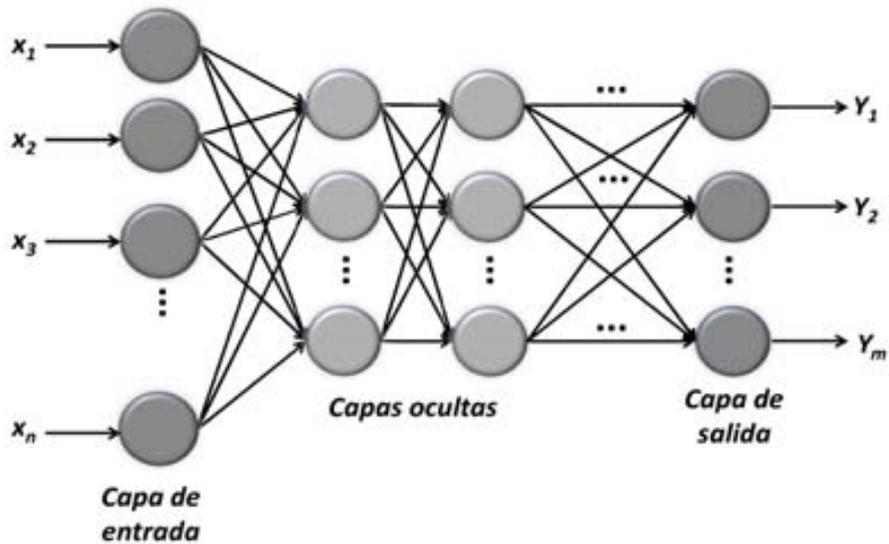


Figura 1.7. Representación de una ANN multicapa o perceptrón multicapa.

1.5.2.3 Las ANNs con retropropagación

Los métodos más empleados para lograr el proceso de aprendizaje o entrenamiento en las ANNs son los algoritmos de *retropropagación* o *backpropagation*. El proceso de aprendizaje en las ANNs se basa en optimizar los valores de los pesos w_i de manera que se pueda obtener el mejor modelo a partir de un conjunto determinados de datos.

En los métodos de retropropagación se calcula el error como la diferencia entre la salida esperada (o_{pj}) y la obtenida (t_{pj}) por cada neurona j y para cada patrón p . Luego, se utiliza este error para efectuar variaciones en los pesos para minimizarlo. Una de las maneras más habituales de minimizar el error es emplear el algoritmo de entrenamiento de gradiente descendiente (*GD*); éste es un procedimiento iterativo en el que la matriz de los pesos se ajusta siguiendo la dirección del gradiente de una función de error (E_p), para minimizarla. La función de error empleada es la siguiente:

$$E_p = \frac{1}{2} \sum_j^n (t_{pj} - o_{pj})^2 \quad (1.6)$$

El valor del peso de una conexión en el estado $(t + 1)$ está relacionado con el valor de su peso en el estado t por la ecuación siguiente:

$$w_{pj}(t + 1) = \beta \cdot w_{pj}(t) + \alpha \cdot \delta_{pj} \cdot o_{pj} \quad (1.7)$$

donde α es la velocidad de aprendizaje (learning rate), β es el momento (momentum) y δ_{pj} la magnitud del cambio, siendo el producto $\delta_{pj} \cdot o_{pj}$ la contribución del gradiente. El parámetro velocidad de aprendizaje toma valores entre 0 y 1 y sirve para acelerar o frenar el descenso hacia el valor mínimo del error global del sistema. El momento también puede variar entre 0 y 1, y sirve para reducir la posibilidad de que el sistema quede atrapado en un mínimo local.

Esta expresión se puede derivar y se obtiene la magnitud de los cambios de los pesos con el fin de disminuir el error durante el entrenamiento, para la capa de salida:

$$\delta_{pj} = k \cdot o_{pj} \cdot (1 - o_{pj}) \cdot (t_{pj} - o_{pj}) \quad (1.8)$$

y para las capas ocultas:

$$\delta_{pj} = k \cdot o_{pj} \cdot (1 - o_{pj}) \cdot \sum_k \delta_{pk} \cdot w_{jk} \quad (1.9)$$

Estas dos expresiones se conocen como la regla delta generalizada y muestran de qué manera depende el error de las capas subsiguientes. Los pesos de la capa de salida se ajustan y se retropropaga el error, ajustando los pesos y continuando con este proceso hasta llegar a la capa de entrada.

1.5.2.4 El sobreentrenamiento y regulación Bayesiana

El sobreentrenamiento es un inconveniente que puede aparecer durante el proceso de entrenamiento o aprendizaje de las ANNs. Este problema aparece cuando el error objetivo propuesto para las muestras de entrenamiento es muy bajo, pero si se procesan

nuevas muestras que no han participado en el entrenamiento se obtiene un error importante. La Figura 1.8 (B) ejemplifica esta situación, en la que la red memoriza muy bien las muestras de entrenamiento, pero, en cambio, las predicciones de las muestras de validación se alejan bastante del modelo real.

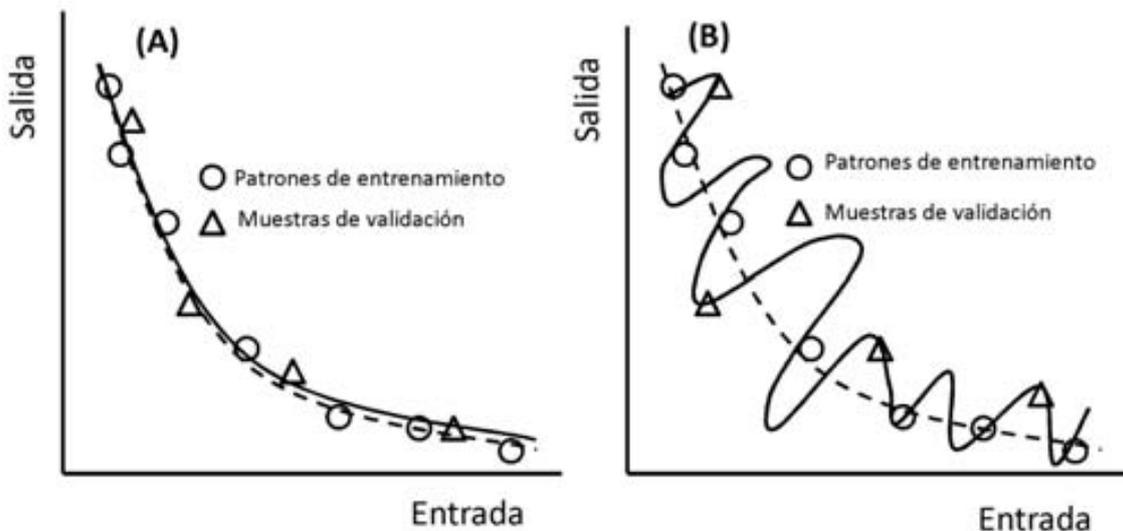


Figura 1.8. (A) ANN bien ajustada y (B) ANN con sobreentrenamiento.

Existen dos métodos para evitar el problema del sobreentrenamiento: *parada en el tiempo* y *regulación Bayesiana*. El primero de ellos se basa en un principio básico, detener el proceso de entrenamiento antes de que se produzca este problema. Esto se consigue al detectar la situación de sobreentrenamiento mediante un conjunto de muestras que no participan en la construcción de la red; este conjunto de muestras se denomina conjunto de validación interna. Así, la totalidad de las muestras se dividen en tres grupos: un primer grupo llamado conjunto de entrenamiento, que sirve para construir el modelo mediante el ajuste de los pesos de la ANN; el segundo grupo de validación interna, que detecta el sobreentrenamiento y el tercer grupo llamado conjunto de validación externa, que permite evaluar la capacidad de predicción del ANN gracias a muestras que no han participado en el proceso de construcción de la red.

La *parada a tiempo* funciona de manera que durante el entrenamiento de la red se monitoriza el error de validación interna. Este error es indicativo del grado de sobreentrenamiento, por lo que cuando se invierte la tendencia y comienza a crecer, el

entrenamiento se detiene y se devuelven los valores de los pesos de interacciones anteriores que estaban en memoria temporal.

La regularización bayesiana (RB) busca la red más simple, que mejor ajusta la función que queremos modelar, y llega a predecir con más eficiencia muestras que no han participado en el entrenamiento. En comparación con el algoritmo del descenso del gradiente, el algoritmo de RB no sólo considera el error global de la red, sino que también cuenta con cada uno de los valores de los pesos de la red. De esta manera, también se busca minimizar los valores actuales de los pesos y con ello se consigue que la complejidad de la ANN disminuya, suavizando su respuesta y evitando el sobreentrenamiento. Una de las principales ventajas de la RB es que no necesita el conjunto de validación interna, de modo que podemos distribuir más muestras entre los otros dos grupos.

1.6 Las ETs en FIA y en la monitorización de procesos

La llegada de las lenguas electrónicas ocurrió en un momento propicio, donde ya existían otros aportes importantes en el campo de la Química Analítica. Quizá el auge de las ET entre otras causas se debe a la posibilidad de integrarse con esos avances logrados. La miniaturización de los sensores es uno de estos resultados, ya que ha permitido disminuir significativamente el consumo de muestra en los análisis químicos [68], aspecto significativo por ejemplo, en el análisis biológico [13]. Además, un avance más reciente con el que se puede lograr una perfecta integración a las ET, son las *micro-celdas* de análisis continuo, que permiten determinar una variedad de especies en un pequeño volumen de muestra [69, 70].

El análisis por inyección en flujo (Flow Injection Analysis, FIA) es una técnica ya establecida por más de 30 años en la Química Analítica [71]. Una de las ventajas más importante que ofrece esta metodología y sus variantes, es la posibilidad de realizar muestreo automático, incluyendo la preparación preliminar de las muestras (concentración, extracción, enmascaramiento, etc.).

La Figura 1.9 muestra el esquema básico de un equipo de FIA. Está formado por un sistema de impulsión unidireccional (en la mayoría de los casos es una bomba peristáltica), un sistema de inyección de la muestra, una espiral de reacción y un sistema de detección. La bomba transporta la muestra a los diferentes elementos del sistema, el sistema de inyección que generalmente es una válvula, permite que pase una cantidad controlada de muestra a la corriente principal del sistema y que llegue a la espiral de reacción donde se dispersa con la disolución portadora y cualquier otro reactivo útil para una correcta determinación de los analitos en el sistema de detección (los sistemas de detección más empleados son espectroscópicos y electroquímicos).

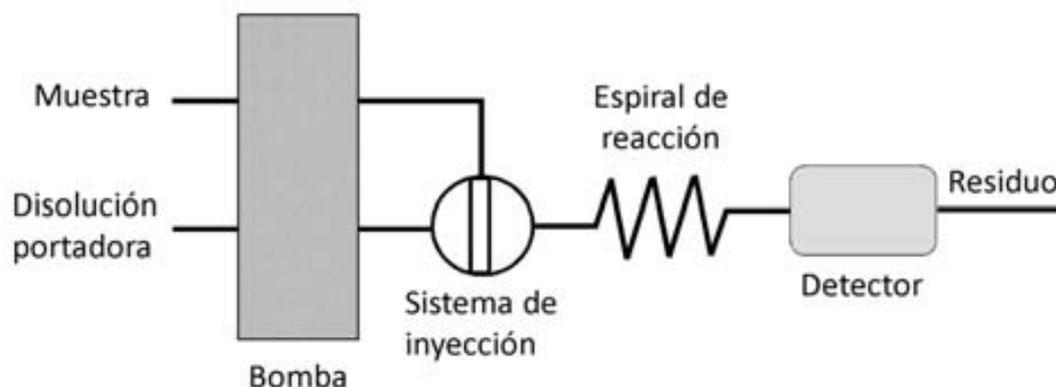


Figura 1.9. Elementos básicos de un equipo de FIA.

El análisis de inyección secuencial (Sequential Injection Analysis, SIA) es la variante de análisis en flujo que más ha favorecido a las ETs, siendo de una gran ayuda durante la etapa de entrenamiento. Con el SIA se pueden preparar automáticamente cientos de disoluciones estándares compuestas por varias especies para desarrollar el modelo de calibración [20, 72].

Los métodos mencionados anteriormente logran su completa automatización con la ayuda de instrumentación virtual, que puede ser implementada en LabVIEW, Visual Basic, Tagrana, etc. Estos entornos de programación permiten controlar completamente las bombas, válvulas y obtener un adecuado registro y tratamiento de la señal proveniente de los detectores.

La integración de todos estos avances y métodos con las lenguas electrónicas ha proporcionado que hoy tengamos sistemas analíticos versátiles y totalmente automatizados, con ventajas inestimables en muchos sentidos, pero sobre todo desde el punto de vista económico. Se ha reducido significativamente los gastos de personal, permite trabajar sin limitación de tiempo, los procesos se han hecho más fiables, evitándose el error humano y la actuación sobre el sistema se realiza en el momento más oportuno y con un tiempo de actuación conocido y controlado.

Se pueden citar algunas de las aplicaciones de la monitorización de procesos en diferentes campos de aplicación. En la agricultura, Gutiérrez y colaboradores desarrollaron un sistema basado en una matriz de sensores para monitorizar nutrientes (NH_4^+ , K^+ y NO_3^-) y contaminantes (Na^+ y Cl^-) en disoluciones de riego en invernaderos [73]. Para la actividad ganadera se han logrado construir dispositivos capaces de clasificar las fuentes de leche, vigilar las condiciones de limpieza y también estimar la frescura del producto [74, 75]. En la medicina, se ha realizado la monitorización “on-line” de urea y creatinina a pacientes durante el proceso de hemodiálisis [76]. Finalmente en biotecnología, el control de procesos de fermentación para la producción natural de 2-heptanona [77] y otros productos [78, 79]. También hay que destacar que el uso de sistemas de flujo con matrices de sensores no solo facilita el funcionamiento de todo el sistema, sino que además, con una adecuada selección del método de tratamiento de los datos, puede mejorar la exactitud de los métodos tradicionales de análisis [80, 81].

1.7 ET en sistemas de valoraciones automatizados

En la química analítica los métodos volumétricos ocupan un lugar muy importante; muchas determinaciones en la actualidad siguen teniendo a las valoraciones como técnicas de referencia. El empleo de instrumentación electroquímica para determinar el punto de equivalencia es una práctica conocida hace más de 50 años y permitió que se pudieran construir equipos automáticos, capaces de mejorar la precisión y exactitud de las determinaciones. La Figura 1.10 muestra los elementos necesarios de un equipo automático de valoraciones potenciométricas.

Estos sistemas requieren una bureta automática conectada por un extremo al recipiente de agente valorante y por el otro a la celda de medición, donde se encuentra la muestra a analizar. La diferencia de potencial entre el electrodo de referencia y el electrodo indicador es registrado después de cada adición de agente valorante. Tanto el sistema de medida como la bureta están controlados mediante un ordenador.

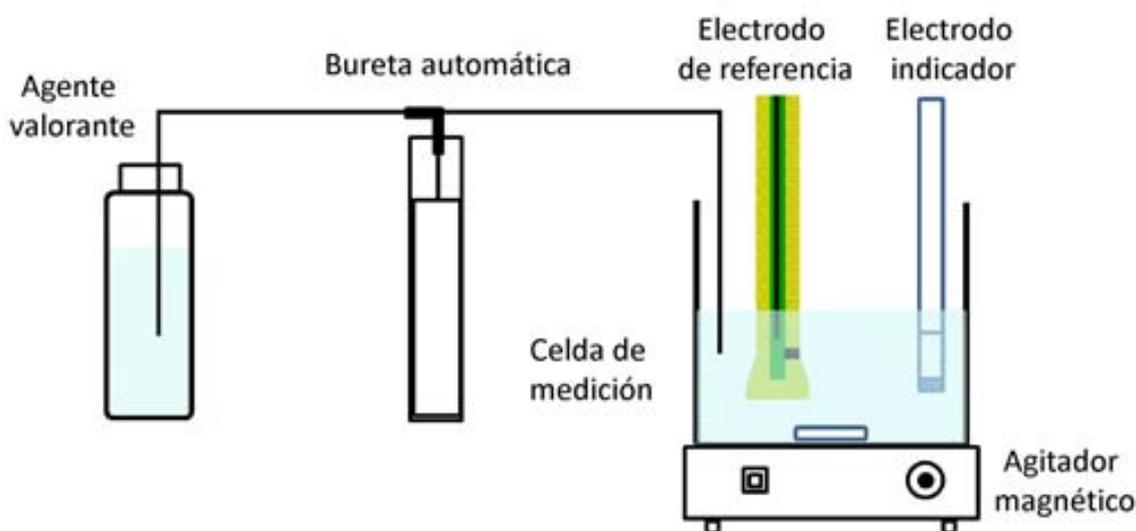


Figura 1.10. Elementos básicos de un sistema automático de valoración potenciométrica.

Una de las desventajas de esta técnica es la poca habilidad de resolver mezclas de elementos con propiedades químicas semejantes, capaces de reaccionar en condiciones muy similares con el agente valorante. En el caso específico de las valoraciones complexométricas se han empleado alternativas para lograr determinaciones simultáneas, como el empleo de agentes enmascarantes, o añadir agentes complejantes para desplazar uno de los puntos de equivalencia y poder visualizarlo mejor, sin embargo estas contribuciones solo han sido eficientes para mezclas de dos analitos [82].

Recientemente, se han combinado procedimientos de análisis multivariante en valoraciones potenciométricas, con el objetivo de extraer mucha más información sobre la composición de muestras compuestas por varios analitos. Con esta nueva estrategia se han podido resolver mezclas ácido-base utilizando el electrodo de vidrio (pH) como sistema de detección y NaOH como agente valorante [83-85] o mezclas de metales cuando se hacen valoraciones complexométricas [86]. Otro logro reportado fue la

determinación de mezclas de ácidos en zumos de fruta gracias a la combinación de las ANN y valoraciones [87].

Una nueva propuesta que todavía está poco explorada pero que va mostrando muy buenos resultados, es incorporar una lengua electrónica como método de detección del punto final. El empleo de una matriz de sensores con respuesta cruzada a los analitos presentes en la muestra genera una información multivariada con la que se puede caracterizar mejor la mezcla, sobre todo si se realiza un adecuado procesamiento matemático de la señal obtenida.

Esta propuesta, iniciada por Calvo y colaboradores [88], describe un procedimiento rápido con un número fijo y reducido de adiciones de agente valorante que se aplicó a la resolución de mezclas binarias de calcio y magnesio en aguas minerales. La matriz de sensores utilizada estaba compuesta por ISEs de membranas polimérica comerciales y ANN como método de tratamiento multivariante. Posteriormente la idea se extendió a la resolución de mezclas ternarias de metales alcalinotérreos (calcio, magnesio y estroncio) [89]. La combinación de la valoración potenciométrica y la lengua electrónica ha sido también empleada en análisis cualitativo, específicamente en la clasificación de aminoácidos y oligopéptidos, empleando una matriz de sensores potenciométricos y PLS-DA como método de tratamiento [90].

En la presente tesis nos proponemos emplear esta misma estrategia para la resolución de mezclas de metales de transición mediante valoración complexométrica y una ET potenciométrica para detectar el punto final.

1.8 Principios de la biosorción

El proceso de biosorción puede ser definido como la captación de contaminantes presentes en una solución acuosa por un material biológico, a través de mecanismos fisicoquímicos o metabólicos. La biosorción hace referencia a un caso específico de sorción basado en la utilización de una fase sólida (sorbente) que se obtiene a partir de distintos tipos de biomateriales o biomasa. La capacidad de ciertos tipos de biomasa

para concentrar e inmovilizar metales de transición puede ser más o menos selectiva. Esto depende, en cierta medida, del tipo de biomasa, de la naturaleza de la mezcla a tratar, de la preparación de la biomasa y del proceso físico-químico implicado [91].

La extracción de metales mediante biosorbentes vegetales se atribuye a sus proteínas, carbohidratos y componentes fenólicos que contienen grupos amino, fosfatos, hidroxilo, sulfatos y carboxilo que pueden atrapar los iones metálicos. Diversos materiales vegetales se han empleado como biomasa en la biosorción de metales de transición, variedades de algas [92], plantas florales, como el girasol [93], árboles frutales [94] y de otras clases [95], entre otros.

1.8.1 Mecanismos de biosorción

Los mecanismos de biosorción son muy variados y dependen, en cada caso, del metal y del tipo de material sorbente. La biosorción puede ser estudiada como cualquier otro tipo de sorción. Si bien parece estar representada mayormente por el mecanismo de intercambio iónico, la compleja estructura de los biomateriales hace que el mecanismo de retención de metales pueda ser más complejo que un simple intercambio iónico.

Los principales mecanismos que pueden estar presentes en los procesos de sorción son los siguientes:

Absorción: es el proceso en el cual las moléculas se adhieren a la superficie del sólido. La unión entre la superficie del sorbente y el metal se produce por fuerzas de atracción electrostática o de Van der Waals. Este mecanismo está presente en la sorción de diversos metales con biomasa microbiana.

Intercambio iónico: gran parte de los sorbentes contienen grupos iónicos contrarrestados mediante iones Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en sus estructuras. Estos cationes pueden ser intercambiados con los iones metálicos y quedar los últimos unidos al material.

Complejación: La unión entre el sorbente y el metal se produce a través de formaciones de complejos en la superficie del material, al poseer éste ligandos unidentados o polidentados (quelatos), según si pueden coordinar uno o más electrones con el metal.

Los dos modelos teóricos más utilizados para describir la sorción de un único componente son las isotermas de Langmuir y Freundlich. Ambos modelos son válidos solamente bajo unas condiciones y sus resultados no pueden ser extrapolados cuando se varían las condiciones del medio [96]. En la presente tesis se emplean otros modelos para estudiar los procesos de biosorción en columnas de lecho fijo, estos son los modelos de Thomas [97], de Yoon-Nelson [98] y el modelo de tiempo de servicio de profundidad del lecho (Bed Depth Service Timed, BDST) [99, 100].

1.9 Bibliografía

- [1] E. Lindner, B.D. Pendley, A tutorial on the application of ion-selective electrode potentiometry: An analytical method with unique qualities, unexplored opportunities and potential pitfalls, *Anal. Chim. Acta*, (2012), 10.1016/j.aca.2012.11.022
- [2] J. Inczèdy, T. Lengyel, A.M. Ure, *Compendium of analytical nomenclature IUPAC*, Blackwell Science, Oxford, 1998.
- [3] S. Alegret, A. Florido, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, Flow-through tubular iodide and bromide selective electrodes based on epoxy resin heterogeneous membranes, *Talanta*, 36 (1989) 825-829.
- [4] T. Wytténbach, J.J. Batka, J. Gidden, M.T. Bowers, Host/guest conformations of biological systems: valinomycin/alkali ions, *Int. J. Mass Spectrom.*, 193 (1999) 143-152.
- [5] P. Przybylski, A. Huczynski, B. Brzezinski, The structures of monensin A derivatives and its complexes with some monovalent cations studied by the AM1d, PM3 as well as PM5 semiempirical methods, *J. Mol. Struct.*, 826 (2007) 156-164.
- [6] S. Ripoli, S. Scarano, L. Di Bari, P. Salvadori, The solution structure of a lasalocid A metal complex in lipophilic solvents, *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (2005) 5181-5188.
- [7] R.W. Cattrall, *Chemical sensors*, Oxford University Press, Oxford, 1997.
- [8] V. Carcu, M. Negoiu, T. Rosu, S. Serban, Synthesis, characterization of complexes of N-benzoyl-N'-2-nitro-4-methoxyphenyl-thiourea with Cu, Ni, Pt, Pd, Cd and Hg, *J. Therm. Anal.*, 61 (2000) 935-945.
- [9] D. Gambino, E. Kremer, E.J. Baran, Infrared spectra of new Re(III) complexes with thiourea derivatives, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 58 (2002) 3085-3092.
- [10] K.R. Koch, New chemistry with old ligands: N-alkyl- and N,N-dialkyl-N'-acyl(aryl)thioureas in co-ordination, analytical and process chemistry of the platinum group metals, *Coordin. Chem. Rev.*, 216-217 (2001) 473-488.

- [11] E. Otazo, L. Perez, O. Estevez, S. Rojas, J. Alonso, Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes, *J. Chem. Soc. Perkin T. 2*, 292 (2001) 2211-2218.
- [12] J.C. Seiter, M.D. DeGrandpre, Redundant chemical sensors for calibration-impossible applications, *Talanta*, 54 (2001) 99-106.
- [13] A. Lynch, D. Diamond, M. Leader, Point-of-need diagnosis of cystic fibrosis using a potentiometric ion-selective electrode array, *Analyst*, 125 (2000) 2264-2267.
- [14] K.M. Roth, K. Peyvan, K.R. Schwarzkopf, A. Ghindilis, Electrochemical Detection of Short DNA Oligomer Hybridization Using the CombiMatrix ElectraSense Microarray Reader, *Electroanal.*, 18 (2006) 1982-1988.
- [15] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C.D. Natale, A. D'Amico, Nonspecific Sensor Arrays ("Electronic Tongue") For Chemical Analysis Of Liquids, *Pure Appl. Chem.*, 77 (2005) 1965-1983.
- [16] M.S. Cosio, M. Scampicchio, S. Benedetti, Chapter 8 - Electronic Noses and Tongues, *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Academic Press, Boston, 2012, pp. 219-247.
- [17] A.D. Wilson, Review of Electronic-nose Technologies and Algorithms to Detect Hazardous Chemicals in the Environment, *Procedia Technol.*, 1 (2012) 453-463.
- [18] E.A. Baldwin, J. Bai, A. Plotto, S. Dea, Electronic noses and tongues: Applications for the food and pharmaceutical industries, *Sensors*, 11 (2011) 4744-4766.
- [19] A. Bratov, N. Abramova, A. Ipatov, Recent trends in potentiometric sensor arrays--A review, *Anal. Chim. Acta*, 678 (2010) 149-159.
- [20] M. del Valle, Electronic Tongues Employing Electrochemical Sensors, *Electroanal.*, 22 (2010) 1539-1555.
- [21] K. Persaud, G. Dodd, Analysis of discrimination mechanisms in the mammalian olfactory system using a model nose, *Nature*, 299 (1982) 352-355.
- [22] Y. Vlasov, A. Legin, Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from "electronic nose" to "electronic tongue", *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 361 (1998) 255-260.
- [23] M. Otto, J.D.R. Thomas, Model studies on multiple channel analysis of free magnesium, calcium, sodium, and potassium at physiological concentration levels with ion-selective electrodes, *Anal. Chem.*, 57 (1985) 2647-2651.

- [24] K. Toko, A taste sensor, *Meas. Sci. Technol.*, 9 (1998) 1919-1936.
- [25] M. Bos, A. Bos, W.E. van der Linden, Processing of signals from an ion-selective electrode array by a neural network, *Anal. Chim. Acta*, 233 (1990) 31-39.
- [26] Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions, *Sens. Actuator B-Chem.*, 44 (1997) 532-537.
- [27] L.G. Dias, A.M. Peres, T.P. Barcelos, J. Sá Morais, A.A.S.C. Machado, Semi-quantitative and quantitative analysis of soft drinks using an electronic tongue, *Sens. Actuator B-Chem.*, 154 (2011) 111-118.
- [28] H. Men, P. Zhang, C. Zhang, R. Wen, Z. Ge, An electronic tongue system for recognition of mineral water based on principle component analysis and wavelet neural network, *J. Comput.*, 6 (2011) 2692-2699.
- [29] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitkreutz, A comparative study on two electronic tongues for pharmaceutical formulation development, *J. Pharmaceut. Biomed.*, 55 (2011) 272-281.
- [30] A.H. Abdul Aziz, A.Y. Md. Shakaff, R. Farook, A.H. Adom, M.N. Ahmad, N.I. Mahat, Simple implementation of an electronic tongue for taste assessments of food and beverage products, *Sens. Transd. J.*, 132 (2011) 136-150.
- [31] F. Cilurzo, I.E. Cupone, P. Minghetti, S. Buratti, C.G.M. Gennari, L. Montanari, Diclofenac fast-dissolving film: Suppression of bitterness by a taste-sensing system, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, 37 (2011) 252-259.
- [32] X. Cetó, J.M. Gutiérrez, L. Moreno-Barón, S. Alegret, M. Del Valle, Voltammetric electronic tongue in the analysis of cava wines, *Electroanal.*, 23 (2011) 72-78.
- [33] G. Zhao, X. Lin, W. Dou, S. Tian, S. Deng, J. Shi, Use of the smart tongue to monitor mold growth and discriminate between four mold species grown in liquid media, *Anal. Chim. Acta*, 690 (2011) 240-247.
- [34] A.P. Bhondekar, R. Kaur, R. Kumar, R. Vig, P. Kapur, A novel approach using Dynamic Social Impact Theory for optimization of impedance-Tongue (iTongue), *Chemometr. Intell. Lab.*, 109 (2011) 65-76.
- [35] A.P. Bhondekar, R. Vig, A. Gulati, M.L. Singla, P. Kapur, Performance evaluation of a novel iTongue for Indian black tea discrimination, *IEEE Sens. J.*, 11 (2011) 3462-3468.

- [36] S. Capel-Cuevas, M.P. Cuéllar, I. de Orbe-Payá, M.C. Pegalajar, L.F. Capitán-Vallvey, Full-range optical pH sensor array based on neural networks, *Microchem. J.*, 97 (2011) 225-233.
- [37] M. Cole, J.A. Covington, J.W. Gardner, Combined electronic nose and tongue for a flavour sensing system, *Sens. Actuator B-Chem.*, 156 (2011) 832-839.
- [38] P. Alessio, P.H.B. Aoki, J.A. De Saja Saez, M.L. Rodríguez-Méndez, C.J.L. Constantino, Combining SERRS and electrochemistry to characterize sensors based on biomembrane mimetic models formed by phospholipids, *RSC Advances*, 1 (2011) 211-218.
- [39] T.H. Kim, H.S. Song, H.J. Jin, S.H. Lee, S. Namgung, U.K. Kim, T.H. Park, S. Hong, "Bioelectronic super-taster" device based on taste receptor-carbon nanotube hybrid structures, *Lab Chip*, 11 (2011) 2262-2267.
- [40] Q. Ou-Yang, J.W. Zhao, Q.S. Chen, H. Lin, X.Y. Huang, Study on Classification of Soy Sauce by Electronic Tongue Technique Combined with Artificial Neural Network, *J. Food Sci.*, 76 (2011) S523-S527.
- [41] P.K. Kundu, P.C. Panchariya, M. Kundu, Classification and authentication of unknown water samples using machine learning algorithms, *ISA T.*, 50 (2011) 487-495.
- [42] G.A. Evtugyn, R.V. Shamagsumova, E.E. Stoikova, R.R. Sitdikov, I.I. Stoikov, H.C. Budnikov, A.N. Ivanov, I.S. Antipin, Potentiometric sensors based on polyaniline and thiacalixarenes for green tea discrimination, *Electroanal.*, 23 (2011) 1081-1088.
- [43] N. Major, K. Marković, M. Krpan, G. Šarić, M. Hruškar, N. Vahčić, Rapid honey characterization and botanical classification by an electronic tongue, *Talanta*, 85 (2011) 569-574.
- [44] C. Eckert, C. Lutz, J. Breitreutz, K. Woertz, Quality control of oral herbal products by an electronic tongue - Case study on sage lozenges, *Sens. Actuator B-Chem.*, 156 (2011) 204-212.
- [45] L. Bueno, T.R.L.C. Paixão, A copper interdigitated electrode and chemometrical tools used for the discrimination of the adulteration of ethanol fuel with water, *Talanta*, 87 (2011) 210-215.

- [46] D. Wilson, M. del Valle, S. Alegret, C. Valderrama, A. Florido, Potentiometric electronic tongue-flow injection analysis system for the monitoring of heavy metal biosorption processes, *Talanta*, 93 (2012) 285-292.
- [47] Z. Wei, J. Wang, Detection of antibiotic residues in bovine milk by a voltammetric electronic tongue system, *Anal. Chim. Acta*, 694 (2011) 46-56.
- [48] F. Winqvist, J. Olsson, M. Eriksson, Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue, *Anal. Chim. Acta*, 683 (2011) 192-197.
- [49] E. Zubritsky, Product Review: E-noses keep an eye on the future, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 421 A-426 A.
- [50] D. James, S.M. Scott, Z. Ali, W.T. O'Hare, Chemical Sensors for Electronic Nose Systems, *Microchim. Acta*, 149 (2005) 1-17.
- [51] <http://www.insent.co.jp>.
- [52] S. Takagi, K. Toko, K. Wada, T. Ohki, Quantification of suppression of bitterness using an electronic tongue, *J. Pharm. Sci.*, 90 (2001) 2042-2048.
- [53] <http://www.alpha-mos.com>.
- [54] J.D. Kim, H.G. Byun, D.-J. Kim, Y.-K. Ham, W.-S. Jung, C.-O. Yoon, A simple taste analyzing system design for visual and quantitative analysis of different tastes using multi-array chemical sensors and pattern recognition techniques, *Talanta*, 70 (2006) 546-555.
- [55] <http://www.mcscience.com>.
- [56] I. Campos, M. Alcañiz, R. Masot, J. Soto, R. Martínez-Mañez, J.-L. Vivancos, L. Gil, A method of pulse array design for voltammetric electronic tongues, *Sens. Actuator B-Chem.*, 161 (2012) 556-563.
- [57] S. Zhang, C. Zhang, Q. Yang, Data preparation for data mining, *Appl. Artif. Intel.*, 17 (2003) 375-381.
- [58] M. Gay Martín, J.A. de Saja, R. Muñoz, M.L. Rodríguez-Méndez, Multisensor system based on bisphthalocyanine nanowires for the detection of antioxidants, *Electrochim. Acta*, 68 (2012) 88-94.
- [59] A.H. Kiranmyee, P.C. Panchariya, A.L. Sharma, New data reduction algorithm for voltammetric signals of electronic tongue for discrimination of liquids, *Sensor Actua. A-Phys*, 10.1016/j.sna.2012.08.030
- [60] X. Cetó, J.M. Gutiérrez, M. Gutiérrez, F. Céspedes, J. Capdevila, S. Mínguez, C. Jiménez-Jorquera, M. del Valle, Determination of total polyphenol index in wines

- employing a voltammetric electronic tongue, *Anal. Chim. Acta*, 732 (2012) 172-179.
- [61] J. Simons, M. Bos, W.E. van der Linden, Data processing for amperometric signals, *Analyst*, 120 (1995) 1009-1012.
- [62] M. Cortina, A. Duran, S. Alegret, M. del Valle, A sequential injection electronic tongue employing the transient response from potentiometric sensors for anion multidetermination, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1186-1194.
- [63] A. Mimendia, A. Legin, A. Merkoçi, M. del Valle, Use of Sequential Injection Analysis to construct a potentiometric electronic tongue: Application to the multidetermination of heavy metals, *Sens. Actuator B-Chem.*, 146 (2010) 420-426.
- [64] M. Baret, D.L. Massart, P. Fabry, C. Menardo, F. Conesa, Halide ion-selective electrode array calibration, *Talanta*, 50 (1999) 541-558.
- [65] F. Despagne, D. Luc Massart, Neural networks in multivariate calibration, *Analyst*, 123 (1998) 157R-178R.
- [66] C. Hametner, M. Stadlbauer, M. Deregnaucourt, S. Jakubek, T. Winsel, Optimal experiment design based on local model networks and multilayer perceptron networks, *Eng. Appl. Artif. Intel.*, 26 (2013) 251-261.
- [67] N.L.W. Keijsers, Neural Networks, in: K. Editors-in-Chief: Katie, M. Leo Verhagen (Eds.) *Encyclopedia of Movement Disorders*, Academic Press, Oxford, 2010, pp. 257-259.
- [68] L.T. Dimitrakopoulos, T. Dimitrakopoulos, Evaluation of a Four Sensor Array Used in a Wall-Jet Configured Flow Cell for Flow Injection Potentiometry, *Electroanal.*, 13 (2001) 161-163.
- [69] N. Abramova, A. Ipatov, S. Levichev, A. Bratov, Integrated multi-sensor chip with photocured polymer membranes containing copolymerised plasticizer for direct pH, potassium, sodium and chloride ions determination in blood serum, *Talanta*, 79 (2009) 984-989.
- [70] A. Ipatov, N. Abramova, A. Bratov, C. Domínguez, Integrated multisensor chip with sequential injection technique as a base for “electronic tongue” devices, *Sens. Actuator B-Chem.*, 131 (2008) 48-52.
- [71] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, 78 (1975) 145-157.

- [72] A. Gutés, F. Céspedes, M. del Valle, Electronic tongues in flow analysis, *Anal. Chim. Acta*, 600 (2007) 90-96.
- [73] M. Gutiérrez, S. Alegret, R. Cáceres, J. Casadesús, O. Marfà, M. del Valle, Nutrient Solution Monitoring in Greenhouse Cultivation Employing a Potentiometric Electronic Tongue, *J. Agr. Food Chem.*, 56 (2008) 1810-1817.
- [74] F. Winqvist, R. Bjorklund, C. Krantz-Rülcker, I. Lundström, K. Östergren, T. Skoglund, An electronic tongue in the dairy industry, *Sens. Actuator B-Chem.*, 111-112 (2005) 299-304.
- [75] F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström, Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry, *Meas. Sci. Technol.*, 9 (1998) 1937-1946.
- [76] P. Ciosek, I. Grabowska, Z. Brzózka, W. Wróblewski, Analysis of dialysate fluids with the use of a potentiometric electronic tongue, *Microchim. Acta*, 163 (2008) 139-145.
- [77] C.J. Lomborg, L. Wiebe, K.H. Esbensen, At-line determination of octanoic acid in cultivation broth-An electronic tongue (ET) feasibility study, *J. Biotechnol.*, 133 (2008) 162-169.
- [78] S. Buratti, D. Ballabio, G. Giovanelli, C.M.Z. Dominguez, A. Moles, S. Benedetti, N. Sinelli, Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue, *Anal. Chim. Acta*, 697 (2011) 67-74.
- [79] A. Kutyla-Olesiuk, M. Zaborowski, P. Prokaryn, P. Ciosek, Monitoring of beer fermentation based on hybrid electronic tongue, *Bioelectrochem.*, 87 (2012) 104-113.
- [80] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, A flow-injection electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of nitrate in the presence of chloride, *Sens. Actuator B-Chem.*, 101 (2004) 72-80.
- [81] E.I. Santos, M.C. Montenegro, C. Couto, A.N. Araújo, M.F. Pimentel, V.L. da Silva, Sequential injection analysis of chloride and nitrate in waters with improved accuracy using potentiometric detection, *Talanta*, 63 (2004) 721-727.
- [82] T.F. Christiansen, J.E. Busch, S.C. Krogh, Successive determinations of calcium and magnesium in drinking water by complexometric, potentiometric digital titration to two equivalence points, *Anal. Chem.*, 48 (1976) 1051-1056.

- [83] M. Shamsipur, B. Hemmateenejad, M. Akhond, Multicomponent acid–base titration by principal component-artificial neural network calibration, *Anal. Chim. Acta*, 461 (2002) 147-153.
- [84] T. Moisis, M. Heikonen, A simple method for the titration of multicomponent acid-base mixtures, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 354 (1996) 271-277.
- [85] Y. Ni, Simultaneous determination of mixtures of acids by potentiometric titration, *Anal. Chim. Acta*, 367 (1998) 145-152.
- [86] Y. Ni, P. Zhaohong, Determination of mixed metal ions by complexometric titration and nonlinear partial least squares calibration, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 217-222.
- [87] C.G. Zampronio, J.J.R. Rohwedder, R.J. Poppi, Artificial neural networks applied to potentiometric acid–base flow injection titrations, *Chemometr. Intell. Lab.*, 62 (2002) 17-24.
- [88] D. Calvo, J. Bartrolí, M. del Valle, Multicomponent Titration of Calcium + Magnesium Mixtures Employing a Potentiometric Electronic-Tongue, *Anal. Lett.*, 40 (2007) 1579-1595.
- [89] D. Calvo, M. del Valle, Simultaneous titration of ternary alkaline–earth mixtures employing a potentiometric electronic tongue, *Microchem. J.*, 87 (2007) 27-34.
- [90] P. Ciosek, M. Jańczyk, W. Wróblewski, Classification of amino acids and oligopeptides with the use of multi-mode chemical images obtained with ion selective electrode array, *Anal. Chim. Acta*, 699 (2011) 26-32.
- [91] B. Volesky, Sorption and biosorption, in, 1° ed. Canada: National Library of Canada, Cataloguing-in-Publication, 2003.
- [92] D. Bulgariu, L. Bulgariu, Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass, *Bioresour. Technol.*, 103 (2012) 489-493.
- [93] A. Witek-Krowiak, Analysis of temperature-dependent biosorption of Cu^{2+} ions on sunflower hulls: Kinetics, equilibrium and mechanism of the process, *Chem. Eng. J.*, 192 (2012) 13-20.
- [94] J. Bayo, Kinetic studies for Cd(II) biosorption from treated urban effluents by native grapefruit biomass (*Citrus paradisi* L.): The competitive effect of Pb(II), Cu(II) and Ni(II), *Chem. Eng. J.*, 191 (2012) 278-287.

- [95] D.H.K. Reddy, K. Sessaiah, A.V.R. Reddy, S.M. Lee, Optimization of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) biosorption by chemically modified *Moringa oleifera* leaves powder, *Carbohydr. Polym.*, 88 (2012) 1077-1086.
- [96] T.A. Davis, B. Volesky, A. Mucci, A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae, *Water Res.*, 37 (2003) 4311-4330.
- [97] C.Y. Yin, M.K. Aroua, W.M.A.W. Daud, Fixed-bed adsorption of metal ions from aqueous solution on polyethyleneimine-impregnated palm shell activated carbon, *Chem. Eng. J.*, 148 (2009) 8-14.
- [98] Y.H. Yoon, J.H. Nelson, Application of gas adsorption kinetics. I. A theoretical model for respirator cartridge service life, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 45 (1984) 509–516.
- [99] R.A. Hutchins, New method simplifies design of activated-carbon system, *Am. J. Chem. Eng.*, 80 (1973) 133–138.
- [100] S. Kundu, A.K. Gupta, As(III) removal from aqueous medium in fixed beds using iron oxide-coated cement: experimental and modeling studies, *Chem. Eng. J.*, 129 (2007) 123–131.

2 OBJETIVOS

El objetivo general de la presente tesis es la construcción y evaluación de diferentes lenguas electrónicas potenciométricas, así como su aplicación en el análisis cuantitativo simultáneo de trazas de metales de transición en diferentes áreas de interés. Principalmente en el campo medioambiental y la monitorización de procesos.

Para poder cumplimentar este objetivo se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

Objetivos relacionados con el desarrollo de nuevos electrodos selectivos a iones.

1. Sintetizar y caracterizar nuevos derivados de bis-tioureas (benzoil y furoil bis-tioureas) para su utilización como elementos de reconocimiento en electrodos

selectivos de iones con respuesta a metales de transición como: Pb(II), Cd(II), Cu(II) y Zn(II).

2. Optimizar la composición de las membranas selectivas con las mejores condiciones de respuesta.
3. Construir electrodos selectivos de iones de membrana polimérica de PVC y de configuración *all solid state* utilizando las membranas optimizadas previamente y evaluar las características de respuesta potenciométrica de los sensores propuestos en base a parámetros analíticos como el límite de detección, el coeficiente de selectividad potenciométrico, el tiempo de respuesta, el rango de pH óptimo de trabajo, tiempo de respuesta, entre otros.
4. Seleccionar las mejores condiciones experimentales para aplicar los ISEs propuestos a la determinación de trazas de metales pesados en muestras reales.
5. Validar los resultados obtenidos de la aplicación analítica frente a un método de referencia recomendado para la determinación de metales pesados en las muestras seleccionadas.

Objetivos relacionados con las aplicaciones desarrolladas con lenguas electrónicas para medidas en batch:

6. Construir una matriz de sensores formada por los electrodos selectivos de iones desarrollados previamente y por otros de membranas comerciales, para diferentes aplicaciones analíticas basadas en lenguas electrónicas.
7. Realizar una caracterización cruzada todos los ISEs que componen la matriz de sensores para determinar las principales características de respuesta, entre las que hay que destacar, la selectividad, el límite de detección y el rango de concentración de respuesta lineal.

8. Seleccionar los ISEs adecuados para desarrollar una lengua electrónica potenciométrica capaz de determinar trazas de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras ambientales.
9. Seleccionar las condiciones experimentales y de procesamiento adecuadas para obtener un modelo óptimo de respuesta mediante *Redes Neuronales Artificiales*, que permita abordar la aplicación analítica propuesta.
10. Evaluar la habilidad predictiva del modelo desarrollado.
11. Aplicar la lengua electrónica optimizada a la determinación simultánea de trazas de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras reales, y contrastar los resultados obtenidos con el sistema analítico propuesto frente a un método de referencia.

Objetivos relacionados con la aplicación del método de valoración complexométrica con detección del punto final con una ET.

12. Seleccionar los ISEs adecuados para desarrollar una lengua electrónica potenciométrica capaz de resolver mezclas de tres componentes (Cu(II), Cd(II) y Pb(II)), mediante una valoración potenciométrica.
13. Seleccionar las condiciones experimentales para obtener un método de valoración rápido, con un número fijo y limitado de adición de agente valorante, que permita mantener unos tiempos de análisis razonables, durante la construcción del modelo de respuesta de *las Redes Neuronales Artificiales*.
14. Evaluar la capacidad de predicción del modelo optimizado.
15. Aplicar la técnica desarrollada, de valoración complexométrica que utiliza como método de detección una ET para resolver mezclas de (Cu(II), Cd(II) y Pb(II)) en muestras reales y contrastar los resultados obtenidos frente a un método de referencia.

Objetivos relacionados con las aplicaciones desarrolladas con lenguas electrónicas para monitorización de procesos:

16. Construir una matriz de sensores de configuración tubular, con los electrodos empleados en las aplicaciones anteriores y otros desarrollados en el laboratorio, para monitorizar procesos de biosorción de metales pesados.
17. Realizar una caracterización cruzada de todos los ISEs que componen la matriz de sensores para determinar las principales características de respuesta.
18. Optimizar el sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), en base a la respuesta de la matriz de sensores, teniendo en cuenta las siguientes características del equipo: velocidad de flujo, volumen de inyección de muestra y la composición de la disolución portadora.
19. Construir una lengua electrónica con los ISEs adecuados para monitorizar el proceso de biosorción de cobre en el raspo de uva, residuo procedente de la industria vinícola, así como determinar el perfil de salida del calcio del biosorbente utilizado.
20. Seleccionar las condiciones experimentales y de procesamiento para obtener un modelo óptimo de respuesta mediante *Redes Neuronales Artificiales*, que permita llevar a cabo la monitorización requerida.
21. Evaluar la habilidad predictiva del modelo optimizado.
22. Aplicar la estrategia analítica propuesta, compuesta por un sistema de FIA y una ET potenciométrica como detector, a la monitorización del proceso de biosorción de cobre y el perfil de salida del calcio del raspo de uva.
23. Validar los resultados obtenidos con el sistema propuesto frente a los métodos de referencia correspondientes a los metales estudiados.

24. Determinar las principales características del proceso biosorción así como el mecanismo responsable del mismo, mediante los datos generados con el sistema propuesto.

Objetivos relacionados con la aplicación del sistema FIA-ET para la monitorización de los procesos de biosorción de mezclas multimetálicas en raspo de uva:

25. Seleccionar los ISEs adecuados para desarrollar lenguas electrónicas para llevar a cabo la monitorización de diferentes procesos de biosorción de mezclas de metales de transición en raspo de uva, con el sistema automatizado empleado anteriormente.

26. Seleccionar las condiciones experimentales y de procesamiento para obtener los modelos óptimos de respuesta mediante *Redes Neuronales Artificiales*, que permitan llevar a cabo las monitorizaciones requeridas.

27. Evaluar la habilidad predictiva de los modelos optimizados.

28. Aplicar el sistema optimizado a la monitorización de procesos de biosorción de diferentes mezclas de metales pesados, empleando como biosorbente el raspo de uva.

29. Validar los resultados obtenidos con el sistema propuesto frente a los métodos de referencia correspondientes a los metales estudiados.

30. Determinar las principales características del proceso de biosorción, así como el orden de afinidad del biosorbente hacia los diferentes metales estudiados.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos

Los reactivos empleados en la síntesis de los ionóforos propuestos (*1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno (BTB)* y *1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno (FTB)*) fueron los siguientes: tiocianato de amonio (Sigma–Aldrich), meta-fenilendiamina (Aldrich), cloruro de furoilo (Fluka), cloruro de benzoilo (Sigma–Aldrich). Disolventes: acetona (Panreac), tetrahidrofurano (Fluka), metanol (Panreac), benceno y cloroformo (J.T. Baker).

Ionóforos comerciales: bis[4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenil]-fosfato de calcio, ionóforo de calcio I (ETH 1001), pirofosfato de tetrabencilo, S,S'-metilenobis(N,N-diisobutilditiocarbamato), tert-butilcalix[4]areno-tetrakis (N,N-dimetiltioacetamida), disulfuro de tetrabutiltiuram, ácido 3,7,12,17-tetrametil-8,13-divinil-2,18-porfina-

dipropiónico (sal disódica), N,N',N'-tetrabutil-3,6-dioxaoctano di(tioamida), o-xilileno-bis(N,N-diisobutilditiocarbamato), pirofosfato de tetrabencilo, [2,2']-furildioxima monohidrato, bromuro de tetradodecilamonio (T12A) y óxido de trioctil fosfina, todos de la casa comercial Fluka; ftalocianina de galio (Ga-Pc), ftalocianina de zinc (Zn-Pc) y ftalocianina de cobalto (Co-Pc) de Sigma-Aldrich; dodecilbencenosulfonato de sodio (SDBS) de Carlo Erba.

Plastificantes: dioctil sebacato (DOS), o-nitrofeniloctil éter (o-NPOE), dibutilbutilfosfonato (DBBP), (10-hidroxidecil) butirato (ETH 264), bis(1-butyl-pentil) adipato (BBPA), dioctil ftalato (DOP) y dibutilftalato (DBP), todos de Fluka. [N'-acetil-2-(benzotiazol-2il)-3-(3-cloro-5-metil-4H-pirazol-4-il)acrilohidracida] (ABPAH) y poliacrilamida (PAA) de la casa comercial Sigma-Aldrich.

Aditivos: tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio, tetrafenilborato de sodio, ácido oleico (OA) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTMAB), todos comprados en Fluka.

Matriz polimérica: cloruro de polivinilo (PVC) de alto peso molecular (Fluka).

Otros reactivos empleados en los trabajos experimentales se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 3.1. Reactivos empleados en los experimentos y sus proveedores.

Reactivo	Casa comercial	Reactivo	Casa comercial
Zn(NO ₃) ₂	Fluka	HCl	Panreac
Cu(NO ₃) ₂	Fluka	HNO ₃	Panreac
Cd(NO ₃) ₂	Fluka	CH ₃ -CH ₂ OH	Panreac
Pb(NO ₃) ₂	Fluka	NaOH	Merck
NaNO ₃	Sigma-Aldrich	NH ₄ OH	Merck
CuS	Sigma-Aldrich	EDTA	Panreac
AgS ₂	Sigma-Aldrich	Imidazol	Fluka
Na ₂ S	Merck	NaClO ₄	Merck

Contacto eléctrico: se utilizaron dos formulaciones: una compuesta por Araldit M, Araldit M endurecedor 964, Araldit M acelerador, (todos de Fluka), y grafito con tamaño de partícula menor que 50 μm (BDH, UK), la otra con resina Araldit M y endurecedor HR (ambos componentes de Uneco) y el mismo grafito empleado en la formulación anterior.

Todos los reactivos empleados tenían grado analítico o superior. Para preparar las disoluciones se utilizó agua bidestilada o Milli-Q (Millipore; Molsheim, Francia).

Preparación del biosorbente: La preparación del raspo de uva comienza con el desbrozado manual, el tronco de la planta se corta en trozos pequeños para facilitar el molido; posteriormente se lava varias veces, se deja reposar en un recipiente con agua durante 24 horas y se realiza un último lavado con ultrasonidos durante 5 minutos. El material se seca en estufa durante 24 horas a 100 °C; el raspo seco se muele y tamiza, las partículas de interés deben tener un grosor de 0.8 a 1.0 mm. Se pesa con exactitud 1.3 g del material tratado anteriormente y se lava con agua destilada hasta eliminar el polvo generado en el proceso de molido, finalmente se rellena la columna de absorción y el material está listo para el proceso de biosorción.

3.2 Síntesis y caracterización de los derivados de bis-tioureas propuestos

3.2.1 Síntesis de los ionóforos propuestos (derivados de las bis-tioureas)

La síntesis de los dos ionóforos propuestos: 1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno y 1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno se desarrolló siguiendo el esquema de síntesis que se muestra en la Figura 3.1.

A una disolución de tiocianato de amonio en acetona se le añade gota a gota una mezcla del reactivo de partida (cloruro de benzoilo para obtener la bistiurea BTB o de cloruro de furoilo para obtener la bistiurea FTB) también en acetona. La reacción se lleva a cabo en reflujo con agitación durante 1 hora; después de concluida la reacción se deja

enfriar a temperatura ambiente. Al producto obtenido se le añade una disolución de la diamina (1,3-diaminobenceno) en acetona, teniendo en cuenta que la reacción se desarrolla en relación molar 2:1. Después de terminar la reacción, se le añaden 600 mL de agua helada con agitación vigorosa, la bis-tiourea obtenida se filtra al vacío y se lava por triplicado con 50 mL de agua bidestilada, posteriormente se recrystaliza empleando como disolvente una mezcla metanol:cloroformo (1:1). La pureza del producto se determina empleando TLC con una mezcla benceno:cloroformo (90:10) como disolvente.

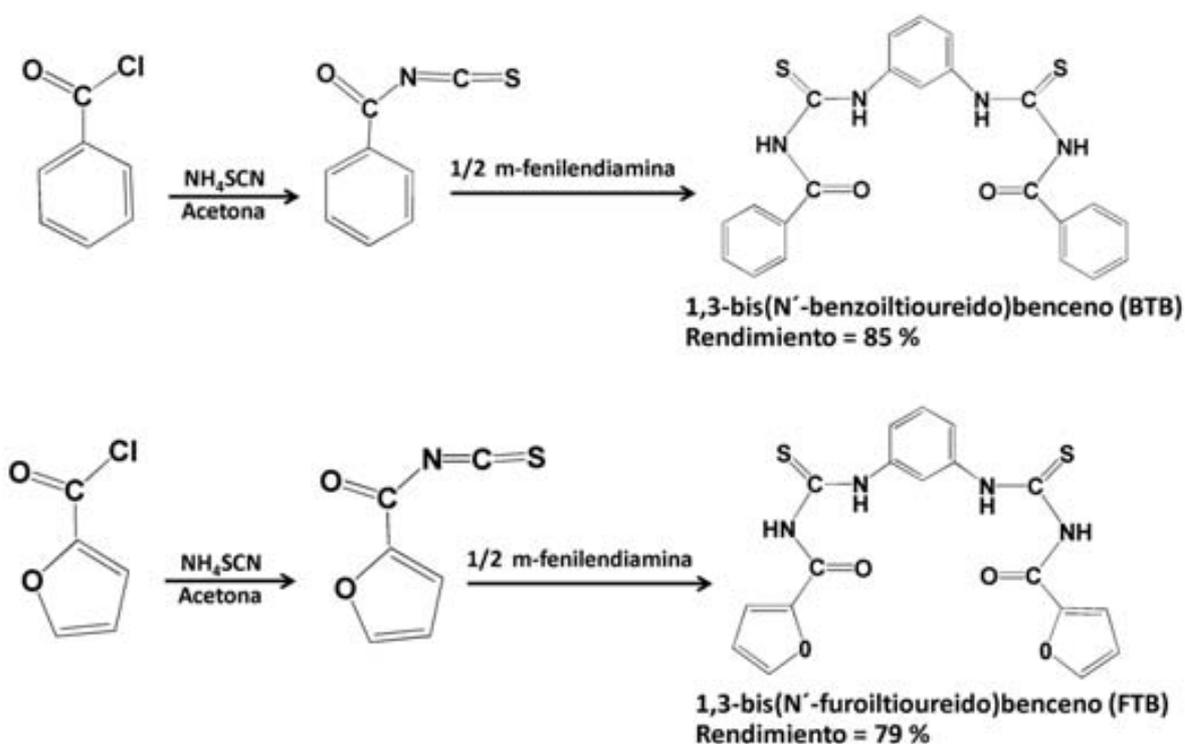


Figura 3.1. Esquema de síntesis de las bis-tioureas propuestas.

3.2.2 Caracterización de las bistioureas obtenidas

Las estructuras de las bistioureas obtenidas se dilucidaron mediante técnicas espectroscópicas (IR, ^1H NMR), espectrometría de masa y análisis elemental cualitativo. Los estudios de derivados de tiourea mediante espectroscopia IR por lo general implican la identificación de un conjunto de bandas que involucran a los enlaces N-C y C=S; que se pueden utilizar como indicadores de la estructura electrónica alrededor de estos enlaces. En los compuestos que contienen el grupo tioamida (HNCS)

se obtienen un conjunto de vibraciones fundamentales conocidas como bandas "tioamida": I, II, III y IV [1, 2]. Estas bandas tienen una gran contribución de las vibraciones: $\nu(\text{C-N})+\delta(\text{NH})$ (I), $\nu(\text{C-N})+\nu(\text{C=S})$ (II y III) y $\nu(\text{C=S})$ (IV) y generalmente se reportan alrededor de 1470, 1250, 1080 y 750cm^{-1} , respectivamente [2].

3.3 Construcción de los electrodos

Los ISEs empleados en la investigación corresponden al tipo *all-solid-state* o de configuración no simétrica [3, 4]. Este tipo de electrodos se basa en un contacto óhmico directo entre el transductor y la membrana polimérica, en lugar de emplear la configuración convencional en la que el contacto se realiza mediante una disolución de electrolito interno (configuración simétrica). En los experimentos realizados se emplearon dos tipos de membranas: de portador móvil y de membranas cristalinas heterogéneas, además de dos configuraciones en función de la aplicación realizada: configuración convencional para mediciones en batch y tubular para flujo.

3.3.1 Electrodos de membrana polimérica y de configuración convencional

Las membranas poliméricas de portador móvil se obtienen mediante la deposición de un cóctel sensor que se prepara disolviendo el ionóforo, el plastificante, la matriz polimérica y en ciertos casos un aditivo iónico en tetrahidrofurano. Este disolvente orgánico permite disolver todos los componentes de la membrana y conseguir una deposición sencilla gracias a su gran volatilidad. Una vez homogeneizado el cóctel mediante un agitador orbital IKA-VIBRAX-VXR, se procede a la deposición, gota a gota sobre el contacto óhmico del cuerpo del electrodo. Los pasos del proceso de construcción de los ISE en configuración convencional se encuentran esquematizados en la Figura 3.2.

Para la construcción de los ISEs se utiliza un tubo de PVC de 8 mm de diámetro externo y 6 mm de diámetro interno, cortado a 2 cm de largo (A). El siguiente paso es encajar un conector eléctrico en el que hemos soldado una pequeña placa de cobre, en el tubo

cortado de PVC (B). Este conector facilitará el contacto eléctrico entre el electrodo y el sistema de medida. El transductor empleado es una pasta conductora epoxy-grafito, formada por 1 parte de grafito y 1 parte de la mezcla epoxy de tres componentes (Araldit M, Araldit M endurecedor 964 y Araldit M acelerador en proporción en volumen 10:10:0.5). Hemos de llenar el vacío entre la placa de cobre y el tubo de PVC con la pasta conductora y dejarlo unas 24 h a 40 °C en la estufa para que cure la resina (C). Posteriormente, se rebaja una cavidad de 0.3 mm en la pasta conductora (D); sobre esta superficie conductora es donde se deposita la membrana polimérica (E). La deposición de la membrana se debe realizar de manera homogénea sobre la superficie de resina epoxy-grafito del cuerpo del electrodo. Se añaden 3 gotas del cóctel y se deja que se evapore el tetrahidrofurano durante 30 minutos. A continuación se vuelve a depositar la misma cantidad y se deja evaporar el disolvente de nuevo. Esta operación se repite 6 veces más hasta conseguir un grosor óptimo de la membrana.

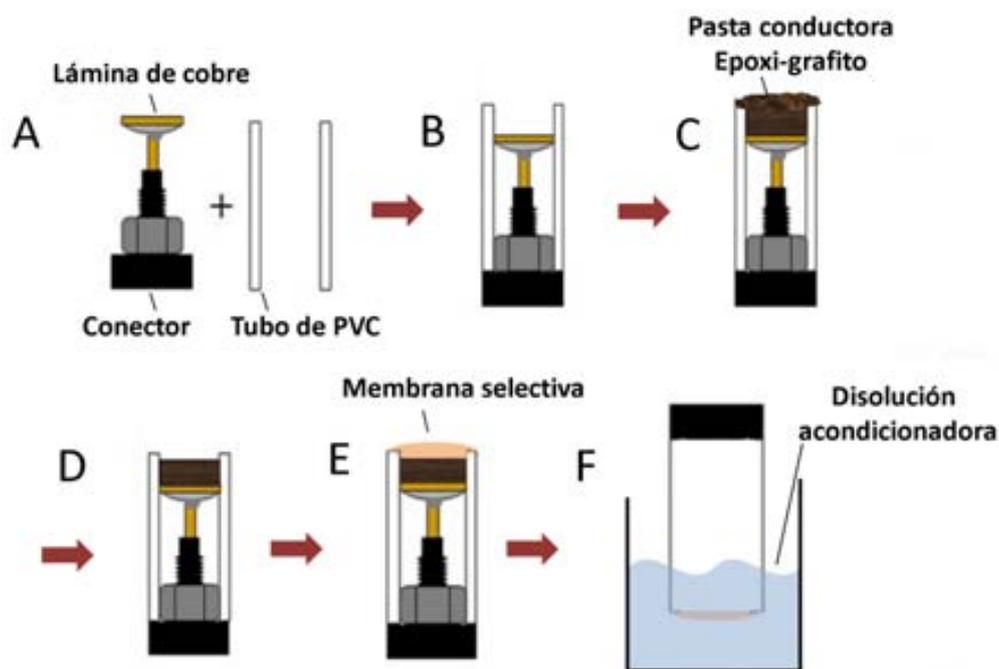


Figura 3.2. Esquema de construcción de un ISE convencional o de *batch*.

Terminado el proceso de deposición se deja un día más con el fin de que los restos de disolvente orgánico se evaporen. El último paso antes de proceder a la utilización del ISE es el acondicionamiento (F). Hay que dejar la membrana del ISE en contacto con el analito al que presumiblemente es selectiva durante 24 horas más. Las

soluciones de acondicionamiento utilizadas para este tipo de electrodos fueron de concentración 0.01 M.

Una de las líneas desarrolladas en la tesis y que empleó este tipo de ISEs estuvo enfocada al desarrollo de nuevos electrodos selectivos empleando derivados de bis-tioureas como elementos de reconocimiento y su posterior aplicación en la determinación de metales de transición. La tabla 3.2 muestra la composición de las membranas empleadas durante el proceso de optimización.

Tabla 3.2. Composición de las membranas empleadas durante la optimización de los ISEs basados en las bis-tioureas propuestas [5].

No	Ionóforo (%)		Plastificante (%)		KpCIPB (%)	PVC (%)	Pendiente (mV/dec)	Rango lineal (M)
	BTB	FTB	DOS	<i>o</i> -NPOE				
1	2.0	-	65.0	-	0.0	33.0	20.2± 3,2	2.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻²
2	2.0	-	64.7	-	0.3	33.0	24.2± 3,2	4.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²
3	5.0	-	61.5	-	0.5	33.0	31.5 ± 1,6	4.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²
4	8.0	-	58.0	-	2.0	33.0	30.6± 2,3	1.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²
5	2.0	-	-	65.0	0.0	33.0	16.2± 3,2	8.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻²
6	2.0	-	-	64.7	0.3	33.0	19.9± 2,2	2.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻²
7	5.0	-	-	61.5	0.5	33.0	22.3± 1,5	6.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻³
8	8.0	-	-	58.0	2.0	33.0	24.5± 3,0	9.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻³
9	-	2.0	65.0	-	0.0	33.0	14,5± 3,1	1.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻²
10	-	2.0	64.7	-	0.3	33.0	30.0 ± 1,3	5.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²
11	-	5.0	61.5	-	0.5	33.0	26.3± 1,4	9.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²
12	-	8.0	58.0	-	2.0	33.0	24.5± 2,5	3.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²
13	-	2.0	-	65	0.0	33.0	15.9±3,1	8.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻³
14	-	2.0	-	64.7	0.3	33.0	19.9±3,1	8.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻³
15	-	5.0	-	61.5	0.5	33.0	21.4± 2,3	9.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻³
16	-	8.0	-	58.0	2.0	33.0	20.5± 3,3	8.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻³

3.3.2 Electrodo de configuración tubular

De configuración tubular y de membrana polimérica con portador móvil

Los pasos del proceso de construcción de los ISEs en disposición tubular se encuentra esquematizado en la Figura 3.3. El procedimiento de construcción es bastante similar al

de los anteriores sensores, pero éstos deben permitir el paso de un flujo de muestra a través del electrodo, por este hecho se utilizó un tubo de metacrilato con un pequeño agujero lateral de 2.5 mm de diámetro para encajar el conector eléctrico (A). El siguiente paso es encajar el conector eléctrico (B) para facilitar el contacto eléctrico entre el electrodo y el sistema de medida. El espacio dentro del tubo de metacrilato se llena de una pasta conductora que se prepara con 1 parte de grafito y 1 parte de la mezcla epoxi de dos componentes (Araldit M y Endurecedor HR, en proporción en peso 1:0.4) y se deja curar en las mismas condiciones que en el apartado anterior (C). Una vez curada, se elimina el exceso de pasta en ambas caras del electrodo y se recubren con una pequeña capa de resina epoxi para que haga de aislante eléctrico, se deja curar (en las mismas condiciones que la pasta conductora). Finalmente, se hace un agujero en el centro del electrodo de 1.5 mm de diámetro (D) con el torno perfectamente centrado. En estos momentos la pieza está lista para poder hacer la deposición de la membrana polimérica dentro del agujero del realizado (E).

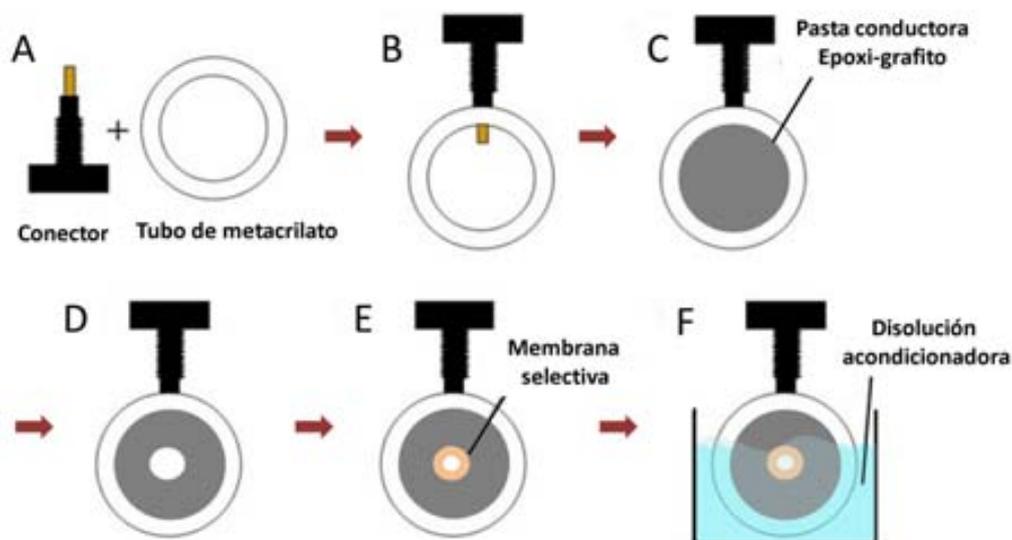


Figura 3.3. Esquema de construcción de un ISE en disposición tubular de membrana polimérica.

Para la formación de la membrana, una gota de cóctel se introduce dentro del agujero practicado en el cuerpo del electrodo y se empuja con una corriente de aire hasta que sale por el otro orificio, este proceso se repite un par de veces y se deja que se evapore el tetrahidrofurano durante 30 minutos. Esta operación se repite 4 veces más hasta

conseguir un grosor de membrana óptimo. Terminado el proceso de deposición se deja un día más con el fin de que los restos de disolvente orgánico se evaporen. El último paso es el acondicionamiento (F), hay que dejar durante 24 horas la membrana del ISE en contacto con el ion por el que es selectiva. Las soluciones de acondicionamiento utilizadas para este tipo de electrodos fueron de concentración 0.01 M del ion principal.

De configuración tubular y de membrana cristalina heterogénea

La membrana cristalina se prepara a partir de una mezcla de resina epoxy (0.2 g) y sulfuro de cobre y plata (0.325 g), obtenido a partir de la respectiva síntesis inorgánica. El esquema de construcción es semejante al mostrado en el apartado anterior, a la pieza obtenida en el paso D se le abre un orificio en esta ocasión de 1.75 mm de diámetro, se rellena con la membrana cristalina preparada previamente, se deja secar todo durante 1 día a 80°C y se le abre un orificio de 0.75 mm. La Tabla 3.3 muestra la composición de todas las membranas empleadas durante las diferentes aplicaciones de estos estudios.

Tabla 3.3. Composición de las membranas empleadas en las aplicaciones con ET.

No	Sensor	PVC (%)	Plastificante (%)	Ionóforo (%)	Referencia
1	Ca ²⁺ (1)	33.3	NPOE (65.2)	Ionóforo-Calcio I ETH 1001 (1.0) ^b	[6]
2	Ca ²⁺ (2)	29.8	DOPP (63.2)	bis[4-(1,1,3,3-tetrametil-butil)-fenil]-fosfato (7.0)	[7]
3	Pb ²⁺ (1)	37.2	NPOE (49.6)	S,S' Metilenobis(N,N-diisobutilditiocarbamato) (11.2)	[8]
4	Pb ²⁺ (2)*	33.0	DOS (61.5)	1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno (5.0) ^a	[5]
5	Pb ²⁺ (3)*	33.0	DOS (64.7)	1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno (2.0) ^a	[5]
6	Pb ²⁺ (4)	33.0	NPOE (65.6)	Tert-butilcalix[4]areno-tetrakis(N,N-dimetiltioacetamida) (1) ^a	[9]
7	Zn ²⁺ (1)	40.2	NPOE (53.6)	Tetrabutiltiuram disulfuro (5.3) ^a	[10]
8	Zn ²⁺ (2)	55.3	DBBP (41.4)	Ácido 3,7,12,17-tetrametil-8,13-divinil-2,18-porfirino-dipropiónico (sal disódica) (2.8) ^b	[11]
9	Cd ²⁺	34.0	ETH 264 (65.0)	N,N',N'-Tetrabutyl-3,6-dioxaoctano di(tioamida) (1.0) ^a	[12]
10	Genérico(1)	34.5	BBPA (63.2)	Tetrabencil pirofosfato (2.3) ^a	[13]
11	Genérico(2)	32.0	DBP (62.0)	[2,2']-Furildioxima monohidrato (4.0) ^a	[14]
12	Genérico(3)	37.7	NPOE (54.9)	Óxido de Trioctil fosfina (5.2) ^a	-
13	Cu ²⁺ (1)	57.2	NPOE (34.3)	O-Xilileno bis(N,N-isobutilditiocarbamato) (6.9) ^a	[15]
14	Cu ²⁺ (2)			CuS(30.9 %), Ag ₂ S(30.9 %), Araldit M(27.2 %)y endurecedor HR(10.9 %)	[16]

La formulación incluye: ^a tetrakis(4-clorofenil)borato de sodio, ^b tetrafenilborato de sodio

* Ionóforo no disponible comercialmente.

3.4 Instrumentación

3.4.1 Mediciones potenciométricas en batch

El electrodo de referencia utilizado durante la tesis es un electrodo de doble unión Ag/AgCl (modelo 900 200 Thermoelectron, MA, USA), con una solución de KCl saturada con AgCl como referencia interna, suministrada por la misma casa Thermoelectron. La disolución de referencia externa utilizada está formada por un electrolito inerte de concentración aproximadamente 0.01 M.

Durante las experiencias se empleó un pHmetro GLP 22 (Crison, España) con un electrodo combinado de pH, modelo 52-03 de Crison. Las calibraciones del equipo se realizan con disoluciones tampón de pH 7.00 y pH 4.00 suministradas por la misma casa comercial.



Figura 3.4. Fotografía del sistema de medición potenciométrica.

Para las medidas potenciométricas realizadas durante la caracterización de los ISEs propuestos y las aplicaciones con ET en batch, se empleó un sistema multicanal construido por el Grupo de Sensores y Biosensores (GSB). Con esta instrumentación se pueden obtener lecturas de hasta 32 electrodos, los valores de potencial medidos son recibidos por la tarjeta de adquisición de datos de un ordenador 4/33 (Intel Inside, CA, USA). Éste se encarga de tratar los datos capturados para facilitar su interpretación,

mediante un programa diseñado en QuickBasic (Microsoft, WA, USA). Este software genera un archivo de texto con las lecturas de todos los sensores. En la Figura 3.4 se muestra una fotografía del sistema en cuestión.

3.4.2 Mediciones potenciométricas en flujo

El sistema FIA automatizado construido en el Departament d'Enginyeria Química, UPC, se esquematiza en la Figura 3.5 (A); este incluye una bomba peristáltica de 8 canales Gilson Minipuls-3 (Villiers-le-Bel, Francia) (1), válvulas de solenoide de 2 vías NResearch (West Caldwell, NJ, EE.UU.) (2), un desburbujador (modelo 006BT) (3), un conector de 8 vías (4) y tubos de Teflon® (0.8 mm DI) adquiridos a Omnifit (Cambridge, UK). El hardware de instrumentación virtual está formado por un PC (5), una tarjeta de adquisición de datos, un circuito de acondicionamiento de señal y el software LabVIEW como instrumentación virtual [17]. Para las mediciones de potencial se empleó un sistema multicanal (6) también desarrollado en el laboratorio, que permite la adquisición simultánea del potencial proveniente de hasta dieciséis electrodos. La interface entre el sistema de medición y el ordenador emplea una tarjeta de adquisición de datos PCI-6221 (National Instruments) con 16 entradas analógicas, a una velocidad de 250 ksamples s⁻¹ y una resolución de 16-bit.

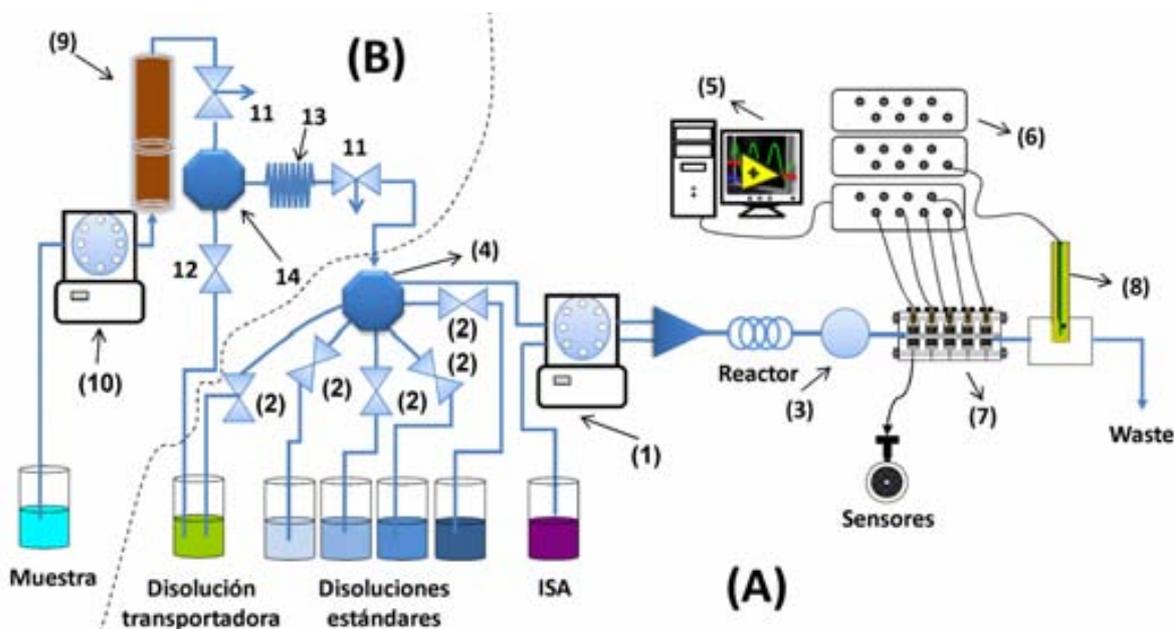


Figura 3.5. Esquema del equipo de FIA.

Todo el sistema de monitorización es controlado por un programa implementado en LabVIEW 7.1 TM. El programa desarrollado, junto con esta tarjeta, permite adquirir, procesar y almacenar los valores de potencial, además de controlar las válvulas solenoides y la velocidad de las bombas peristálticas. Los otros componentes son el sistema de detección (matriz de sensores) (7) y el electrodo de referencia (8)). La matriz de sensores puede incorporar un máximo de 16 ISEs de disposición tubular, y colocados en paralelo mediante un esquema de celda tipo sándwich.

3.4.3 Experimentos de monitorización de procesos biosorción mediante el sistema FIP-ET

El sistema de potenciometría por inyección en flujo (Flow Injection Potentiometry, FIP) mostrado en el epígrafe anterior se empleó en el seguimiento de procesos, específicamente en la monitorización de la biosorción de metales tanto en sistemas monometálicos como de mezclas multimetálicas, utilizando el raspo de uva procedente de los residuos vegetales de las empresas vinícolas como biosorbente [18]. En el sistema de medición de la Figura 3.5 (parte A) se le implementaron diferentes componentes para realizar los procesos de biosorción de metales (parte B). Cuenta con una columna (9) que contiene el raspo de uva, una bomba peristáltica (10) controlada también por el programa, dos válvulas de solenoide de 3 vías (11) y una de dos vías (12), una espiral de reacción (13), además de un conector de 8 vías (14).

El sistema en su conjunto permitió realizar diversas experiencias de seguimiento del proceso de biosorción de metales de transición, tanto monocomponentes como multicomponentes gracias a la matriz de sensores incorporada como detector. Los experimentos se basan en hacer pasar las disoluciones a depurar a través del biosorbente contenido en la columna y determinar la variación de la concentración de los metales a la salida mediante el sistema FIP-ET, obteniendo de esta manera las curvas de rupturas características del proceso ocurrido.

3.4.4 Sistema de valoración automático

El sistema de valoración automático utilizado cuenta con una matriz de ISEs en disposición convencional o batch junto con un electrodo de referencia para tomar las medidas potenciométricas. El equipo empleado utiliza una microbureta Crison 2030 equipada con una jeringa (Hamilton) de 10 ml, y controlada con un programa de control escrito en QuickBasic (Microsoft, WA, USA), desarrollado en nuestro laboratorio. El sistema de medida es un potenciómetro Crison 2002 con un multiplexor automático. La comunicación entre los aparatos y el ordenador se llevaba a cabo mediante el protocolo RS-232. La Figura 3.6 muestra una fotografía del equipo empleado.



Figura 3.6. Fotografía del valorador automático.

Procedimiento de valoración

Las valoraciones de las mezclas ternarias de metales transición se realizaron a pH constante; a cada 25 mL de muestra se le añadió 5 mL de una disolución tampón de imidazol (pH = 6). Las curvas de valoración se obtuvieron mediante 5 adiciones de agente valorante (EDTA 0.020 M) con el objetivo de lograr un análisis rápido y de poca complejidad experimental. La lectura de potencial entre la matriz de sensores y el electrodo de referencia se realizó después de 30 segundos de homogenización. La información de entrada a la ANN consistió en 6 valores de potencial por muestra analizada, es decir $6 \text{ (lecturas de potencial)} \times 8 \text{ (ISEs)} = 48$ vectores de entrada. La

concentración de los patrones para el entrenamiento y validación externa se seleccionaron de manera que el consumo de agente valorante no sobrepasara el volumen total de la bureta; en la Figura 3.11 se muestra la composición de los patrones empleados.

3.4.5 Equipos empleados en otras determinaciones

El espectro infrarrojo (IR) se obtuvo en un espectrofotómetro (Tensor 27, Bruker, Alemania), la espectrometría de masa se realizó en un espectrómetro de masa (Esquire 3000, Bruker, Alemania), el análisis elemental cualitativo se realizó en analizador elemental CHNS (3011, EuroVector, Italia). Además se empleó para el análisis de metales de transición en muestras de suelo un espectrofotómetro de absorción atómica (AAS Varian, 1275) y para el análisis de calcio un equipo de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES Perkin-Elmer, Optima 4300DV).

3.5 Metodologías de cálculo

3.5.1 Caracterización de los ISEs

Dentro de las características de respuesta de los ISEs a evaluar están: el límite de detección, la sensibilidad, la selectividad, el rango de respuesta lineal, el tiempo de vida, el tiempo de respuesta, el efecto del pH, entre otras. La correcta evaluación de estas características deriva en poder establecer las condiciones óptimas para las aplicaciones futuras.

La respuesta de un sensor potenciométrico está descrita por la ecuación de Nernst (Ecuación 1.1) y, según hemos mencionado en el capítulo anterior, la diferencia de potencial de la celda de medición está relacionada con la actividad de la especie a la cual el sensor es selectivo.

En condiciones más cercanas a las situaciones reales, donde existen otros iones que interaccionan con la membrana, la diferencia de potencial de la celda se relaciona también con la actividad de los iones interferentes mediante la ecuación de Nikolskii-Eisenman ecuación (1.3). A 25 °C de temperatura y agrupando los términos constantes, estas ecuaciones se puede escribir de la siguiente manera:

$$E = E_0 + s \cdot \log a_i \quad (3.1)$$

$$E = E_0 + s \cdot \log \left[a_i + \sum_j K_{i,j}^{pot} (a_j)^{\frac{z_i}{z_j}} \right] \quad (3.2)$$

donde s es la pendiente de la recta de calibración, que se conoce como sensibilidad del electrodo, y que tiene un valor teórico de 59.16 mV/década de concentración en el caso de un ion monovalente; la Figura 3.7 muestra una curva de calibración típica para un catión monovalente.

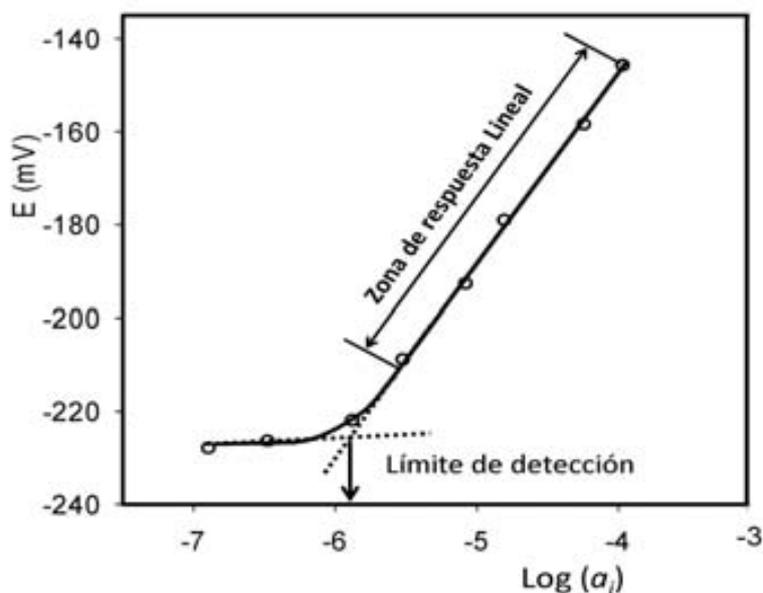


Figura 3.7. Curva de calibración típica de un ISE.

Estas curvas de calibración se obtienen experimentalmente por el método de las adiciones conocidas o de la adición de analito. El procedimiento consiste en hacer adiciones sucesivas y acumulativas de microvolúmenes de patrones de concentraciones perfectamente conocidas sobre un cierto volumen conocido de solvente. De esta manera

se puede conocer la concentración de analito que hay en contacto con los electrodos después de cada adición. En nuestro caso se realizaron adiciones de 25, 50 y 100 μl de disoluciones patrones de 0.001, 0.01, 0.1 o 1 M sobre 25 ml de agua bidestilada, de una disolución amortiguadora de pH o de un fondo iónico concreto, según el caso.

Algunas de las características de respuesta de los ISEs las podemos obtener del ajuste de los puntos experimentales de las curvas de calibración a las ecuaciones de Nernst o de Nikolskii-Eisenman.

Antes de describir la manera en que se determinan estos parámetros vamos a referirnos a la relación entre actividad y concentración, ya que constituye una cuestión importante a tener en cuenta en estos procedimientos. La actividad se conoce como la concentración efectiva de la especie que medimos en disolución y se relaciona con la concentración mediante la expresión siguiente:

$$a_i = \gamma_i \cdot C_i \quad (3.3)$$

donde C_i es la concentración del ion i en la disolución y γ_i es el coeficiente de actividad, que está relacionado con la fuerza iónica (I) de la solución:

$$\log \gamma_{\mp} = \frac{-A \cdot |z_+ \cdot z_-| \cdot \sqrt{I}}{1 + B \cdot \sqrt{I}} + C \cdot I \quad (3.4)$$

donde A ($\alpha T^{-3/2}$), es una constante que para disoluciones acuosas a 25 °C vale 0.5108. Los parámetros B ($\alpha T^{-1/2}$) y C se encuentran tabulados para cada especie iónica [19], z_+ y z_- son la carga del catión y el anión del electrolito.

La fuerza iónica de una solución se calcula mediante la siguiente expresión que tiene en cuenta todos los iones presentes en la disolución:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{n=1}^i z_n^2 C_n \quad (3.5)$$

donde z_n es la carga del ion n y C_n es la concentración.

Uno de los procedimientos conocidos para simplificar el análisis, es añadir un exceso de un electrolito inerte, de esta manera la contribución de los analitos en la fuerza iónica se hace despreciable y en estas nuevas condiciones se puede considerar que la concentración es prácticamente igual a la actividad. En algunos de los experimentos realizados durante la investigación se empleó esta estrategia.

El límite de detección (LD) por definición es la actividad del ion principal en el punto de intersección entre la extrapolación de la zona respuesta de lineal y la zona horizontal que corresponde a las concentraciones más bajas de la curva de calibración [20]. Sin embargo también ésta se puede estimar analíticamente, ajustando los puntos experimentales de la curva de calibración por métodos no lineales a la ecuación siguiente:

$$E = A + B \cdot \log(a_i + C) \quad (3.6)$$

donde B es la sensibilidad del ISE, a_i es la actividad del ion principal calculada y C es el sumatorio entre el LD y el efecto de posibles interferencias:

$$C = LD + \sum_j K_{i,j}^{pot} \cdot a_j^{\frac{z_i}{z_j}} \quad (3.7)$$

Si la determinación se realiza en ausencia de iones interferentes (empleamos agua bidestilada como fondo), el límite de detección se obtiene directamente del ajuste no lineal de la curva de calibración.

La selectividad es una de las características más importantes a tener en cuenta a la hora de evaluar el desempeño de un ISE. El coeficiente de selectividad potenciométrico (K^{pot}) es un parámetro que define el orden de preferencia de una membrana a un determinado grupo de iones. Éste se puede obtener mediante medidas comparativas con los iones interferentes o por el ajuste no lineal de la ecuación de Nicolskii-Eisenman. Normalmente se utiliza el logaritmo del coeficiente de selectividad, por lo que valores

negativos indican la preferencia por el ion principal mientras que valores positivos indican la preferencia por el ion interferente.

Uno de los métodos más empleados para determinar el coeficiente de selectividad potenciométrico es el método de interferencia fija (Fixed interference method, FIM) [21]: en este procedimiento se efectúa una calibración del ion principal sobre una actividad fija de interferente, de esta manera la contribución del límite de detección se puede considerar despreciable en el producto de la constante de selectividad potenciométrica y la actividad del ion interferente (Ecuación 3.7). Así la constante de selectividad potenciométrica se obtiene a través de la siguiente expresión:

$$\log K_{i,j}^{pot} = \frac{a_i^*}{(a_j)^{z_i/z_j}} \quad (3.8)$$

donde a_i^* es la actividad del ion principal que se obtiene del ajuste no lineal de la Ecuación 3.6 (término C), a_j es la actividad fija del ion interferente y z_i y z_j son las cargas del ion principal y el interferente, respectivamente. En la Figura 3.8 se muestra el efecto provocado por la presencia de un ion interferente (Cu^{2+}) en la respuesta de un ISE de Pb^{2+} . Se puede observar cómo se ve afectado significativamente el límite de detección del ISE de Pb^{2+} .

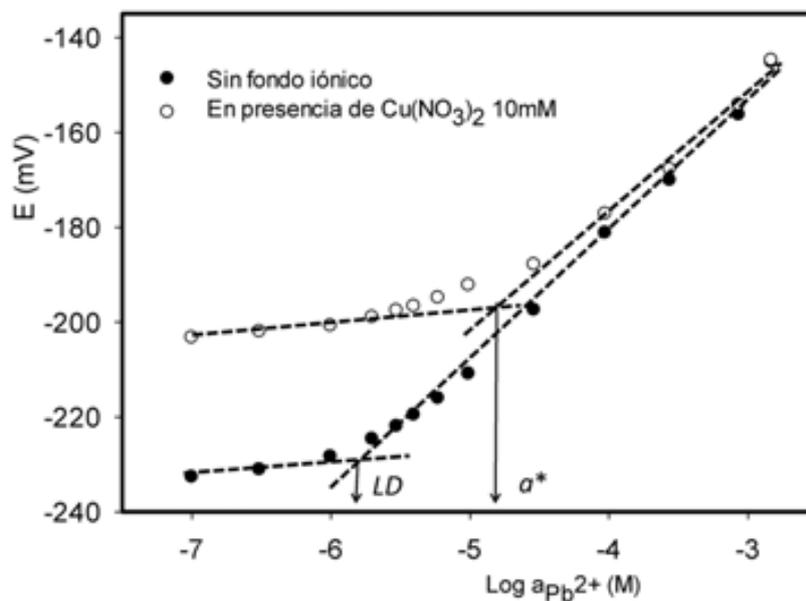


Figura 3.8. Efecto provocado por la presencia de Cu^{2+} en la respuesta de un ISE de Pb^{2+} .

La influencia del pH en la respuesta de los ISEs, se evalúa midiendo la diferencia de potencial de la celda de medición para una disolución del ion principal a medida que se hace variar el pH. La representación correspondiente E vs. pH se conoce como diagrama de Reilley [22].

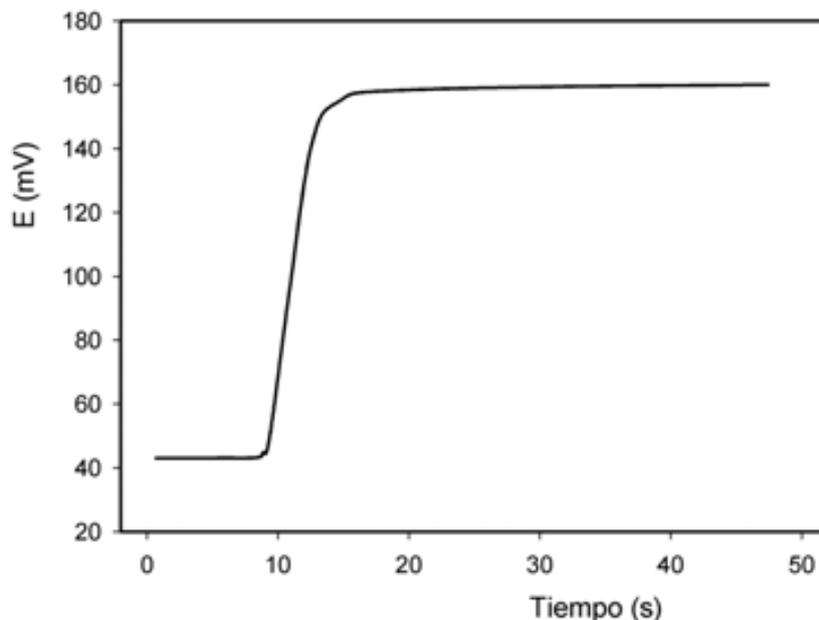


Figura 3.9. Respuesta transitoria exponencial típica de un ISE.

Para la evaluación del tiempo de respuesta, en la Figura 3.9 se muestra la respuesta de un ISE con respecto al tiempo después de una adición de analito. Como se puede observar, un cambio brusco de concentración provoca una variación exponencial del potencial de membrana con el tiempo, llegándose a un tiempo determinado en el que el potencial permanece constante. El tiempo de respuesta de un ISE ($t_{R\%}$) se define como el tiempo que demora el ISE en conseguir un porcentaje de la respuesta final siendo generalmente el tiempo establecido en alcanzar el 90% del potencial del estado estacionario [23]. La curva de E vs. *tiempo* se ajusta a la exponencial siguiente [24]:

$$Y = Y_0 - A_1(1 - e^{-B_1 \cdot x}) \quad (3.9)$$

donde Y es el potencial generado por la celda de medición, x es el tiempo y Y_0 , A_1 y B_1 son los parámetros que se ajustan. Así, el tiempo de respuesta se calcula a partir del parámetro B_1 :

$$t_{90\%} = -\frac{\ln(0.1)}{B_1} \quad (3.10)$$

3.5.2 Características de desempeño en valoraciones potenciométricas con ET

Una de las aplicaciones propuestas fue la determinación simultánea de una mezcla de 3 metales de transición mediante un sistema basado en el método de valoración potenciométrica con una lengua electrónica como sistema de detección. Se determinó el límite de detección, la exactitud y la precisión de la siguiente manera: el *LD* se calculó como 5 veces la desviación estándar de los replicados de una muestra blanco, la precisión se estimó en condiciones de repetitividad, realizando cinco determinaciones a disoluciones con concentraciones intermedias de los 3 iones estudiados. La exactitud se estimó utilizando soluciones estándar para absorción atómica de los tres metales (suministrado por Fluka).

3.6 Ajuste de los modelos de respuesta de los ISEs con ANN

3.6.1 Generación de la información multivariada

Una de las características importantes de las lenguas electrónicas es la gran cantidad de información necesaria para obtener el modelo bien ajustado del proceso en estudio. En el caso de las determinaciones químicas hay dos cuestiones importantes a tener en cuenta: el número de patrones a emplear durante el entrenamiento del modelo y la topología de la ANN (sobre todo las variables que afectan el número de pesos a ajustar). Estas variables tienen una influencia vital en la robustez del modelo obtenido mediante ANN.

En nuestro caso las ETs fueron aplicadas a diferentes metodologías de análisis (potenciometría directa, valoraciones potenciométricas y FIA), éstas se esquematizan en

la Figura 3.10. Estas técnicas tienen señales con características diversas que condicionan la topología de la ANN a la hora del tratamiento.

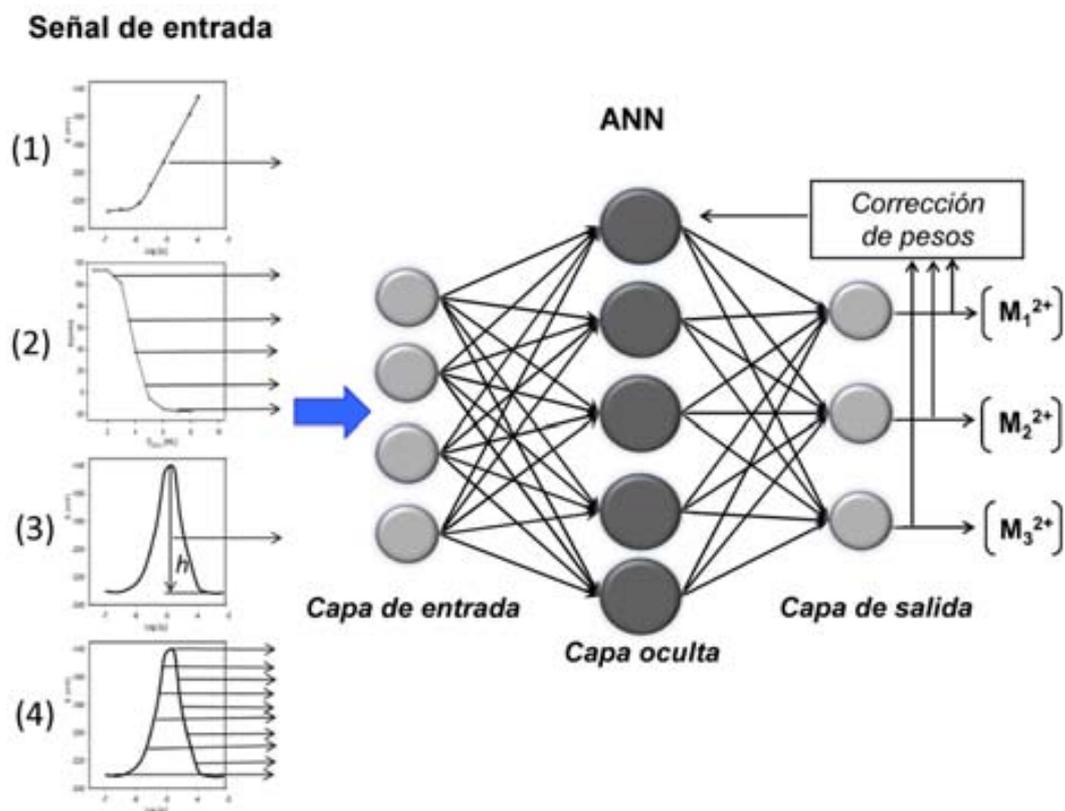


Figura 3.10. Esquema de las ANNs empleadas en las diferentes aplicaciones realizadas durante la investigación. Caso (1) potenciometría directa, (2) valoración potenciométrica, (3) y (4) sistema FIA.

El primer caso, potenciometría directa, donde la señal obtenida (diferencia de potencial de la celda) para cada disolución estándar es un único valor, por tanto la capa de entrada de la ANN queda fijada por el número de sensores empleados en la matriz, Figura 3.10 (1).

En el segundo caso, valoración potenciométrica, donde además del número de ISEs que componen la matriz hay que tener en cuenta el número de adiciones realizadas durante la valoración de cada patrón y muestra, Figura 3.10 (2).

En el tercer caso, situación convencional de metodología FIA (diferencia de potencial con respecto al tiempo), la señal obtenida es altura de pico y la capa de entrada de la ANN queda definida por el número de ISEs de la ET, Figura 3.10 (3).

En el cuarto caso, utilizado en algunas de las experiencias realizadas también mediante metodología FIA, se empleó toda la información contenida en un pico FIA, y para hacer menos complejos los modelos de respuesta, se compactó la señal con la transformada rápida de Fourier. En este caso la topología de la ANN depende del número de coeficientes empleados y del número de ISEs que componen la matriz de sensores, Figura 3.10 (4).

Tabla 3.4. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa de la primera aplicación con ET: determinación de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} y Pb^{2+} en muestras de suelo [25].

Patrón	[Pb ²⁺]/mM	[Cd ²⁺]/mM	[Cu ²⁺]/mM	[Zn ²⁺]/mM	Patrón	[Pb ²⁺]/mM	[Cd ²⁺]/mM	[Cu ²⁺]/mM	[Zn ²⁺]/mM
1	1.0×10 ⁻⁴	9.0×10 ⁻⁴	8.0×10 ⁻⁴	7.0×10 ⁻⁴	20	3.0×10 ⁻²	9.0×10 ⁻²	2.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁴
2	2.0×10 ⁻⁴	1.0	7.0×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻⁴	21	6.0×10 ⁻²	3.0×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻²	9.0×10 ⁻⁴
3	3.0×10 ⁻⁴	8.0×10 ⁻⁴	8.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻⁴	22	9.0×10 ⁻²	6.0×10 ⁻²	3.0×10 ⁻²	8.0×10 ⁻⁴
4	4.0×10 ⁻⁴	8.0×10 ⁻¹	6.0×10 ⁻¹	4.0×10 ⁻⁴	23	2.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻⁴	1.0	3.0×10 ⁻⁵
5	5.0×10 ⁻⁴	7.0×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻¹	24	4.0×10 ⁻¹	3.0×10 ⁻²	9.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻⁵
6	6.0×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻¹	25	6.0×10 ⁻¹	1.0×10 ⁻⁴	1.0×10 ⁻²	1.0×10 ⁻³
7	7.0×10 ⁻⁴	6.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	26	8.0×10 ⁻¹	1.0×10 ⁻³	9.0×10 ⁻³	8.0×10 ⁻⁶
8	8.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	9.0×10 ⁻²	27	1.0	1.0×10 ⁻²	1.0×10 ⁻⁴	8.0×10 ⁻⁴
9	9.0×10 ⁻⁴	9.0×10 ⁻³	8.0×10 ⁻³	7.0×10 ⁻³	28*	2.0×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻²	9.0×10 ⁻¹	1.0×10 ⁻³
10	1.0×10 ⁻³	5.0×10 ⁻⁴	7.0×10 ⁻³	6.0×10 ⁻³	29*	2.0×10 ⁻¹	4.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹
11	2.0×10 ⁻³	2.0×10 ⁻¹	6.0×10 ⁻³	5.0×10 ⁻³	33*	5.0×10 ⁻²	8.0×10 ⁻⁴	5.0×10 ⁻²	2.0×10 ⁻⁴
12	3.0×10 ⁻³	8.0×10 ⁻³	4.0×10 ⁻⁴	4.0×10 ⁻³	31*	1.0×10 ⁻³	4.0×10 ⁻¹	7.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹
13	4.0×10 ⁻³	7.0×10 ⁻³	9.0×10 ⁻²	3.0×10 ⁻³	32*	2.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹
14	5.0×10 ⁻³	6.0×10 ⁻³	5.0×10 ⁻³	3.0×10 ⁻⁴	33*	4.0×10 ⁻¹	1.0×10 ⁻³	4.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹
15	6.0×10 ⁻³	5.0×10 ⁻³	4.0×10 ⁻³	6.0×10 ⁻²	34*	5.0×10 ⁻¹	9.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹	4.0×10 ⁻¹
16	7.0×10 ⁻³	4.0×10 ⁻³	3.0×10 ⁻³	2.0×10 ⁻³	35*	5.0×10 ⁻¹	7.0×10 ⁻¹	9.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹
17	8.0×10 ⁻³	3.0×10 ⁻³	2.0×10 ⁻³	1.0×10 ⁻³	36*	7.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹	2.0×10 ⁻¹	9.0×10 ⁻¹
18	9.0×10 ⁻³	2.0×10 ⁻³	1.0×10 ⁻³	9.0×10 ⁻³	37*	9.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹	5.0×10 ⁻¹	7.0×10 ⁻⁴
19	1.0×10 ⁻²	4.0×10 ⁻⁴	3.0×10 ⁻⁴	2.0×10 ⁻⁴					

* Disoluciones que forman el subconjunto de validación externa.

La arquitectura de las ANNs empleadas se seleccionó de forma que se minimizara el número de neuronas en la capa de entrada y por tanto el número de pesos a ajustar durante el procesamiento. El número de patrones siempre fue mayor que el número de pesos a ajustar, pero no tan alto que afectara el tiempo de análisis. En las Tablas 3.4 y 3.5 y las Figuras 3.11-3.13 se muestran las composiciones de los diferentes conjuntos de patrones empleados en las diferentes aplicaciones realizadas.

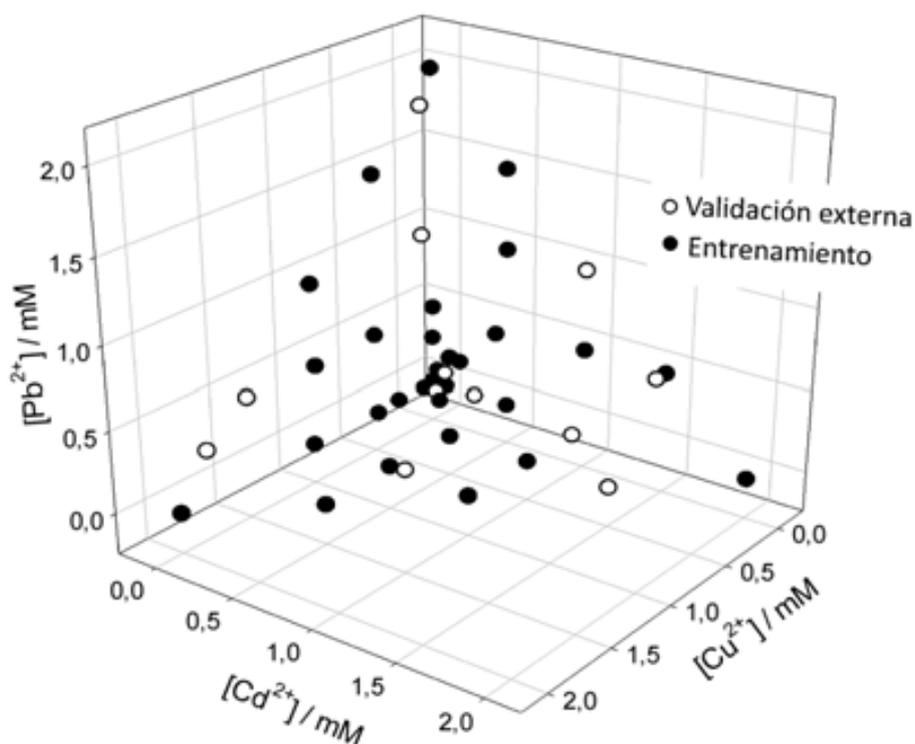


Figura 3.11. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa para la segunda aplicación con lengua electrónica: valoración complexométrica de Cu^{2+} , Cd^{2+} , y Pb^{2+} empleando una ET, (rango de concentración de 2.0×10^{-3} mM a 2.0 mM para los tres iones), en este caso la suma de concentraciones quedaba condicionada por el volumen total de la bureta automática.

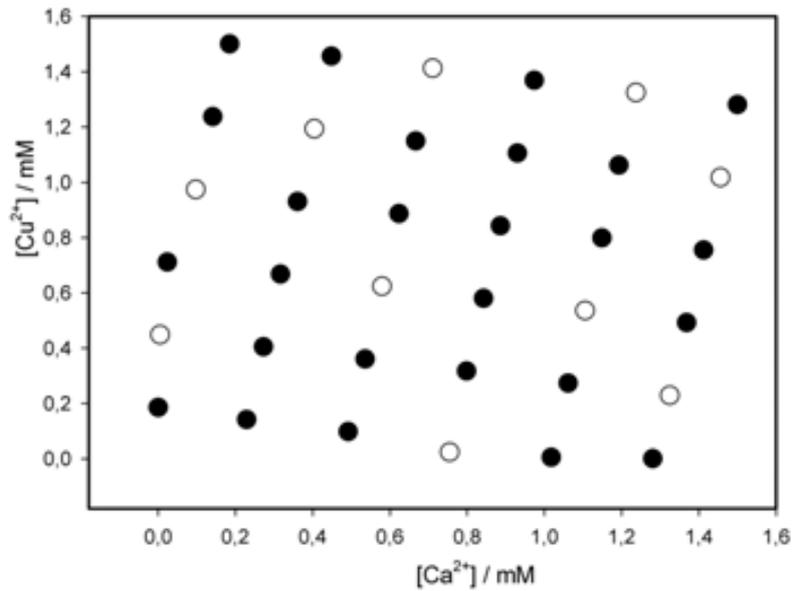


Figura 3.12. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa para la tercera aplicación con la lengua electrónica: monitorización del proceso de biosorción de Cu^{2+} empleando un sistema FIP-ET [26]. Subconjunto de entrenamiento (●) y subconjunto de validación externa (○).

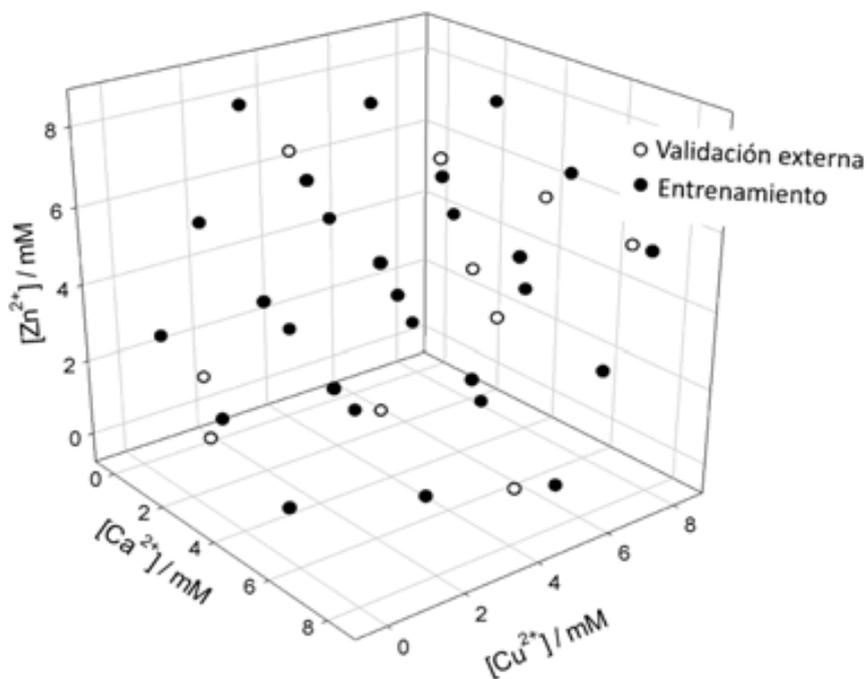


Figura 3.13. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa para la cuarta aplicación con la lengua electrónica: monitorización del proceso de biosorción de mezclas ternarias con el sistema FIP-ET (en este ejemplo el sistema fue Zn/Cu/Ca).

Tabla 3.5. Composición de los patrones empleados en el proceso de entrenamiento y validación externa para la cuarta aplicación con lengua electrónica: monitorización del proceso de biosorción de mezclas cuaternarias con el sistema FIP-ET (en este caso se muestra el sistema Pb/Cu/Zn/Ca).

Patrón	[Pb ²⁺]/mM	[Cu ²⁺]/mM	[Zn ²⁺]/mM	[Ca ²⁺]/mM	Patrón	[Pb ²⁺]/mM	[Cu ²⁺]/mM	[Zn ²⁺]/mM	[Ca ²⁺]/mM
1	4x10 ⁻³	2.24	2.24	2.24	20	5.76	6.40	0.33	0.33
2	6x10 ⁻³	8.00	1.92	1.92	21	6.08	1x10 ⁻³	6.40	1.92
3	0.33	1.92	8.00	1.60	22	6.40	6.08	6.08	4x10 ⁻³
4	0.64	7.68	7.68	1.28	23	6.72	0.01	0.01	6.40
5	0.96	1.60	1.60	8.00	24	7.04	5.76	4x10 ⁻³	6.08
6	1.28	7.36	1.28	7.68	25	7.361	4x10 ⁻³	5.76	5.76
7	1.60	1.28	7.36	7.36	26	7.68	2.56	2.56	2.56
8	1.92	7.04	7.04	7.04	27	8.00	5.44	5.44	5.44
9	2.24	5.12	5.12	5.12	28*	0.94	7.98	7.98	1.98
10	2.56	0.96	4.80	4.80	29*	5.99	1.69	0.504	0.79
11	2.88	6.72	4.48	4.48	33*	4.32	2.60	2.88	2.08
12	3.20	4.80	0.96	4.16	31*	1.70	1.98	7.38	7.36
13	3.52	4.48	6.72	3.845	32*	2.94	0.16	5.12	4.20
14	3.84	4.165	4.16	0.96	33*	4.65	3.24	3.19	6.68
15	4.16	3.845	3.84	6.72	34*	7.68	2.56	4.36	2.97
16	4.48	3.52	3.52	3.52	35*	3.60	4.44	6.92	3.24
17	4.80	3.20	3.20	3.20	36*	2.70	5.40	5.82	5.92
18	5.12	2.88	2.88	2.88	37*	0.03	0.75	0.90	0.15
19	5.44	0.64	0.64	4x10 ⁻³					

* Disoluciones que forman el subconjunto de validación externa

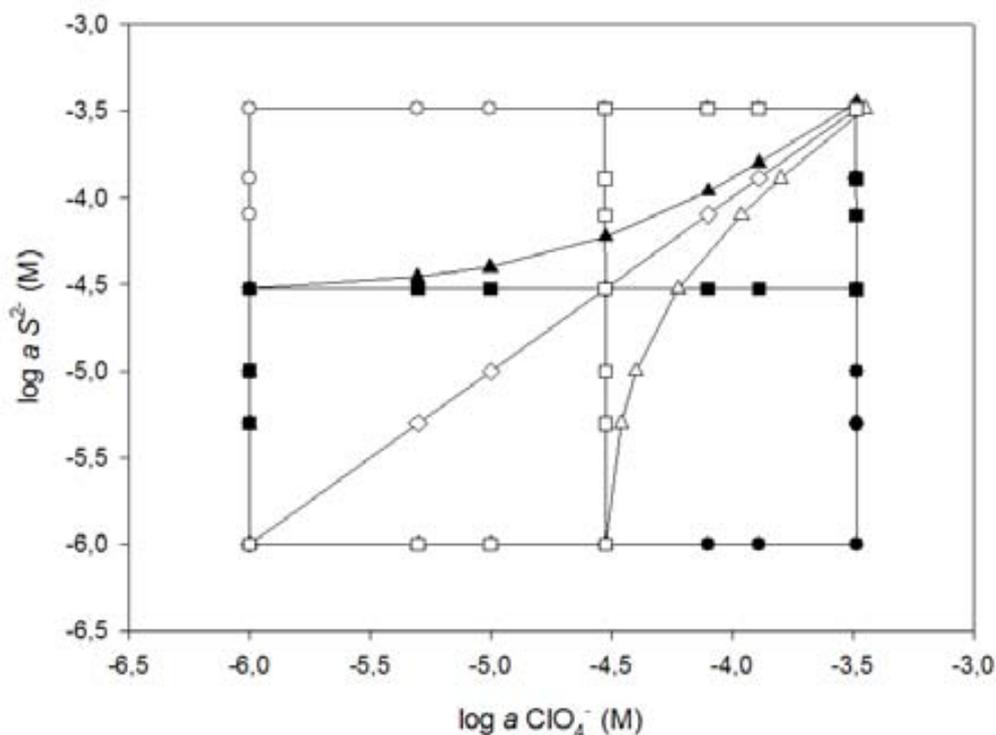


Figura 3.14. Visualización de las disoluciones estándar preparadas para el entrenamiento de la lengua electrónica empleada en la determinación de sulfuro y perclorato. Se muestran las siete secuencias de adición de estándar empleadas: 1 (○), 2 (●), 3 (□), 4 (■), 5 (△), 6 (▲) y 7 (◇) [27].

3.6.2 Procesamiento de datos multivariados

La herramienta estadística seleccionada para el tratamiento de los datos provenientes de la matriz de sensores fue las ANNs, debido a su capacidad para procesar datos complejos, sobre todo cuando se trata de una señal con comportamiento no lineal. Los programas de cálculo fueron escritos en MATLAB 7.2, empleando herramientas del entorno Neural Network Toolbox 4.0. Las redes empleadas fueron del tipo: unidireccional (*feed forward neural networks*) con algoritmos de entrenamiento con retropropagación y Regulación Bayesiana [28]. La distribución de los patrones para la calibración múltiple se realizó de la siguiente manera: se separaron en dos subconjuntos, de entrenamiento y validación externa o test, en los que tres cuartas partes se utilizaron en el entrenamiento y una cuarta parte para validación externa. Los patrones se distribuyen aleatoriamente, con la única precaución de que las disoluciones con valores

máximos y mínimos de concentración se encontraran en el subconjunto de entrenamiento.

En las aplicaciones de monitorización de los procesos de biosorción de mezclas ternarias y cuaternarias de metales de transición mediante el sistema FIP-ET, fue necesario emplear un método de pretratamiento para compactar la señal, debido a la gran cantidad de información de entrada a la ANN. La compactación se hizo mediante la transformada rápida de Fourier. Los picos obtenidos referidos a diferencia de potencial con respecto al tiempo estaban compuestos por 210 valores, estos se descomponen en sus coeficientes de Fourier y se obtiene el mismo número de coeficientes. El número de coeficientes empleados se tomó como una variable a optimizar dentro del proceso de obtención del modelo. Todas las entradas a la ANN (ya sean diferencias de potencial o módulos de coeficientes de Fourier) se normalizan entre [-1, 1] para facilitar una correcta modelización [29].

En el proceso de entrenamiento se optimizan los pesos sinápticos con el fin de minimizar el error cuadrático medio (Root Mean Square Error, RMSE) entre los valores de concentración esperados y los obtenidos según:

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 1}} \quad (3.11)$$

donde y_i es el valor de concentración predicho por el modelo, \hat{y}_i es el valor esperado para cada una de las n muestras de entrenamiento o validación externa.

Algunos parámetros de la red neuronal son definidos a priori, como el número de neuronas en la capa de entrada que depende de la metodología de análisis empleada y el número de neuronas de la capa de salida, éste queda definido por el número de especies que se quieren determinar. Para otros parámetros se toman valores iniciales predefinidos gracias a la experiencia previa del Grupo de Sensores y Biosensores en ANNs [4, 30], como la velocidad de aprendizaje ($\alpha = 0.1$), y el momento ($\beta = 0.4$), la función de transferencia de las neuronas de la capa de entrada (*purelin*), así como la utilización de una sola capa oculta. En cambio, los siguientes parámetros fueron optimizados

sistemáticamente para obtener el mejor modelo de ANN: el número de neuronas de la capa oculta y las funciones de transferencia de las neuronas de la capa oculta y de la capa de salida.

Una vez optimizado el modelo, se calculan las concentraciones de los diferentes subconjuntos de entrenamiento y validación externa. Posteriormente se realiza un análisis de regresión entre la concentración calculada por la ET y la concentración esperada (exactamente conocida de los patrones) para evaluar los resultados. Un buen comportamiento de los sistemas debe proporcionar coeficientes de correlación cercanos a la unidad, así como pendientes y ordenadas iguales a 1 y 0, respectivamente.

3.7 Determinación de parámetros de biosorción

La capacidad de saturación $q_{columna}$ ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$) se determina calculando el área total bajo la curva de ruptura. Esta área representa la cantidad de soluto sorbido por masa de sólido en la zona de sorción [31, 32]. El punto de ruptura se selecciona arbitrariamente a un valor bajo, C_b ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); y se considera que el sorbente se satura cuando la concentración del efluente, C_x ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) alcanza un 90% de C_0 (concentración inicial del sorbato, $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) [33, 34].

$$q_{columna} = \frac{\int (C_0 - C) dV}{m} \quad (3.12)$$

donde C es la concentración de metal en el efluente ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) y m es la masa de sorbente (g).

El proceso de sorción en la columna requiere de la predicción del perfil o curva de ruptura (concentración en el tiempo) para el efluente. Se pueden usar varios modelos matemáticos para describir los procesos de sorción en columna de lecho fijo. Uno de los más simples y más usados es el modelo de Thomas [35]; este modelo permite determinar la máxima concentración de soluto en la fase sólida, así como la constante de velocidad de sorción. La ecuación lineal del modelo es la siguiente:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C} - 1\right) = \frac{k_{Th}q_0m}{Q} - \frac{k_{Th}C_0V_{ef}}{Q} \quad (3.13)$$

donde k_{th} es la constante de velocidad de Thomas ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mmol}^{-1}$), q_0 es el metal en equilibrio retenido por gramo de sorbente ($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$), Q es la velocidad de flujo volumétrico ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), V_{ef} es el volumen de efluente (mL) y m es la masa del sorbente dentro de la columna (g).

El modelo de tiempo de servicio de profundidad del lecho (BDST) fue formulado por Hutchins [36, 37], elucidado de la relación entre el tiempo de servicio y la profundidad del lecho empacado en una columna y se expresa como:

$$C_0t = \frac{N_0h}{u} - \frac{1}{K} \ln\left[\frac{C_0}{C} - 1\right] \quad (3.14)$$

donde C_0 es la concentración del efluente ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), C es a concentración del efluente a un tiempo t ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), K es la constante de velocidad de sorción ($\text{mL}\cdot\text{mmol}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), N_0 es la capacidad de sorción ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), h es la profundidad del sorbente de lecho fijo (cm), u es la velocidad lineal de flujo ($\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$) y t es el tiempo de servicio de ruptura (min).

El modelo de Yoon-Nelson [38] se basa en la suposición de que la velocidad de disminución en la probabilidad de sorción de cada molécula de sorbato es proporcional a la probabilidad de sorción de sorbato y a la probabilidad de la ruptura del sorbato en el sorbente [35, 38]. La ecuación lineal del modelo para un sistema de un solo componente se expresa como:

$$\ln\frac{C_t}{C_0 - C} = k_{YN}t - \theta_r k_{YN} \quad (3.15)$$

donde k_{YN} es la constante de velocidad (min^{-1}) y θ_r es el tiempo requerido para la ruptura del 50% del sorbato (min).

Cuando el comportamiento dinámico de la sorción en columna de lecho fijo se predice por los modelos anteriormente descritos, el porcentaje de desviación estándar de Marquardt's (Marquardt's percent standard deviation, MPSD) nos da un estimado del error entre los valores teóricos y experimentales de C/C_0 usados para graficar la curva de ruptura, el MPSD se calcula por la siguiente ecuación [39]:

$$MPSD = 100 \cdot \sqrt{\frac{1}{N - P} \sum \left[\frac{(C/C_0)_{exp} - (C/C_0)_{teo}}{(C/C_0)_{exp}} \right]^2} \quad (3.16)$$

donde N es el número de datos y P es el número de parámetros (o los grados de libertad del sistema).

3.8 Determinación de trazas de metales en suelos

Para la extracción de las trazas de metales en suelos, 3 g de la muestra se colocan en un balón de fondo redondo de 100 mL con 21 mL de HCl (35 %) y 7 de HNO₃ (65 %). La solución se mantiene a temperatura ambiente toda una noche, posteriormente la mezcla se calienta a ebullición durante 2 horas con un condensador de agua acoplado, posteriormente se retira el condensador y se reduce el volumen a 10 mL. Se añaden 25 mL de agua y se filtra, el residuo se lava dos veces con 5 mL de agua, se reúnen con el extracto y por último se diluye con agua hasta la marca en un matraz aforado de 50 mL. Los extractos obtenidos se analizan por triplicado por los métodos de referencia escogidos y por los sistemas analíticos propuestos.

3.9 Bibliografía

- [1] E.S. Raper, J.R. Creighton, N.A. Bell, W. Clegg, L. Cucurull-Sanchez, Complexes of heterocyclic thiones and group twelve metals - Part 1. Preparation and characterisation of 1 : 1 complexes of mercury(II) halides with 1-methylimidazoline-2(3H)-thione: the crystal structure of $[(\mu(2)\text{-dibromo})\text{bis}(\text{trans}\{(\text{bromo})(1\text{-methyl-imidazoline-2(3H)-thione})\}\text{mercury(II)})]$ at 160 K, *Inorg. Chim. Acta.*, 277 (1998) 14-20.
- [2] Z. Popovic, D. Matkovic-Calogovic, Z. Soldin, G. Pavlovic, N. Davidovic, D. Vikić-Topić, Mercury(II) compounds with 1,3-imidazole-2-thione and its 1-methyl analogue. Preparative and NMR spectroscopic studies. The crystal structures of di- μ -iodo-bis[iodo(1,3-imidazolium-2-thiolato-S)mercury(II)], bis[bromo(1,3-imidazolium-2-thiolato-S)]mercury(II) and bis[μ -(1-N-methyl-1,3-imidazole-2-thiolato-S)]mercury(II), *Inorg. Chim. Acta.*, 294 (1999) 35-46.
- [3] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle, Use of an Electronic Tongue Based on All-Solid-State Potentiometric Sensors for the Quantitation of Alkaline Ions, *Electroanal.*, 17 (2005) 348-355.
- [4] M. Cortina, A. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals: Part 2. Potentiometric e-tongue for the determination of alkaline ions, *Talanta*, 66 (2005) 1197-1206.
- [5] D. Wilson, M.A. Arada, S. Alegret, M. del Valle, Lead(II) ion selective electrodes with PVC membranes based on two bis-thioureas as ionophores: 1,3-bis(N'-benzoylthioureido)benzene and 1,3-bis(N'-furoylthioureido)benzene, *J. Hazard. Mater.*, 181 (2010) 140-146.
- [6] F. Lanter, D. Erne, D. Ammann, W. Simon, Neutral carrier based ion-selective electrode for intracellular magnesium activity studies, *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2400-2402.
- [7] A.J. Freund, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, B.J. Birch, Studies of calcium ion-selective electrodes in the presence of anionic surfactants, *Analyst*, 108 (1983) 1072-1081.
- [8] S. Kamata, K. Onoyama, Lead-selective membrane electrode using methylene bis(diisobutyldithiocarbamate) neutral carrier, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1295-1298.

- [9] E. Malinowska, Z. Brzózka, K. Kasiura, R.J.M. Egberink, D.N. Reinhoudt, Lead selective electrodes based on thioamide functionalized calix[4]arenes as ionophores, *Anal. Chim. Acta*, 298 (1994) 253-258.
- [10] R. Kojima, S. Kamata, Zinc-Selective Membrane Electrodes Using Tetrabutyl Thiuram Disulfide Neutral Carrier, *Anal. Sci.*, 10 (1994) 405-412.
- [11] V. Gupta, D. Chauhan, V. Saini, S. Agarwal, M. Antonijevic, H. Lang, A Porphyrin Based Potentiometric Sensor for Zn^{2+} Determination, *Sensors*, 3 (2003) 223-235.
- [12] J.K. Schneider, P. Hofstetter, E. Pretsch, D. Ammann, W. Simon, N,N,N',N'-Tetrabutyl-3,6-dioxaoctan-dithioamid, Ionophor mit Selektivität für Cd^{2+} , *Helv. Chim. Acta*, 63 (1980) 217-224.
- [13] D. Xu, T. Katsu, Tetrabenzyl pyrophosphate as a new class of neutral carrier responsive to lead ion, *Talanta*, 51 (2000) 365-371.
- [14] A.K. Singh, S. Mehtab, Calcium(II)-selective potentiometric sensor based on [alpha]-furildioxime as neutral carrier, *Sens. Actuator B-Chem.*, 123 (2007) 429-436.
- [15] S. Kamata, H. Murata, Y. Kubo, A. Bhale, Copper(II)-selective membrane electrodes based on o-xylylene bis(dithiocarbamates) as neutral carriers, *Analyst*, 114 (1989) 1029-1031.
- [16] S. Alegret, A. Florido, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, Flow-through tubular iodide and bromide selective electrodes based on epoxy resin heterogeneous membranes, *Talanta*, 36 (1989) 825-829.
- [17] A. Durán, M. Cortina, L. Velasco, J. Rodríguez, S. Alegret, M. Del Valle, Virtual Instrument for an Automated Potentiometric e-Tongue Employing the SIA Technique, *Sensors*, 6 (2006) 19-29.
- [18] A. Florido, C. Valderrama, S. Nualart, L. Velazco-Molina, O.A. de Fuentes, M. del Valle, Computer controlled-flow injection potentiometric system based on virtual instrumentation for the monitoring of metal-biosorption processes, *Anal. Chim. Acta*, 668 (2010) 26-34.
- [19] P.C. Meier, Two-parameter Debye-Hückel approximation for the evaluation of mean activity coefficients of 109 electrolytes, *Anal. Chim. Acta*, 136 (1982) 363-368.

- [20] J. Inczèdy, T. Lengyel, A.M. Ure, *Compendium of analytical nomenclature IUPAC*, Blackwell Science, Oxford, 1998.
- [21] Y. Umezawa, P. Buhlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes Part I. Inorganic cations - (Technical report), *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 1851-2082.
- [22] C.N. Reilley, R.W. Schmid, Chemometric Titrations with Potentiometric end Point Detection-Mercury as PM Indicator Electrode, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 947-953.
- [23] R.P. Buck, E. Lindner, Recommendations for nomenclature of ion-selective electrode, *Pure Appl. Chem.*, 66 (1994) 2527-2536.
- [24] J. Sanches, Sensors potenciomètrics selectius a tensioactius aniònics. Universitat Autònoma de Barcelona, in, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 2002.
- [25] D. Wilson, J.M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, Simultaneous Determination of Zn(II), Cu(II), Cd(II) and Pb(II) in Soil Samples Employing an Array of Potentiometric Sensors and an Artificial Neural Network Model, *Electroanal.*, 24 (2012) 2249-2256.
- [26] D. Wilson, M. del Valle, S. Alegret, C. Valderrama, A. Florido, Potentiometric electronic tongue-flow injection analysis system for the monitoring of heavy metal biosorption processes, *Talanta*, 93 (2012) 285-292.
- [27] D. Wilson, M.N. Abbas, A.L.A. Radwan, M.d. Valle, Potentiometric Electronic Tongue to Resolve Mixtures of Sulfide and Perchlorate Anions, *Sensors*, 11 (2011) 3214-3226.
- [28] H. Demuth, M. Beale, *Neural Network Toolbox Users Guide*, in, Mathworks Inc.: Natick, MA, 2002.
- [29] J. Gallardo, S. Alegret, M.A. de Román, R. Muñoz, P.R. Hernández, L. Leija, M.d. Valle, Determination of Ammonium Ion Employing an Electronic Tongue Based on Potentiometric Sensors, *Anal. Lett.*, 36 (2003) 2893-2908.
- [30] J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De-Román, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle, S. Alegret, M. A., An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 248-256.
- [31] A. Florido, C. Valderrama, J.A. Arévalo, I. Casas, M. Martínez, N. Miralles, Application of two sites non-equilibrium sorption model for the removal of Cu(II) onto grape stalk wastes in a fixed-bed column, *Chem. Eng. J.*, 156 (2010) 298-304.

- [32] N. Miralles, C. Valderrama, I. Casas, M. Martínez, A. Florido, Cadmium and Lead Removal from Aqueous Solution by Grape Stalk Wastes: Modeling of a Fixed-Bed Column, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 3548-3554.
- [33] V.V. Goud, K. Mohanty, M.S. Rao, N.S. Jayakumar, Prediction of mass transfer coefficient in a packed bed using tamarind nut shell activated carbon to remove phenol, *Chem. Eng. Technol.*, 28 (2005) 991-997.
- [34] C. Valderrama, J. Barios, A. Farrán, J. Cortina, Evaluation of Phenol/Aniline (Single and Binary) Removal from Aqueous Solutions onto Hyper-cross-linked Polymeric Resin (Macronet MN200) and Granular Activated Carbon in Fixed-Bed Column, *Water Air Soil Poll.*, 215 (2011) 285-297.
- [35] C.Y. Yin, M.K. Aroua, W.M.A.W. Daud, Fixed-bed adsorption of metal ions from aqueous solution on polyethyleneimine-impregnated palm shell activated carbon, *Chem. Eng. J.*, 148 (2009) 8-14.
- [36] R.A. Hutchins, New method simplifies design of activated-carbon system, *Am. J. Chem. Eng.*, 80 (1973) 133-138.
- [37] S. Kundu, A.K. Gupta, As(III) removal from aqueous medium in fixed beds using iron oxide-coated cement: experimental and modeling studies, *Chem. Eng. J.*, 129 (2007) 123-131.
- [38] Y.H. Yoon, J.H. Nelson, Application of gas adsorption kinetics. I. A theoretical model for respirator cartridge service life, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 45 (1984) 509-516.
- [39] V.C. Srivastava, I.D. Malla, I.M. Mishra, Competitive adsorption of cadmium(II) and nickel(II) metal ions from aqueous solution onto rice husk ash, *Chem. Eng. Process*, 48 (2009) 370-379.

4 DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS

4.1 Introducción

El desarrollo industrial, cuando no se ha conducido bajo concienciación ambiental, ha provocado la contaminación de los ecosistemas, entre otros, con metales de transición. El control de este tipo de contaminación es primordial por los graves daños que provoca, incluyendo a la salud humana. La cuantificación de estos metales se realiza principalmente con métodos muy precisos y robustos, como es el caso de la Espectrometría de Absorción Atómica, la Espectrometría de Emisión con Plasma Acoplado Inductivamente, por métodos cromatográficos, entre otros. Sin embargo, estos equipos deben estar confinados en espacios controlados, requieren de personal cualificado y son muy costosos, por lo que la búsqueda de métodos más versátiles, económicos y que puedan integrarse en sistemas analíticos automatizables es todavía una meta de la química analítica.

En la presente tesis se presentan varias herramientas analíticas avanzadas basadas en Lenguas Electrónicas potenciométricas para la determinación de trazas de metales de transición. Los primeros trabajos realizados estuvieron encaminados en obtener nuevos sensores potenciométricos selectivos a Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} , especies de elevada toxicidad. Se diseñaron y sintetizaron dos nuevas bis-tioureas para ser empleadas como elemento de reconocimiento, basándonos en las propiedades complejantes de estos compuestos. Al realizar los estudios correspondientes se obtuvieron dos nuevos electrodos selectivos a plomo con muy buenas características de respuesta, comparables con los referenciados en la literatura.

Los electrodos obtenidos, junto a otros con membranas comerciales, se emplearon en técnicas avanzadas de análisis, desarrollándose tres aplicaciones diferentes. En la primera de ellas se empleó una lengua electrónica potenciométrica en la determinación simultánea de Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} a nivel de trazas en muestras de suelos contaminados. En la segunda se desarrolló un sistema de valoración complexométrica con un número reducido de adiciones fijas de agente valorante para resolver mezclas ternarias de metales de transición empleando una lengua electrónica potenciométrica. En la tercera aplicación se incorporó una lengua electrónica como elemento de detección en un sistema completamente automatizado para realizar la monitorización de procesos de biosorción de metales de transición en residuos de raspo de uva procedente de la industria vinícola.

El trabajo realizado ha permitido la escritura y publicación de varios artículos en revistas científicas de prestigio internacional, que se citan a continuación:

1. Lead (II) ion selective electrodes with PVC membranes based on two bis-thioureas as ionophores: 1,3-bis(N-benzoylthioureido)benzene and 1,3-bis(N-furoylthioureido)benzene.

J. Hazard. Mater., 18 (2010), 140-146.

D. Wilson, M. Arada, S. Alegret, M. del Valle

2. Potentiometric electronic tongue-flow injection analysis system for the monitoring of heavy metal biosorption processes.

Talanta, 93 (2012), 285-292

D. Wilson, M. del Valle, S. Alegret, C. Valderrama, A. Florido

3. Simultaneous determination of Zn(II), Cu(II), Cd(II) and Pb(II) in soil samples employing an array of potentiometric sensors and an artificial neural network model.

Electroanalysis, 24 (2012), 2249-2256

D. Wilson, J. M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle

4. Simultaneous and Automated Monitoring of the Multimetal Biosorption Processes by Potentiometric Sensor Array and Artificial Neural Network.

Talanta, enviado

D. Wilson, M. del Valle, S. Alegret, C. Valderrama, A. Florido

Durante la etapa de entrenamiento y familiarización con las lenguas electrónicas se trabajó en una línea de investigación relacionada con la determinación sulfuro y perclorato, temática que no guarda relación directa con los objetivos generales de la tesis. Las investigaciones se desarrollaron en cooperación con el Laboratorio de Analítica del Centro Nacional de Investigaciones de Dokki de El Cairo. Tuvo como objetivo el desarrollo de una lengua electrónica potenciométrica basada en sensores de alta durabilidad, basados en una unión covalente entre el ionóforo y la matriz polimérica para resolver mezclas de sulfuro y perclorato. Del trabajo realizado se logró una publicación:

1. Potentiometric Electronic Tongue to Resolve Mixtures of Sulfide and Perchlorate Anions.

Sensors, 11 (2011), 3214-3226.

D. Wilson, M. N. Abbas, A. L. A. Radwan, M. del Valle.

4.2 Dos nuevas bis-tioureas empleadas como ionóforos en electrodos de membranas poliméricas para determinación de plomo en suelos

4.2.1 Síntesis y caracterización de las bis-tioureas

Las bis-tioureas propuestas (1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno y 1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno) como ionóforos (Figura 4.1) tienen la ventaja de tener una síntesis y purificación rápida y fácil. Estos compuestos contienen grupos furoilo o benzoilo que aumentan su lipofilicidad, una característica importante para mejorar la solubilidad en la membrana polimérica y así evitar la lixiviación a las disoluciones acuosas durante las determinaciones. Además, los diferentes puntos de coordinación: N, O y S están dispuestos en una geometría específica y con una dureza química variable, todo esto puede influir en la afinidad hacia diferentes metales. La Tabla 4.1 muestra las principales características obtenidas durante la síntesis y caracterización de ambos compuestos.

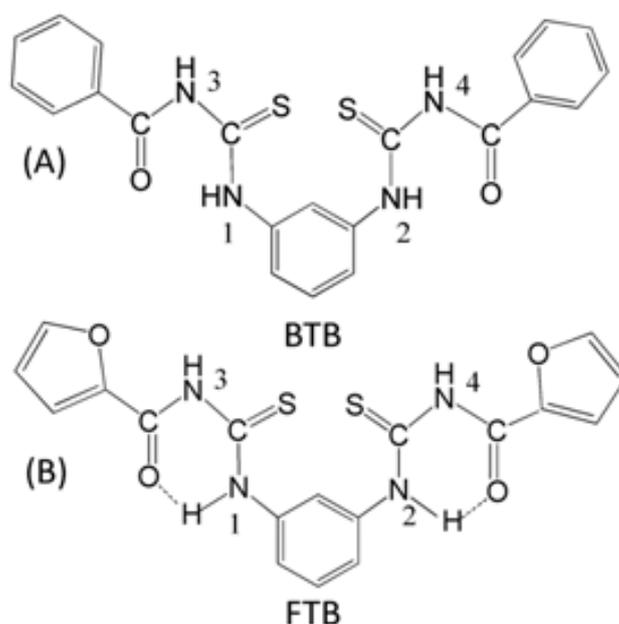


Figura 4.1. Estructura de las bis-tioureas empleadas como ionóforos, (A) 1,3-bis(N-benzoiltioureido)benceno (BTB) y (B) 1,3-bis(N-furoiltioureido)benceno (FTB).

Los dos productos se obtuvieron con muy buen rendimiento, de 79.2 y 84.9% para el BTF y el BTB, respectivamente. En la síntesis de la furoil tiourea se obtuvo un menor

rendimiento, presumiblemente por la formación de aceites, cuestión muy común en la obtención de estos compuestos. En el análisis del espectro IR, se identificaron los principales grupos funcionales, éstos se muestran en la Tabla 4.1. Las vibraciones correspondientes a los grupos N-H se obtuvieron a 3322 y 3271 cm^{-1} para BTB y FTB respectivamente. Las vibraciones del grupo carbonilo (C=O) se detectó a 1666 cm^{-1} para el BTB y 1667 cm^{-1} para el FTB. Estas bandas han experimentado un corrimiento a longitudes de onda más cortas de lo esperado; varios autores atribuyen este hecho a la formación de enlaces de hidrógeno intramolecular (Figura 4.1 B) [1-3]. En esta configuración, el átomo de S está dispuesto hacia fuera de la molécula facilitando la formación de quelatos muy estables. Las otras bandas localizadas en el espectro fueron las correspondientes al grupo tioureido I, II, III y IV.

Tabla 4.1. Caracterización de las bis-tioureas sintetizadas.

Ionóforo	Rendimiento (%)	T. fusión (°C)	Fórmula	Masa m/z (M^+)	Análisis elemental	IR	$^1\text{HRMN}$ (DMSO- d_6)
BTB	84.9	218 ± 2	$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ (434.5)	434.1	Calculado C, 60.81, H, 4.18, N, 12.89, S, 14.76 Obtenido C, 59.07 H, 4.05, N, 12.05, S, 14.32	v 3322 (NH), 1666 (C=O), 1523 (I), 1260 (II), 1142 (III), 738 (IV)	6.48–8.22 (m, 14H, arom. H), 11.32 (s, 2H, 2NH), 12.20 (s, 2H, 2NH)
FTB	79.2	226 ± 2	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ (414.5)	413.1	Calculado C, 52.16, H, 3.40, N, 13.52, S, 15.47 Obtenido C, 51.97 H, 3.35, N, 13.55, S, 15.32	v 3271 (NH), 1667 (C=O), 1518 (I), 1237 (II), 1073 (III), 752 (IV)	6.45–8.13 (m, 10H, arom. H), 11.21 (s, 2H, 2NH), 12.11 (s, 2H, 2NH)

En el espectro ^1H NMR de ambos compuestos, se observaron 3 grupos principales de señales; se encontraron dos singletes intercambiables en D_2O que fueron asignados a protones de NH y un multiplete correspondiente a los protones aromáticos. La señal más desblindada se obtuvo a $\delta=12,20$ y 12.11 ppm para BTB y FTB, respectivamente, que se asignaron a los protones N (3) H y N (4) H. Este corrimiento químico tan alto puede ser atribuido a la formación de puentes de hidrógeno [1-3]. Este hecho fue demostrado por un análisis de correlación de δ NH en DMSO- d_6 vs. σ Hammett y por adición de europio (III) en CDCl_3 [4]. La señal asignada a los protones N (1)H y N (2)H se encuentran en $\delta=11.32$ ppm y en $\delta=11.21$ ppm para BTB y FTB, respectivamente. La presencia de señales correspondientes a 2 protones NH confirma la formación de las

bis-tioureas. Entre $\delta = 8.3$ ppm y 6 ppm se encontró el multiplete asignado a los protones aromáticos en ambos compuestos.

4.2.2 Optimización de la composición de la membrana

Es bien conocido que la sensibilidad y la selectividad obtenida para un ISE con un ionóforo dado depende significativamente de la composición de la membrana, la naturaleza del plastificante y los aditivos utilizados [5, 6]. Para lograr obtener una composición de la membrana con buenas características de respuesta, se investigaron varias proporciones de plastificantes e ionóforos (BTB y FTB). La adición de pequeñas cantidades de aditivo lipofílico aniónico (KpCIPB) mejoró considerablemente la respuesta potenciométrica de las membranas.

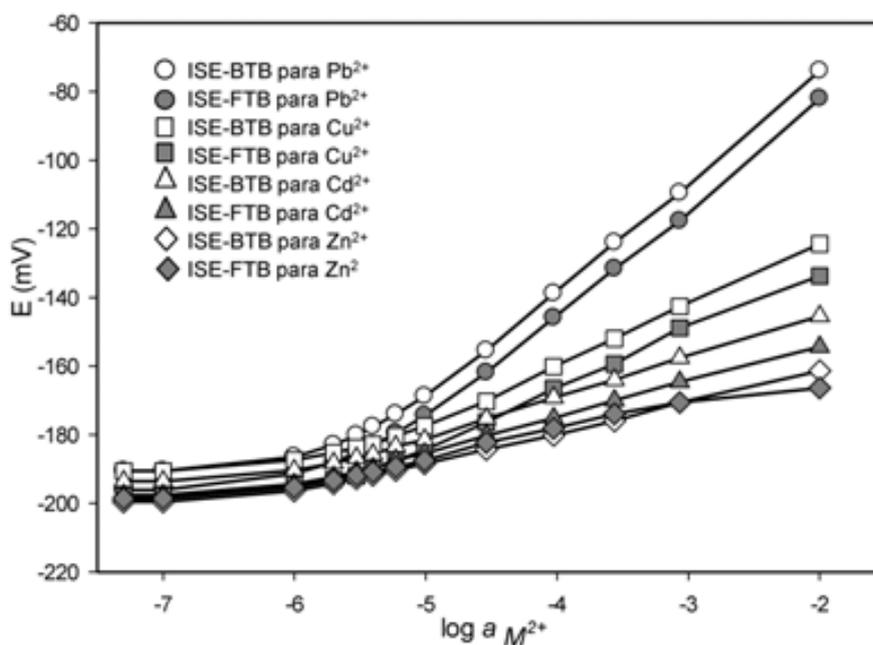


Figura 4.2. Respuesta de los ISEs basados en BTB y FTB a iones Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+} .

Entre las diferentes proporciones estudiadas (Tabla 3.2), la membrana que contiene un 33.0% de PVC, 61.5% DOS, 0.5% KpCIPB y 5.0% BTB exhibió la mejor respuesta Nernstiana. También el sensor 4, en el que se empleó 8% de BTB mostró muy buena respuesta, pero fue descartado por la presencia de una interferencia apreciable a ion

potasio, quizá debido a la alta concentración de aditivo iónico KpCIPB utilizado. Para el ionóforo FTB el mejor resultado se obtuvo con 33.0% de PVC, 64.7% DOS, 0.3% KpCIPB y 2.0% FTB.

Las membranas mostraron una clara respuesta primaria a Pb (II); esto se pudo demostrar con calibraciones independientes a Cu (II), Cd (II), Zn (II) y Pb (II) (ver Figura 4.2). Las mediciones se realizaron en las mismas condiciones y después de acondicionar los electrodos en disoluciones de los iones correspondientes. Las dos membranas optimizadas mostraron respuesta Nernstiana, la que contiene al ionóforo BTB con una sensibilidad de 31.5 ± 1.6 mV /dec de 4.0×10^{-6} a 1.0×10^{-2} M de Pb^{2+} , y la membrana basada en FTB de 30.0 ± 1.3 mV / dec de 5.0×10^{-6} a 1.0×10^{-2} M de Pb^{2+} .

4.2.3 Características de respuesta

Los dos ISEs propuestos han mostrado ser muy sensibles a Pb (II) con respecto a los otros metales de transición ensayados, por lo tanto, la respuesta de los electrodos se estudió con respecto a este metal. Los parámetros analíticos de los ISEs evaluados son los siguientes: la selectividad, el tiempo de respuesta, la sensibilidad, el tiempo de vida, el rango lineal de concentración y el pH de trabajo.

Para las aplicaciones analíticas, especialmente para sistemas automatizados, el tiempo de respuesta de un sensor es una característica muy importante. La Figura 4.3 muestra la respuesta transitoria de los dos ISEs propuestos, este experimento se realizó para cuatro adiciones sucesivas incrementando una década la concentración de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ desde 1.0×10^{-6} hasta 1.0×10^{-3} M con una disolución tampón de acético/acetato de $\text{pK}_a = 4.76$ (~ 25 °C) como disolución de fondo. La respuesta observada para los cambios de concentración mostró el perfil exponencial típico en todos los casos. El tiempo de respuesta ($T_{90\%}$) para los dos electrodos propuestos fue de 14 s en un amplio rango de concentraciones (1.0×10^{-5} a 1.0×10^{-2} M Pb^{2+}) y de 22 s para 1.0×10^{-6} M Pb^{2+} .

El efecto del pH sobre la respuesta de los dos electrodos obtenidos se avaluó para dos disoluciones de Pb (II) de concentración 1.0×10^{-3} y 1.0×10^{-4} M, como se muestra en la

Figura 4.4. La diferencia entre los potenciales obtenidos para cada valor de pH representa la sensibilidad del ISE, este estudio mostró el rango de pH en el que la sensibilidad se mantiene en un valor constante y cercano a los 30 mV/dec; fue de 2.6 a 6.8 unidades de pH para membrana BTB y de 2.4 a 6.0 unidades de pH para la membrana FTB. A pH más altos la disminución de la sensibilidad cayó a 23mV/dec aproximadamente para ambas membranas, este efecto puede estar relacionado con la hidrólisis del Pb^{2+} . La caída de la sensibilidad a $pH < 2.6$ se puede atribuir a la protonación de los ligandos en la fase membrana, lo que provoca una pérdida de su capacidad para formar complejos con el analito. El pH seleccionado para las determinaciones fue de 4, empleando tampón acético/acetato.

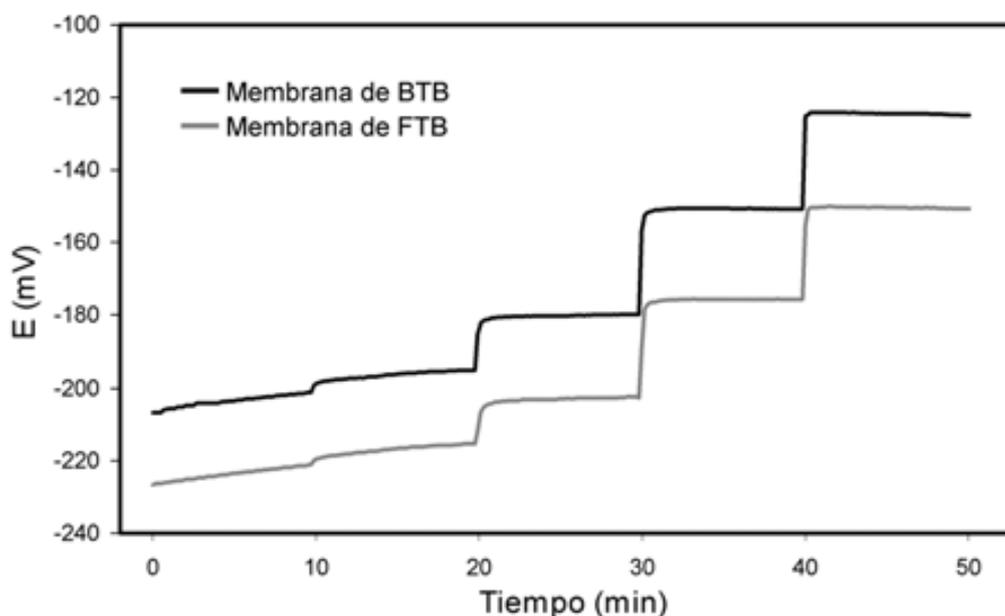


Figura 4.3. Respuesta dinámica de los ISEs basados en BTB y FTB. Respuesta correspondiente a saltos de cuatro décadas de concentración.

Con el objetivo de investigar la selectividad de los dos ISEs propuestos, considerándola una de las características más relevantes para una futura aplicación de estos sensores en lenguas electrónicas, sus respuestas se estudiaron en presencia de varios iones interferentes, según el método de la interferencia fija. Los valores resultantes de las experiencias se ilustran en la Figura 4.5. Como puede verse, para la membrana que contiene BTB, los iones $Cu(II)$ y $Cd(II)$ tienen coeficientes de selectividad que superan el valor de 1.0×10^{-2} , lo que significa que estos dos iones provocan una interferencia reversible a la membrana selectiva a Pb^{2+} . Sin embargo, hay que señalar que la

membrana se ve mucho más afectada por los iones Cu (II) como interferentes. En la Figura 4.6, se muestra el diagrama de superficie de respuesta obtenido para calibraciones cruzadas con la membrana de BTB y para diferentes concentraciones del ion principal Pb^{2+} y del ion interferente Cu^{2+} . Se puede observar un incremento sustancial de la interferencia del Cu^{2+} con el aumento de su concentración. Para los otros iones metálicos estudiados, los coeficientes de selectividad oscilan alrededor de 1.0×10^{-3} o son menores, indicando que no afectan significativamente la selectividad de la membrana.

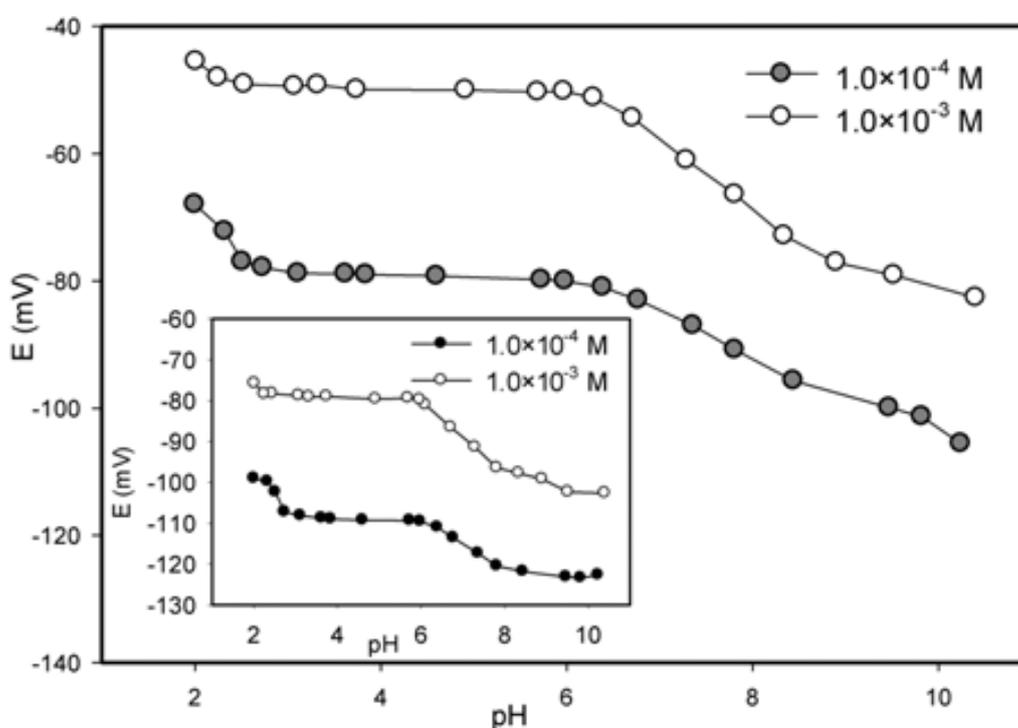


Figura 4.4. Influencia del pH en la respuesta de un ISE-Pb(II) basado en membrana de BTB, en el gráfico insertado para la membrana de FTB. Condiciones experimentales: disolución de Pb^{2+} de concentración $1.0 \times 10^{-4} M$ y $1.0 \times 10^{-4} M$ a $pH = 10$ en NaOH, acidificada sucesivamente con HNO_3 .

Para la membrana basada en el ionóforo FTB, los coeficientes de selectividad potenciométricos de los iones que mostraron ser más interferentes (Cu (II) y Cd (II)) son ligeramente inferiores con respecto a la membrana de BTB. Sin embargo, para los otros iones la interferencia no es significativa como en el caso anterior.

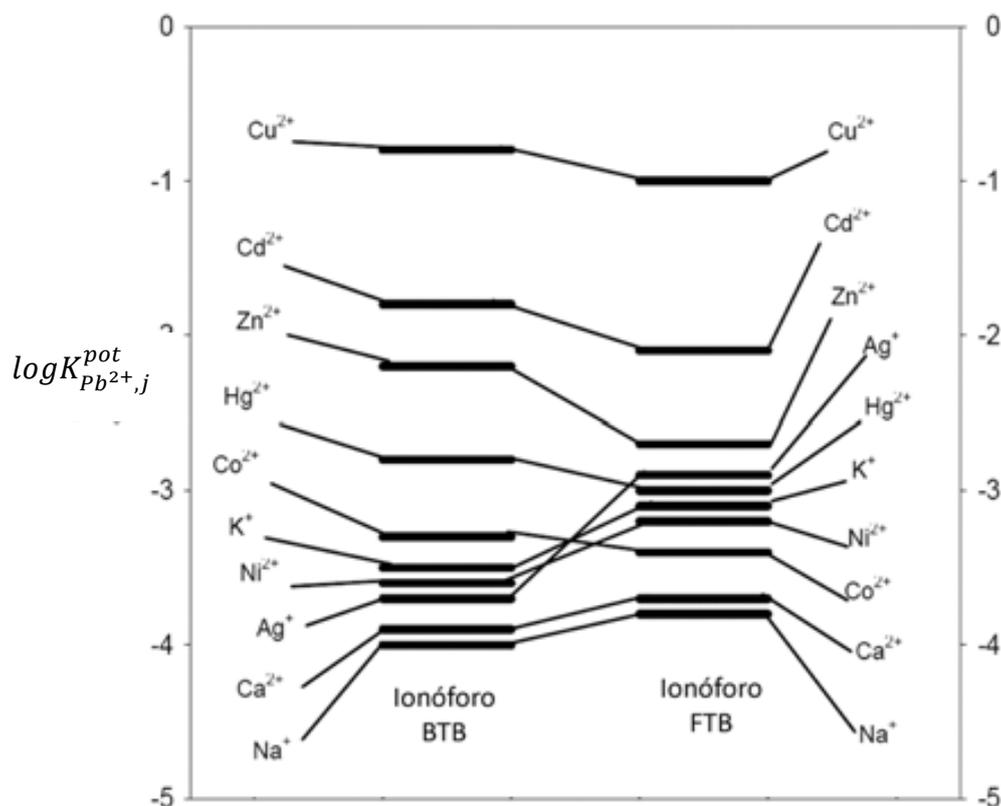


Figura 4.5. Patrón de selectividad para los ISEs-Pb(II) basados en los ionóforos BTB y FTB.

El tiempo de vida útil de los electrodos se determinó mediante la comparación de parámetros determinados de las curvas de calibración (límite de detección (LD) y la sensibilidad) obtenidas al pH óptimo y durante varios días consecutivos. Los electrodos de membrana BTB se ensayaron durante un período de 10 semanas para determinar su estabilidad. Durante este tiempo los electrodos se usaron a diario, los valores de la reproducibilidad de la sensibilidad y del LD fueron de 31.5 ± 1.6 mV/dec y $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M respectivamente. Por otro lado, los electrodos de membrana basada en FTB se ensayaron durante 14 semanas. Durante este tiempo los parámetros analíticos han mostrado ser también muy reproducibles, con valores de la pendiente y el LD de 30.0 ± 1.3 mV/dec y $(1.9 \pm 0.9) \times 10^{-6}$ M, respectivamente.

También se determinó la estabilidad y la reproducibilidad de la respuesta de los electrodos. La comparación de la diferencia de potencial de 20 mediciones realizadas en las mismas condiciones, a 1.0×10^{-3} M y 1.0×10^{-4} M de Pb^{2+} , produjo valores de desviaciones estándar de -151.8 ± 0.7 y -120.6 ± 0.8 mV respectivamente, para los ISEs

de membrana de BTB y para los ISEs de membrana de FTB de -176.3 ± 0.6 y -146.4 ± 0.7 mV respectivamente.

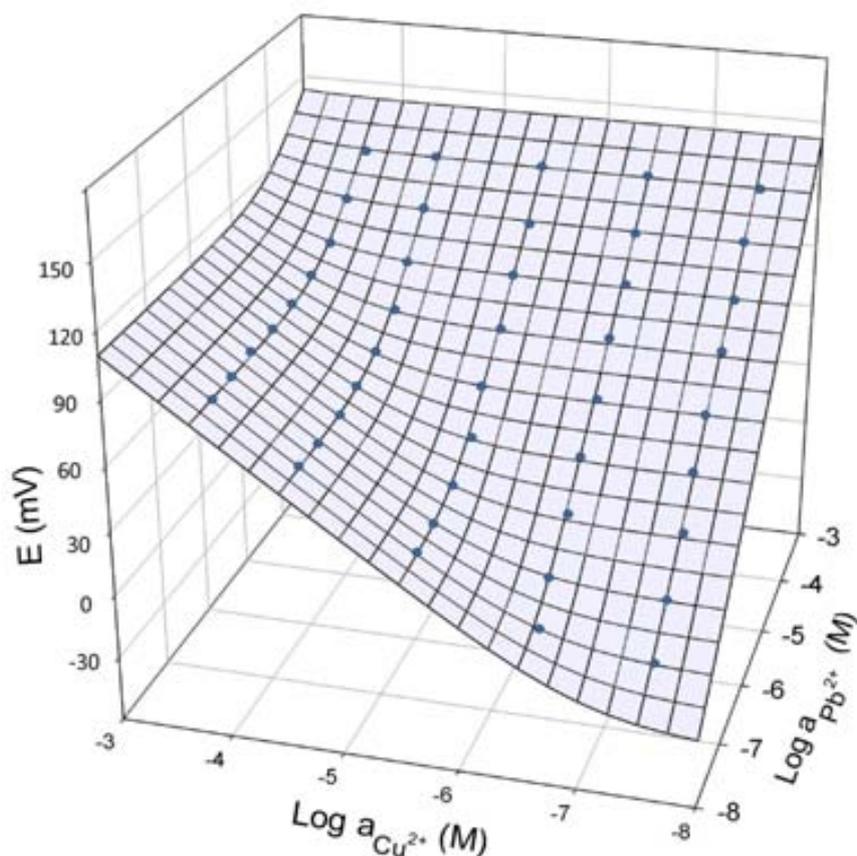


Figura 4.6. Superficie de respuesta obtenida para un ISE-Pb(II) basado en BTB, calibraciones obtenidas para mezclas de Cu²⁺ y Pb²⁺.

En la Tabla 4.2 se muestran con fines comparativos las principales características de respuesta (rango lineal, límite de detección, tiempo de vida, interferencia y la sensibilidad) de algunos electrodos selectivos a plomo reportados en la literatura, así como de los dos ISEs propuestos en este trabajo. Como se observa, los electrodos selectivos a plomo propuestos son comparables o mejores que muchos de los descritos, especialmente en parámetros analíticos como el intervalo de concentración, el coeficiente de selectividad para los iones potencialmente interferentes; además tienen sensibilidad similar y un LD aceptable.

Si comparamos sólo los dos sensores propuestos entre ellos, se observan características analíticas muy similares, tales como: el límite de detección, la sensibilidad y el rango de respuesta lineal; también los valores de la precisión y el tiempo de respuesta son

equivalentes para los dos. Las únicas características a diferenciar son la mejor selectividad y mayor tiempo de vida útil del electrodo de FTB.

Tabla 4.2. Comparación de las características de respuesta para diferentes ISEs de Pb(II).

Referencia	Sensibilidad (mV/dec)	LD (M)	Rango lineal (M)	Tiempo de vida (semanas)	Interferentes con $\log K_{Pb^{2+},j}^{pot} \geq -2$
ISE (BTB)	31.5±1.6	(1.6±0.3)×10 ⁻⁶	4.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²	10	Cu ²⁺ , Cd ²⁺
ISE (FTB)	30.0±1.3	(1.9±0.9)×10 ⁻⁶	5.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻²	14	Cu ²⁺
[7]	29.7±0.6	2.0×10 ⁻⁶	3.6×10 ⁻⁶ -1.3×10 ⁻²	8	Ba ²⁺
[8]	32.5	5.0×10 ⁻⁷	1.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻¹	>8	Hg ²⁺ , Tl ⁺ , Ag ⁺
[9]	29.1	3.0×10 ⁻⁶	5.0×10 ⁻⁶ - 1.0×10 ⁻¹	>24	Cu ²⁺ , Cd ²⁺
[10]	33.1	1.8×10 ⁻⁵	5.8×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻²	8	Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Ca ²⁺ , Hg ²⁺
[11]	28.6	2.0×10 ⁻⁶	3.1×10 ⁻⁶ - 6.3×10 ⁻³	8	Hg ²⁺
[12]	29.5±0.4	3.2×10 ⁻⁷	7.7×10 ⁻⁷ - 1.0×10 ⁻¹	10	Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Fe ²⁺
[13]	28.3	2.8×10 ⁻⁵	5.0×10 ⁻⁵ - 1.0×10 ⁻²	8	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , K ⁺ , Ag ⁺ , Mn ²⁺ , Tl ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺ , Sr ²⁺
[14]	29.2	1.0×10 ⁻⁵	2.0×10 ⁻⁵ - 5.0×10 ⁻²	8	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Na ⁺ , Ag ⁺ , Mg ²⁺

4.2.4 Aplicación de los sensores propuestos a la determinación de plomo en suelos

Los dos sensores de Pb (II) propuestos funcionan muy bien en condiciones de laboratorio. Para evaluar su aplicabilidad a muestras reales se realizaron determinaciones de plomo en 6 muestras de suelos, recolectadas cerca de carreteras localizadas a las afueras de la ciudad de Barcelona. Los resultados se validaron frente a un método de referencia, (Plasma Acoplado Inductivamente con Espectrometría de Masas, ICP-MS).

El contenido de plomo con los ISEs se determinó mediante la técnica de adición estándar. El pH de las muestras se ajustó a pH 4 con tampón acético/acetato después del tratamiento realizado para extraer el contenido metálico. La concentración y el volumen de patrón añadidos a las muestras se calcularon por el método propuesto por Horvai y Pungor [15], con el objetivo de lograr una precisión adecuada en el análisis. El contenido de plomo añadido a las muestras fue de entre 0.5 y 1 veces la concentración de analito en la muestra, logrando de este modo un cambio de potencial adecuado.

Tabla 4.3. Determinación de la concentración de plomo en muestras de suelo empleando los ISEs propuestos y su comparación con el método de referencia (ICP-MS).

Muestra	ICP-MS (mg/kg)	ISEs-adición estándar	
		BTB (mg/kg)	FTB (mg/kg)
1	18.8±0.6	17.9±0.5	18.6±0.6
2	19.7±0.6	19.0±0.7	20.1±0.6
3	20.9±0.6	21.2±0.7	21.1±0.7
4	16.4±0.5	15.9±0.6	16.2±0.5
5	12.8±0.4	12.5±0.6	13.0±0.5
6	36.1±1.0	35.8±0.8	35.4±0.9

Para evaluar la fiabilidad de los resultados, cada muestra se analizó por triplicado usando ambos métodos. Los resultados de los análisis realizados se muestran en la Tabla 4.3. Como puede observarse, los valores de concentración de los extractos estaban en el rango inferior de respuesta lineal de los sensores propuestos. Las precisiones obtenidas se encuentran en el mismo intervalo para ambos métodos, y los dos ISEs utilizados.

Los resultados obtenidos por el método de referencia y los dos ISEs propuestos se compararon estadísticamente, obteniéndose resultados satisfactorios. Los resultados del análisis de regresión lineal para la comparación entre los métodos de potenciometría directa con el ISE de membrana de BTB frente a ICP-MS produjo una correlación de $R^2 = 0.999$ ($n = 6$) y una ecuación de la recta de $y = (1.01 \pm 0.07) x - (0.57 \pm 1.56)$. Para el caso de la regresión lineal de la membrana de FTB se obtuvo una correlación de $R^2 = 0.999$ ($n = 6$) y una ecuación de la recta de $y = (0.97 \pm 0.05) x + (0.69 \pm 1.06)$. Como puede verse, las dos líneas de regresión ajustadas fueron indistinguibles de la teórica (línea de comparación $y = x$).

Los resultados también fueron comparados con la prueba t de Student para muestras apareadas; los valores del estadístico t calculados fueron: $t = 2.36$ para la membrana de BTB vs. ICP-MS y $t = 0.31$ para la membrana de FTB vs. ICP-MS. En ambos casos, los valores de t estaban por debajo del valor crítico tabulado de $t^* = 2.57$ (para 5 grados de libertad y 95% de nivel de confianza), lo que representa una evidencia de que no existen

diferencias significativas entre los resultados obtenidos con los ISEs propuestos y el método de referencia.

4.3 Lengua Electrónica potenciométrica para la resolución de mezclas de sulfuro y perclorato

En este estudio se desea construir una lengua electrónica potenciométrica basada en sensores que emplean como elementos de reconocimiento diferentes metalofalocianinas para determinar sulfuro y perclorato en muestras ambientales. Algunas de las membranas empleadas en esta aplicación, tienen la particularidad de que el ionóforo se encuentra unido mediante un enlace covalente a la matriz polimérica, con el objetivo de favorecer su fijación permanente a la membrana de detección [16]. Las principales ventajas de esta estrategia es favorecer la estabilidad de la respuesta de la membrana y el tiempo de vida del sensor.

4.3.1 Composición de las membranas poliméricas

Los sensores empleados en la lengua electrónica se construyeron en el Laboratorio de Analítica del Centro Nacional de Investigaciones de Dokki en el Cairo, Egipto según la metodología descrita en [17]. La Tabla 4.4 muestra la composición de las membranas empleadas en la ET.

Tabla 4.4. Composición de las membranas de los ISEs empleados en la ET.

Membrana	Ion primario	Ionóforo (%)	Plastificante (%)		PVC (%)	Aditivo (%)		
			<i>o</i> -NPOE	DOP		OA	CTMAB	
P1	ClO ₄ ⁻	Co-Pc-PAA	9.30	-	57.80	27.77	2.60	2.60
S1	S ²⁻	Zn-Pc	3.22	64.52	-	32.26	-	-
S2	S ²⁻	Ce-ABPAH-PAA	4.76	63.49	-	31.75	-	-
S3	S ²⁻	Ga-Pc	4.16	-	64.59	31.25	-	-
G	Genérico	T12A –SDBS	12.50	62.50	-	25.00	-	-

4.3.2 Caracterización de los ISEs empleados en la ET

La caracterización de los ISEs que componen la matriz de sensores se realizó para construir el modelo de respuesta empleando ANN y lograr la determinación simultánea de S^{2-} y ClO_4^- . La Figura 4.7 muestra la respuesta de los sensores utilizados para su respectivo ion primario. Las curvas de calibración presentadas en la figura se obtuvieron con una disolución de acetato de litio 0.05 M como fondo salino, para ajustar la fuerza iónica de la solución.

La Tabla 4.5 muestra las principales características de respuesta obtenidas, los ISEs (P1, S1, S2 y S3) mostraron una sensibilidad cercana al valor teórico determinados por la ecuación de Nernst. El sensor Genérico presentó una sensibilidad super-Nernstiana hacia los iones S^{2-} , probablemente, debido a la respuesta mezclada de S^{2-} y HS^- . El límite de detección de todos los sensores fue inferior a 1.3×10^{-5} M. La reproducibilidad determinada para todos los electrodos estuvo entre 0.96 y 0.98 % RSD de la pendiente determinada para una serie de calibraciones realizadas en 5 días sucesivos.

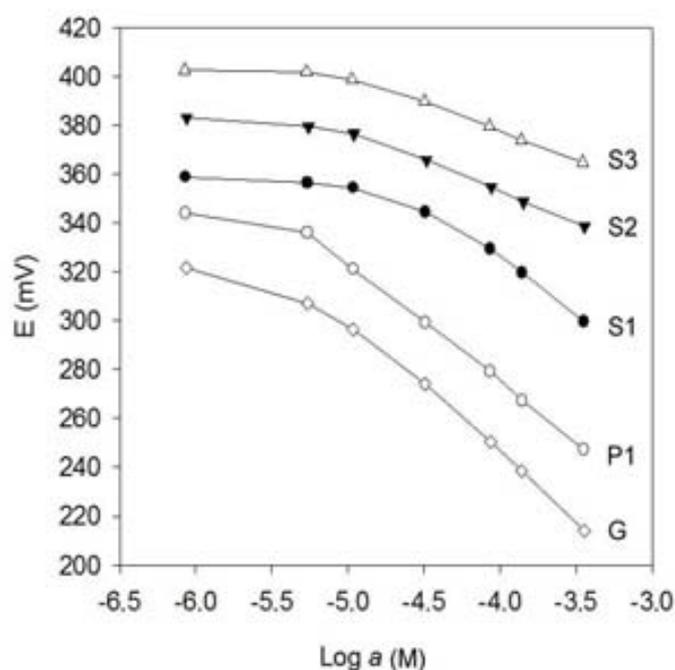


Figura 4.7. Respuesta de los ISEs que componen la matriz de sensores a sus respectivos iones primarios.

La existencia de respuesta cruzada es una de las premisas fundamentales para la construcción de una ET. Los valores de los coeficientes de selectividad determinados están resumidos en la Tabla 4.5. De acuerdo a los $K_{i,j}^{pot}$ obtenidos el ISE-P1 y ISE-S1 tienen respuesta considerable a los dos iones, lo mismo pasa con el ISE-Genérico. Sin embargo, los ISEs S2 y S3 tuvieron una marcada selectividad a sulfuro.

El tiempo de vida de los ISEs, se determinó, a través, del cálculo de la estabilidad de la pendiente y el límite de detección, fue de 8 a 10 semanas de mediciones continuas y prácticamente el doble para los dos ISEs que contienen el ionóforo unido covalentemente a la matriz polimérica (S2 y P1).

Tabla 4.5. Características de respuesta de los ISEs que forman la matriz de sensores.

ISEs	Pendiente (mV/década)	LD (mol·L ⁻¹)	log $K_{i,j}^{pot}$	
			ClO ₄ ⁻ ion interferente	S ²⁻ ion interferente
P1	-57.7	5.2·10 ⁻⁶	-	-1.96
S1	-33.3	1.3·10 ⁻⁵	-2.68	-
S2	-30.9	9.8·10 ⁻⁶	-3.23	-
S3	-28.9	9.9·10 ⁻⁶	-3.75	-
G	-44.3 (a)	8.3×10 ⁻⁶	1.13	-
	-60.1 (b)	7.5×10 ⁻⁶	-	1.25

Ion primario considerado ^(a) S²⁻, ^(b) ClO₄⁻

4.3.3 Construcción del modelo de respuesta con ANN

Para la construcción del modelo de respuesta mediante ANN se emplearon 79 muestras (mezclas de los dos iones considerados S²⁻ y ClO₄⁻), obtenidas mediante microadiciones acumulativas y cubriendo el rango de concentración de 5.0×10⁻⁶ M a 3.3×10⁻⁴ M para los dos iones. La Figura 3.14 muestra el diseño experimental empleado para la preparación de las disoluciones estándar empleadas en la calibración cruzada. Se emplearon 59 muestras para el entrenamiento del modelo y 20 para la validación externa del mismo.

El proceso de optimización de la arquitectura de la ANN se realizó aplicando la metodología descrita en el epígrafe 3.6. El mejor modelo se obtuvo con 5 neuronas en la capa de entrada (5 ISEs de la matriz), 8 neuronas en la capa oculta y 2 en la de salida. Las funciones de transferencias empleadas fueron: *Tansig* y *purelin* para las capas ocultas y de salida, respectivamente. La Figura 4.8 muestra el resumen de la selección del número de neuronas para las dos funciones de transferencia seleccionadas.

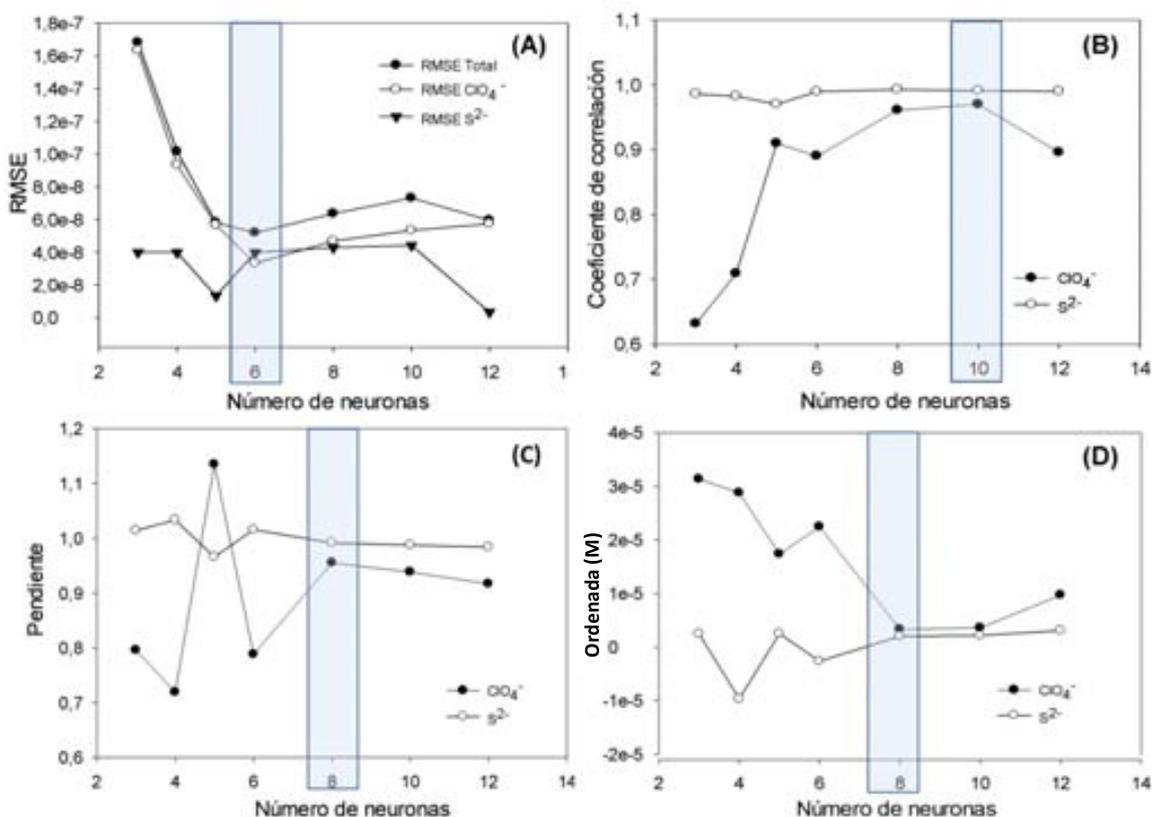


Figura 4.8. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN: (A) valores de RMSE; (B) coeficiente de correlación; (C) pendiente y (D) ordenada.

Con las condiciones seleccionadas se obtuvo un modelo muy bien ajustado, este hecho se pudo corroborar con los bajos valores de RMSE obtenidos. El análisis de regresión para las muestras de validación externa (Figura 4.9), produjo resultados satisfactorios: coeficientes de correlación significativos, con los valores de pendiente y ordenada en el origen ideales, dentro del intervalo de confianza obtenido, para la predicción de la concentración de S^{2-} y de ClO_4^- (Los intervalos de incertidumbres se calcularon para un 95 % de confianza).

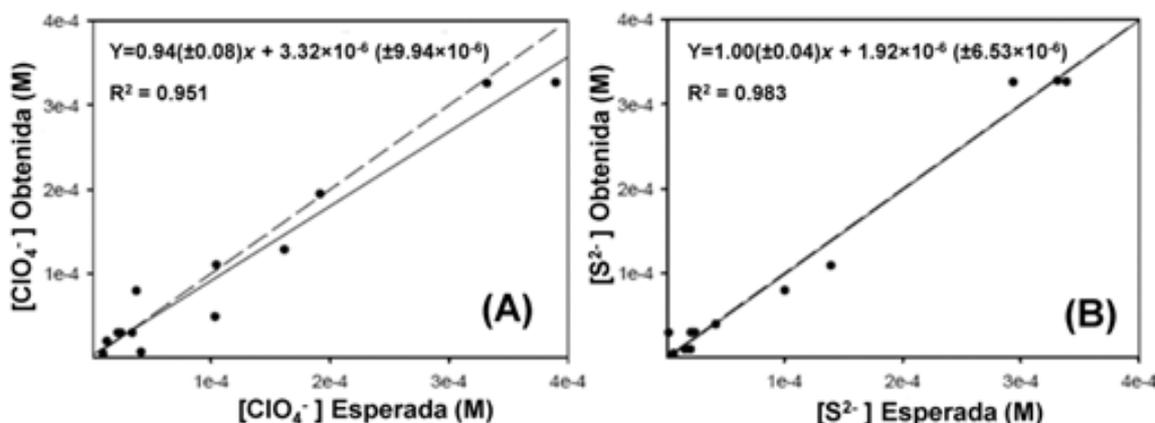


Figura 4.9. Desempeño del modelo de ANN optimizado para el subconjunto de validación externa. (A) ion perclorato y (B) ion sulfuro. La línea discontinua corresponde a la recta ideal y la sólida a la regresión realizada.

4.3.4 Aplicación a muestras reales

Para evaluar el desempeño de la matriz de sensores, seis muestras de aguas residuales con concentraciones iniciales de 0.3×10^{-6} M a 3.4×10^{-5} M de S^{2-} y ClO_4^- fueron dopadas con disoluciones patrones de los dos iones de 0.01 M, hasta obtener una concentración máxima de 5.0×10^{-4} M para ambos iones. Las concentraciones de los analitos en las muestras dopadas fueron determinadas con modelo de respuesta optimizado previamente con la ANN. La Figura 4.10 muestra el error relativo obtenido para las muestras de aguas residuales dopadas.

Las primeras dos filas $\text{ET}(\text{S}^{2-})$ y $\text{ET}(\text{ClO}_4^-)$ corresponde a los resultados obtenidos con el método propuesto (ET), los otros se obtuvieron por el método convencional de interpolación en la curva de calibración para un electrodo individual. Como puede verse, los errores obtenidos para la determinación de los dos iones de interés con la ET, se encuentran alrededor de un 5% y siempre fueron menores que el resultado obtenido con el método convencional, utilizando solo el electrodo con respuesta primaria al analito. La determinación de la concentración de perclorato con la ET resultó menos precisa que la determinación de sulfuro, y la razón podría ser atribuida a la presencia de un solo electrodo en la matriz con respuesta primaria a perclorato.

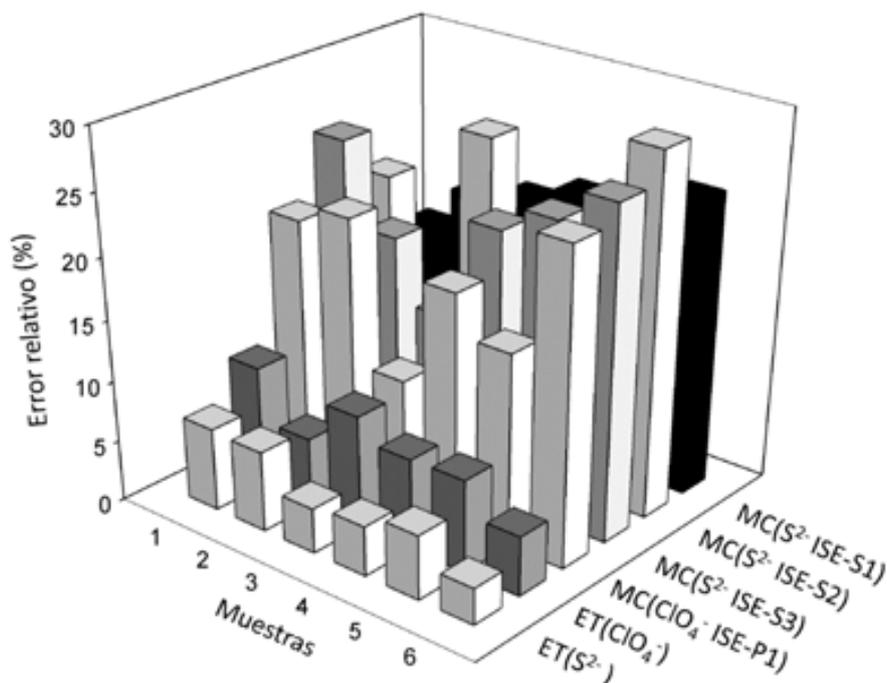


Figura 4.10. Error relativo obtenido para la determinación simultánea de sulfuro y perclorato en las muestras sintéticas, por el método propuesto basado en una ET y por el método de potenciometría estándar con los ISEs individuales.

Para juzgar la bondad de los resultados obtenidos empleando la metodología propuesta (ET), se realizó una prueba t de Student para muestras pareadas. Los valores del estadístico t calculados fueron: $t = 0.11$ para el ion ClO_4^- y $t = 1.52$ para el ion S^{2-} . En ambos casos, los estadísticos t calculados estuvieron claramente por debajo del valor crítico tabulado de $t^* = 2.57$ para 5 grados de libertad y 95 % de nivel de confianza, lo que representa una evidencia de que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos con la matriz de sensores y la concentración nominal de las muestras sintéticas.

4.4 Construcción y caracterización de los electrodos selectivos a iones para las determinaciones en batch

En la presente tesis doctoral, se desarrollaron dos aplicaciones basadas en lenguas electrónicas formadas por sensores potenciométricos de membrana polimérica y de configuración convencional. Los 10 ISEs empleados en estas dos aplicaciones se construyeron según el procedimiento descrito en el epígrafe 3.3.1.

4.4.1 Caracterización de los ISEs de configuración convencional para mediciones en batch

Después de la construcción de los ISEs, se realizó una caracterización completa, de esta manera se determinaron los principales parámetros analíticos: intervalo de concentración, sensibilidad, selectividad y límite de detección. Los resultados se resumen en la Tabla 4.6 y 4.7.

Todos los ISEs presentaron sensibilidad Nernstiana y en todos los casos fue superior para el ion primario. El rango de concentración lineal de todos los sensores de forma general estuvo entre 1.0×10^{-6} y 1.0×10^{-2} M, aunque el ISE Genérico (2) mostró un intervalo de concentración más amplio (de 6.2×10^{-7} a 1.0×10^{-1} M). Cuatro electrodos presentaron límites de detección cerca de 1.0×10^{-7} M: Pb (1), Pb (2), Genérico (2) y Cu (1) y los otros valores cercanos a 1.0×10^{-6} M.

Tabla 4.6. Características de respuesta de los ISEs de configuración convencional.

No	Ion primario	Pb ²⁺		Zn ²⁺		Cd ²⁺		Cu ²⁺		LD del ion primario (M)
		Pendiente (mV/dec)	Rango (M)							
1	Pb ²⁺ (1)	29.79±2.4	1.3×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	7.49±2.1	6.3×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	12.78±3.4	5.5×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	28.87±3.4	1.2×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	$(3.62 \pm 1.1) \times 10^{-7}$
2	Pb ²⁺ (2)	30.42±3.3	3.0×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	5.40±3.2	5.6×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	14.48±2.2	4.7×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	14.11±3.1	4.1×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	$(1.86 \pm 0.9) \times 10^{-7}$
3	Pb ²⁺ (4)	29.91±3.7	4.1×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	4.56±3.4	2.4×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	5.34±3.3	9.3×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	27.74±2.9	6.0×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	$(1.10 \pm 1.9) \times 10^{-6}$
4	Zn ²⁺ (1)	27.13±3.8	7.2×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	34.48±4.2	3.2×10^{-6} ; 1.0×10^{-1}	25.44±4.1	4.2×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	29.01±3.0	4.2×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	$(1.17 \pm 1.0) \times 10^{-6}$
5	Zn ²⁺ (2)	21.82±4.3	5.2×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	30.21±3.3	1.4×10^{-5} ; 1.0×10^{-1}	10.21±3.6	5.0×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	15.09±3.1	6.3×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	$(9.07 \pm 1.2) \times 10^{-6}$
6	Cd ²⁺	11.31±3.0	6.1×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	0.79±3.2	1.3×10^{-4} ; 1.0×10^{-2}	29.15±2.7	0.7×10^{-5} ; 1.0×10^{-1}	18.27±3.9	5.2×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	$(7.16 \pm 1.4) \times 10^{-6}$
7	Cu ²⁺ (1)	20.73±4.1	6.4×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	7.87±4.0	8.2×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	7.56±4.1	1.3×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	29.95±2.8	0.8×10^{-6} ; 1.0×10^{-1}	$(1.22 \pm 1.3) \times 10^{-7}$
8	Genérico(1)	28.3±3.1	1.7×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	12.8±3.3	8.8×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	19.6±3.5	6.5×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	21.9±3.2	5.8×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	$(2.53 \pm 2.1) \times 10^{-6}$ (a)
9	Genérico(2)	21.1±2.8	9.7×10^{-7} ; 1.0×10^{-1}	11.53±2.9	1.8×10^{-6} ; 1.0×10^{-1}	15.8±4.0	3.4×10^{-6} ; 1.0×10^{-1}	24.8±3.8	6.2×10^{-7} ; 1.0×10^{-1}	$(4.19 \pm 1.9) \times 10^{-7}$ (b)
10	Genérico(3)	24.8±2.7	0.7×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	27.7±2.4	8.3×10^{-6} ; 9.6×10^{-3}	27.9±2.8	1.4×10^{-5} ; 1.0×10^{-2}	20.4±2.1	5.9×10^{-6} ; 1.0×10^{-2}	$(3.0 \pm 1.2) \times 10^{-6}$ (c)

Ion primario considerado^(a) (Pb²⁺), ^(b) (Cu²⁺), ^(c) (Zn²⁺)

La Tabla 4.7 presenta los resultados de la determinación de los coeficientes de selectividad de los sensores utilizados. Como se puede ver, una parte importante de las membranas utilizadas, presentan respuesta cruzada a uno o más iones metálicos; este hecho se puede deducir del valor de los logaritmos de los coeficientes obtenidos, que están alrededor de -1.5 o superior. Esto implica que para su uso se requiera de procedimientos especiales para minimizar el error de la interferencia, ya sea separación química, enmascaramiento o tratamientos con ET.

Tabla 4.7. Logaritmo de los coeficientes de selectividad potenciométricos de los ISEs de configuración convencional.

Sensor e ion primario	Ion interferente			
	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺
Pb ²⁺ (1)	-	-3.5	-3.6	+0.7
Pb ²⁺ (2)	-	-3.4	-2.9	-1.4
Pb ²⁺ (4)	-	-2.2	-1.8	-0.8
Zn ²⁺ (1)	-1.3	-	-2.8	-1.4
Zn ²⁺ (2)	-1.2	-	-0.5	-1.2
Cd ²⁺	-2.4	-1.9	-	-2.1
Cu ²⁺ (1)	-0.8	-2.2	-4.3	-
Genérico (1)	-	-1.8	-1.5	-1.1
Genérico (2)	-2.1	-1.4	-2.4	-
Genérico (3)	-0.7	-	-0.4	-0.9

4.5 Determinación simultánea de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras de suelo empleando una matriz de sensores potenciométricos y redes neuronales artificiales

En este trabajo se desarrolló una lengua electrónica potenciométrica para la determinación simultánea de trazas de metales pesados: (Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II)) en muestras de suelos. Para ello se utilizaron los primeros 9 ISEs que se muestran en la Tabla 4.6, y que, según la caracterización realizada, presentaron respuesta cruzada a los cuatro iones de interés. Este efecto de interferencia ocasionaría notables perjuicios en

una determinación convencional, sobre todo en análisis de muestras con matrices complejas como el análisis de suelos; sin embargo, la respuesta cruzada se puede aprovechar en aplicaciones con ETs, como fuente de información multivariada que permite caracterizar con mayor precisión y exactitud la composición de muestras complejas.

4.5.1 Construcción del modelo de respuesta con ANN

La herramienta estadística seleccionada para el tratamiento de los datos proveniente de la ET fue las Redes Neuronales Artificiales, debido a su capacidad de procesar datos complejos. Las ANNs son conocidas por ser métodos potentes para la modelación de datos no lineales, aplicables tanto a determinaciones cuantitativas como cualitativas [18]. El intervalo de concentración seleccionado (de 1.0×10^{-7} M a 1.0×10^{-3} M) durante la modelación incluye la zona de respuesta no lineal de los sensores utilizados (concentraciones por debajo de los límites de detección de los ISEs). Esta elección se realizó para comprobar la capacidad de la ANN en la modelación del comportamiento no lineal de los datos, y al mismo tiempo para verificar la habilidad de cuantificación a niveles bajos de concentración.

La construcción del modelo de respuesta se realizó de la siguiente manera: los datos iniciales para el entrenamiento se obtuvieron a partir de 27 muestras compuestas por mezclas de los cuatro iones a determinar (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}). La composición de las muestras quedó definida a partir de un diseño factorial fraccionado, con tres niveles de concentración y cuatro factores (los cuatro iones considerados) (3^{4-1}) [19, 20]. Además, se prepararon 10 muestras sintéticas adicionales, dentro del intervalo de concentración seleccionado, definidos al azar, y se incluyeron en el subconjunto de validación externa para evaluar la habilidad predictiva del modelo. Un 30% adicional de las muestras de entrenamiento y validación externas se replicaron con el fin de estimar la precisión del método propuesto. En la Tabla 3.4 se muestra la composición de las muestras utilizadas para la construcción del modelo.

La selección de la arquitectura de la red neuronal es el primer paso en el desarrollo de un modelo numérico, sin embargo, elegir la estructura y la configuración óptimas no es simple. La estructura de la ANN para la construcción del modelo óptimo de una matriz de sensores se obtiene mediante ensayo y error. El proceso de optimización incluye la verificación de una combinación de estrategias de entrenamiento y de sus parámetros asociados: la dimensión de la capa oculta y las funciones de transferencia que se utilizan tanto las capas ocultas como en la capa de salida.

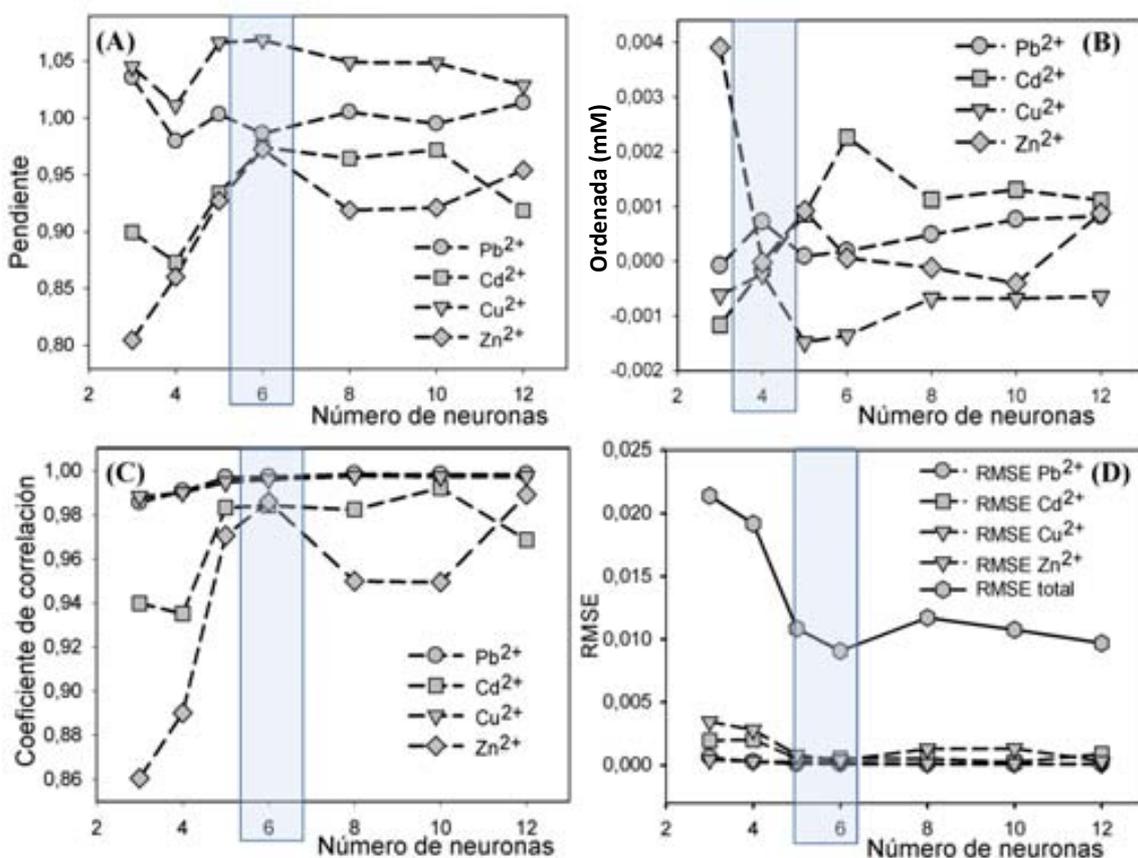


Figura 4.11. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN. (A) pendiente, (B) ordenada para la comparación entre las concentraciones obtenidas vs. esperadas, (C) coeficiente correlación y (D) valores de RMSE.

Los parámetros de la red seleccionados fueron los siguientes: el número de neuronas en la *capa de entrada* fue de 9 (igual al número de ISEs usados), el número de neuronas en la *capa de salida* fue de 4 (4 analitos a determinar), la *función de transferencia* de la capa de entrada, fue lineal (*purelin*) y se empleó una sola capa oculta. La capacidad de modelación de la ANN se examinó en términos del error cuadrático medio (RMSE) de

las concentraciones determinadas, y mediante un análisis de regresión lineal, para los valores de *concentraciones obtenidas* vs. *concentraciones esperadas* de los cuatro iones de interés.

El número de neuronas en la capa oculta, y las funciones de transferencia de la capa oculta y de salida se variaron sistemáticamente con el fin de obtener el mejor rendimiento final. Se probaron una gran cantidad de combinaciones, el número de neuronas en la capa oculta se modificó de 3 a 12, y se probaron 4 funciones de transferencia en la capa oculta y de salida (*logsig*., *tansig*., *purelin*: y *satlins*:).

La Figura 4.11 muestra un resumen de los resultados obtenidos durante la optimización de la arquitectura de la ANN. El número de neuronas en la capa oculta seleccionado fue 6 y las funciones de transferencia, *logsig* y *tansig* para la capa oculta y de salida, respectivamente.

La Figura 4.12 ilustra los resultados del modelo obtenido y la correlación entre los valores de concentración obtenidos (y) y esperados (x) para el subconjunto de validación externa de los cuatro iones individuales. Los coeficientes de correlación para las cuatro comparaciones fueron significativos, con valores muy cercanos a 1.0; al mismo tiempo, los valores de RMSE concuerdan con este hecho. La habilidad predictiva del modelo fue muy buena para todos los iones, siendo la exactitud de la respuesta obtenida adecuada con una pendiente cercana a 1.0 y una ordenada cercana a 0.0 (todos los intervalos de confianza fueron calculados para 95% de nivel de confianza). La ANN se entrenó cinco veces para comprobar si los resultados corresponden a un error mínimo local o global del sistema; en cada nueva ocasión los valores de los pesos se restablecieron al azar con el fin de que la precisión del modelo fuera fiable.

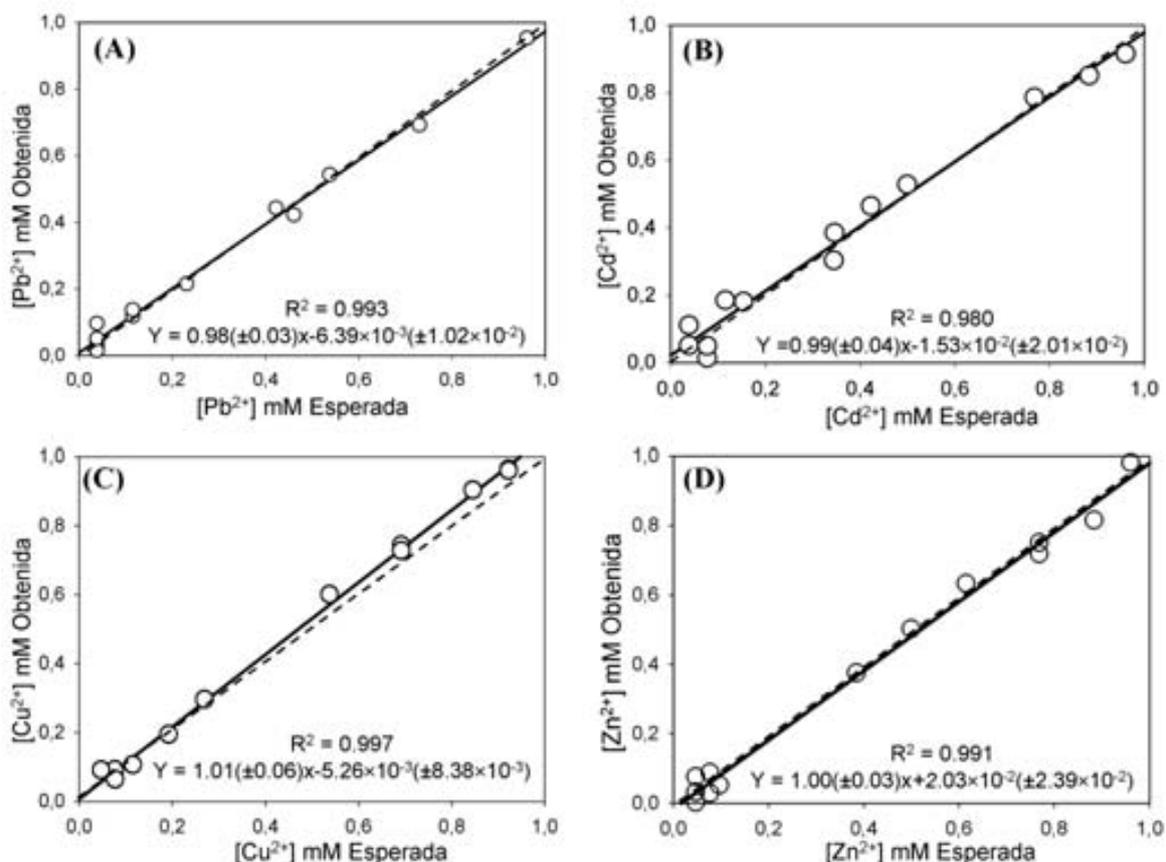


Figura 4.12. Recta de regresión comparativa para el subconjunto de validación externa con la ANN optimizada, (A) Pb^{2+} , (B) Cd^{2+} , (C) Cu^{2+} y (D) Zn^{2+} . La línea discontinua corresponde a la idealidad y la sólida a la regresión realizada. Las incertidumbres se calcularon para un nivel de confianza de 95 %.

4.5.2 Aplicación de la matriz de sensores en la determinación de metales en suelos

El sistema analítico propuesto, basado en una matriz de sensores potenciométricos y ANN como método de modelación se aplicó en la determinación simultánea de metales de transición en muestras reales. Se realizó un análisis simultáneo de Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} en 8 muestras diferentes de suelos cercanos a carreteras de las afueras de la ciudad de Barcelona. La extracción de los metales de las muestras se desarrolló según el procedimiento descrito en el epígrafe 3.8. Los resultados obtenidos con el método propuesto se validaron frente a un método de referencia, Espectrometría de Absorción Atómica con llama (FAAS).

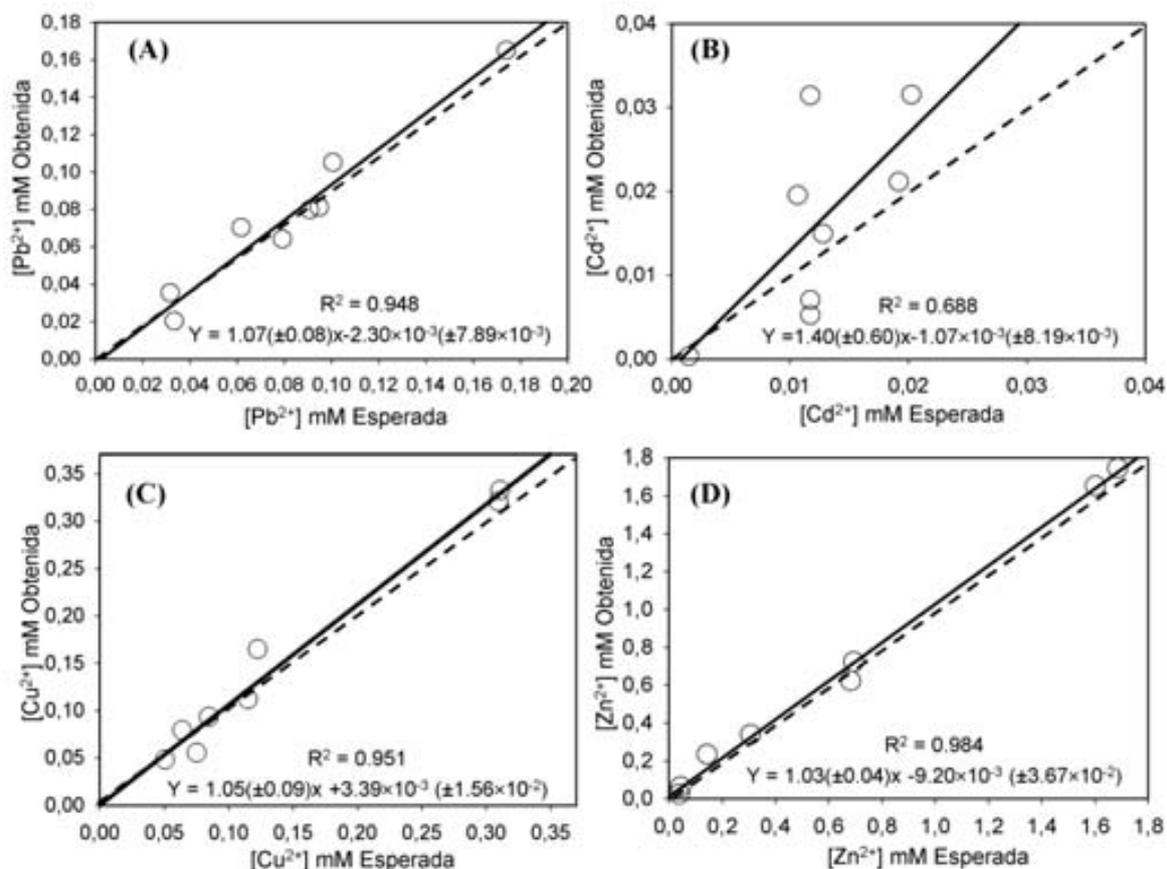


Figura 4.13. Recta de regresión comparativa para la determinación de Pb²⁺ (A), Cd²⁺ (B), Cu²⁺ (C) y Zn²⁺ (D) en las muestras de suelo. La línea discontinua corresponde a la idealidad y la sólida a la regresión realizada. Las incertidumbres se calcularon para un nivel de confianza de 95 %.

Los resultados obtenidos por FAAS y la ET propuesta se compararon estadísticamente. La Figura 4.13 muestra los resultados del análisis de regresión lineal realizado (ET vs. FAAS) para los cuatro analitos (Pb²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ y Zn²⁺). De forma general los resultados son satisfactorios para el cobre, el zinc y el plomo, con pendientes y ordenadas cercanas a 1.0 y 0.0 respectivamente, y con coeficientes de correlación también significativos, como antes. Sin embargo, no se obtuvo un buen resultado para la determinación de ion Cd²⁺, el valor tan bajo del coeficiente de correlación obtenido evidencia de la baja exactitud alcanzada. Este hecho puede estar relacionado con el bajo contenido de cadmio en las muestras reales con valores entre 1.50×10^{-6} y 2.03×10^{-5} M (0.2 a $2.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), muy cercanos e incluso menores que el límite de detección del ISE de Cd²⁺ y, también, por la presencia de un solo electrodo de cadmio en la ET.

Los resultados de los dos métodos fueron comparados también, a través de la prueba t de Student para muestras pareadas. Los valores del estadístico t calculados fueron de $t = 0.12$ para Pb^{2+} , $t = 0.23$ para Cu^{2+} , $t = 0.21$ para Zn^{2+} y $t = 3.24$ para Cd^{2+} . Para el análisis de Pb^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} los valores de t calculados estaban por debajo del valor crítico tabulado de $t^* = 2.36$ (para 7 grados de libertad y 95% de nivel de confianza), lo que demuestra que tanto con el sistema propuesto como con el método de referencia se llega a los mismos resultados para la determinación de estos tres iones. En contraste con estos resultados, el análisis de Cd^{2+} sí mostró diferencias significativas entre los dos métodos.

La Tabla 4.8 muestra la comparación de los valores de concentración máximas permisibles de metales pesados en muestras de suelos por las directivas europeas [21] y el rango de concentración obtenido para cada metal en las 8 muestras de suelo. Se realizó un análisis del pH de las muestras de suelo y todas presentaron pH básicos. De acuerdo con esta comparación, no podemos confirmar que exista una contaminación significativa por presencia de los iones determinados en las ocho muestras de suelo analizadas, pero se pudo comprobar la simplicidad de la metodología desarrollada.

Tabla 4.8. Comparación de las concentraciones máximas permisibles de metales pesados en suelos básicos vs. el rango de concentración obtenido para las ocho muestras de suelos.

Ion	Valores límites ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Rango obtenido ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
Pb^{2+}	300.0	6.6 – 36.1 (± 3.7)
Cu^{2+}	140.0	3.2 – 19.8 (± 3.9)
Cd^{2+}	3.0	0.2 – 2.3 (± 1.9)*
Zn^{2+}	300.0	2.6 – 110.4 (± 4.2)

* Valor determinado por FAAS.

El contenido de cadmio fue el más bajo de los cuatro analitos y con la ET propuesta no se pudo lograr una determinación exacta al nivel de concentración en que se encuentra este metal en las muestras. Con el fin de comprobar la exactitud del método propuesto a mayores concentraciones de Cd^{2+} y para ampliar la aplicabilidad a otras muestras de naturaleza diferente o con un nivel de contaminación más alta, cinco de las muestras de

suelo analizadas fueron dopadas con adiciones de un patrón de cadmio, 0.01 M hasta obtener una concentración máxima de 7.23×10^{-4} M (81.3 mg kg^{-1}). La curva de regresión obtenida para la determinación Cd^{2+} en las muestras dopadas con la ET propuesta comparada con el método de referencia FAAS, se muestra en la Figura 4.14. Los valores de la pendiente y ordenada están cerca de 1.0 y 0.0, respectivamente. Además, el coeficiente de correlación obtenido fue altamente significativo.

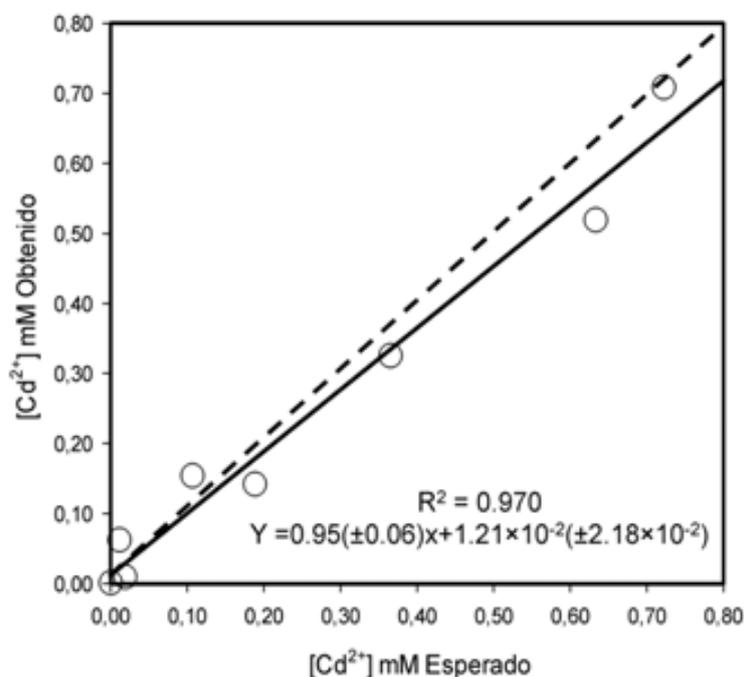


Figure 4.14. Resultados de la ET propuesta para la determinación de Cd^{2+} en las muestras de suelo dopadas. La línea discontinua corresponde a la idealidad y la sólida a la línea de regresión de la comparación realizada. Las incertidumbres se calcularon para un nivel de confianza de 95 %.

En este caso también los resultados se compararon con una prueba t de Student para muestras apareadas, siendo el valor del estadístico t calculado de 0.36 y el valor tabulado de $t^* = 2.36$ (para 7 grados de libertad y 95% de nivel de confianza). Como el valor obtenido es mucho menor que el tabulado se puede asumir que no existen diferencias significativas entre ambos métodos en el nuevo intervalo de concentración seleccionado.

4.6 Valoración complejométrica de Cu(II), Cd(II) y Pb(II) utilizando un método rápido de adiciones fijas de agente valorante y una lengua electrónica potenciométrica para detectar el punto final

El método clásico de valoración complejométrica para resolver mezclas de 3 metales de transición ha sido poco efectivo, dada la similitud entre las constantes de equilibrio de las reacciones de valoración. En la presente tesis se propone abordar esta problemática empleando una matriz de sensores para determinar el punto final de la valoración, como fuente adicional de información.

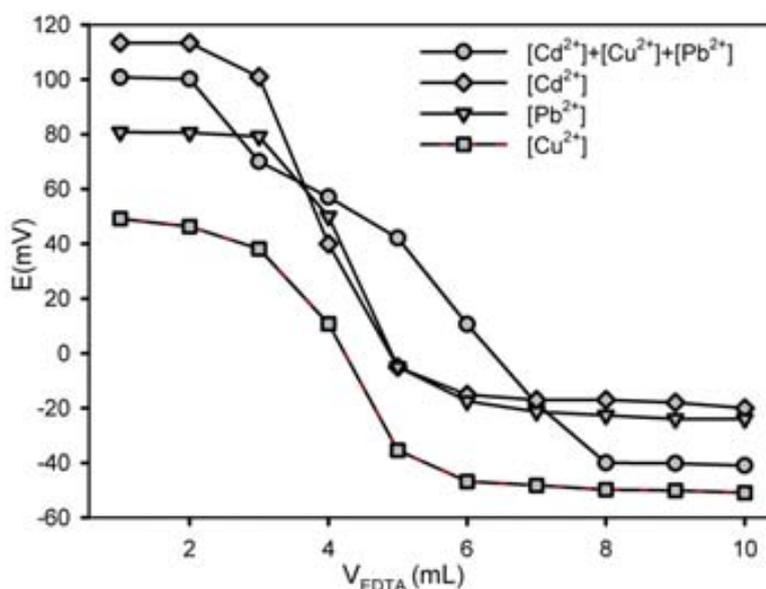


Figura 4.15. Curvas de valoración complejométrica de tres disoluciones individuales que contienen Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} y una mezcla de los tres componentes con detección potenciométrica del punto final (ISE-Generico (3) como electrodo indicador).

En la Figura 4.15 se muestran las curvas de valoración para diferentes disoluciones individuales y para mezclas de los tres iones a determinar, obtenidas con el ISE Genérico (3) de la ET empleada en la investigación. Cuando la valoración se realiza para la mezcla de los tres analitos ($Cu^{2+} + Cd^{2+} + Pb^{2+}$), no es posible determinar el punto final por los métodos convencionales. Es por ello que proponemos emplear una matriz de sensores con respuesta cruzada a las especies de interés y redes neuronales artificiales para procesar la información multianalítica obtenida. Con el fin de disminuir

los tiempos de análisis se empleará un número reducido de adición de agente valorante (5 adiciones con bureta automática) a volúmenes fijos.

En la Figura 3.6 se muestra una fotografía del equipo de medición. La matriz de sensores que se empleó como sistema de detección del punto final, se formó con 8 de los sensores potenciométricos caracterizados previamente en la Tablas 4.6 y 4.7, excluyendo los dos ISEs de Zn^{2+} .

4.6.1 Construcción del modelo de respuesta con ANN

La metodología de entrenamiento del epígrafe 3.6.2 fue empleada para determinar la arquitectura óptima de la ANN. Se emplearon 50 disoluciones patrón (mezclas de Cu^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}) preparadas teniendo en cuenta que el consumo de agente valorante EDTA no sobrepasara el volumen total de la bureta (Figura 3.11). El conjunto de muestras se dividió en dos subgrupos: 33 se emplearon en el entrenamiento (construcción del modelo) y las otras 17 en la validación del modelo obtenido (evaluar la habilidad predictiva). Las muestras se distribuyeron aleatoriamente teniendo en cuenta que las que contenían valores máximos y mínimos debían estar en el subgrupo de entrenamiento.

La mejor arquitectura de la ANN se obtuvo para 48 neuronas en la capa de entrada (8 ISEs \times 6 medidas de diferencia de potencial), 6 en la capa oculta y 3 en la capa de salida (número de analitos), y con las funciones de transferencia *logsig* y *purelin* en las capas oculta y de salida, respectivamente. En la Figura 4.16, se muestra un resumen del proceso de optimización, así como la selección del número de neuronas con el resto de parámetros seleccionados.

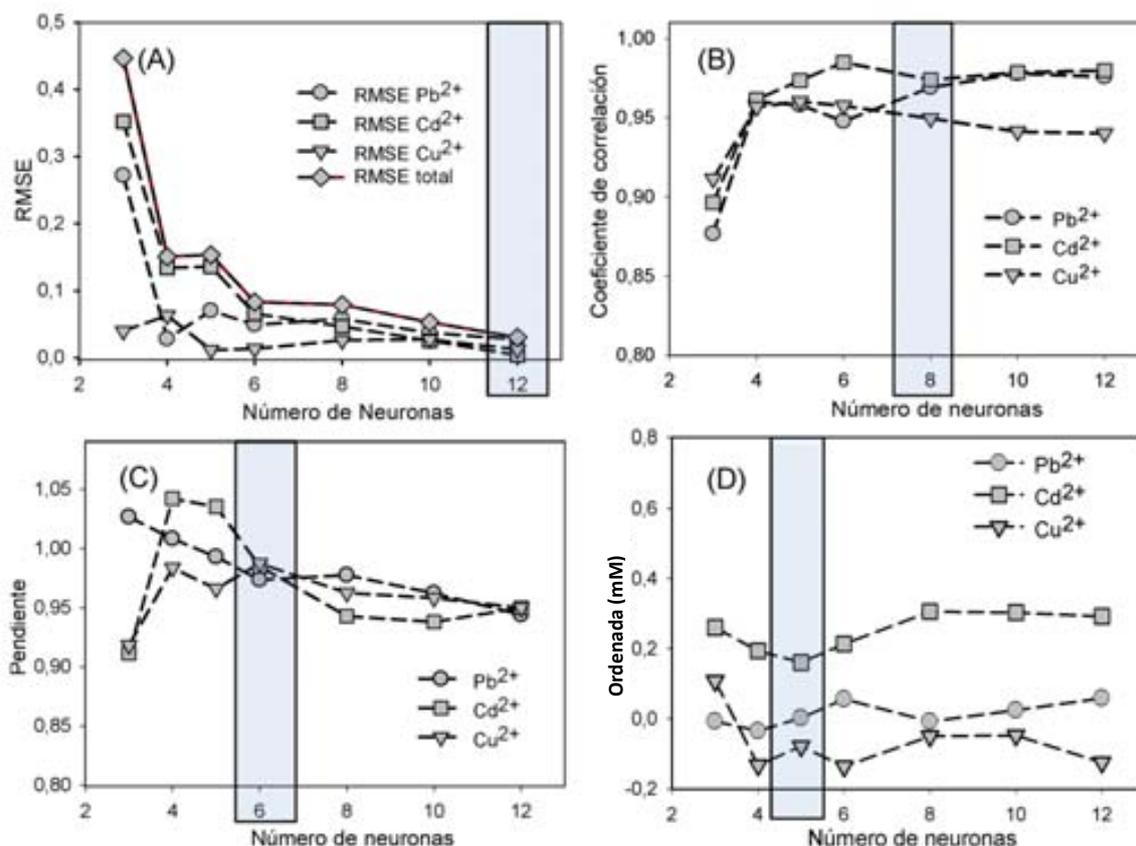


Figura 4.16. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN. (A) pendiente, (B) ordenada, (C) coeficiente correlación y (D) valores de RMSE.

La habilidad predictiva del modelo se evaluó mediante un análisis de regresión con las muestras de validación externa, en la Figura 4.17, se muestran las rectas comparativas así como otros parámetros del análisis. Los resultados obtenidos para este conjunto de muestras con el modelo optimizado, indican muy buena correlación para los tres iones estudiados, con valores de pendiente y ordenada que incluyen los valores ideales con sus respectivos intervalos de confianza.

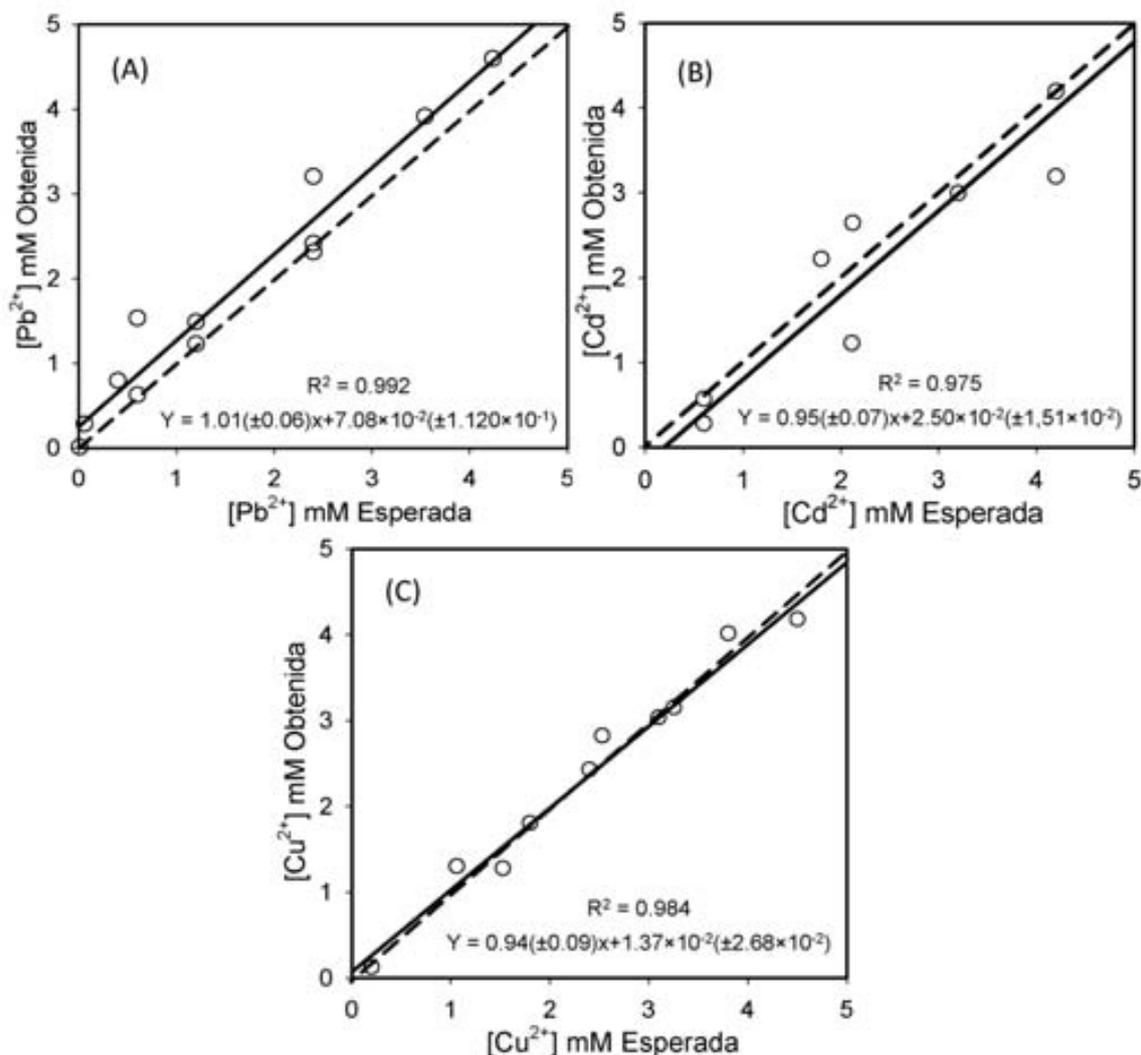


Figura 4.17. Rectas de regresión comparativas para el subconjunto de validación externa con la ANN optimizada, (A) Pb^{2+} , (B) Cd^{2+} y (C) Cu^{2+} . La línea discontinua corresponde a la ideal y la sólida a la regresión realizada. Las incertidumbres se calcularon para un nivel de confianza de 95 %.

4.6.2 Determinación de las características de desempeño de método

Mediante los procedimientos descritos en el apartado 3.5.2, se determinaron los parámetros analíticos del método propuesto: límite de detección, precisión y exactitud. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.9, los límites de detección y la precisión se puede afirmar que son adecuados; en el caso de la exactitud, al comparar los valores de concentración obtenidos con el método de valoración propuesto y los

valores asignados a los patrones de referencia y teniendo en cuenta sus intervalos de confianza, se demostró que el sistema analítico estudiado no tiene sesgo al nivel de concentración evaluado.

Tabla 4.9. Características de desempeño del método de valoración propuesto.

Ion	LD (mg L ⁻¹)	RSD (%)	Exactitud (mg·L ⁻¹)	
			Obtenida	Esperada
Cd ²⁺	1.20	4.10	46.47±1.91	
Cu ²⁺	1.14	5.20	54.10±2.81	50±2.0
Pb ²⁺	0.89	3.00	53.04±1.59	

4.6.3 Determinación simultánea de Cu²⁺, Cd²⁺ y Pb²⁺ en muestras reales

Después de haber comprobado que el método propuesto funciona adecuadamente para muestras sintéticas, nos propusimos aplicarlo en muestras reales. Para el análisis se emplearon 6 muestras de suelos cercanos a carreteras de las afueras de la ciudad de Barcelona, que fueron tratadas según el procedimiento descrito en el epígrafe 3.8. Debido al bajo contenido de los iones de interés en los extractos de suelo, las muestras fueron dopadas con disoluciones estándares de Cd²⁺, Cu²⁺ y Pb²⁺ de concentración 0.01 M. Los resultados obtenidos con el sistema propuesto fueron comparados con el método de espectrometría de absorción atómica.

En la Figura 4.18 se muestran las rectas de regresión comparativas de los resultados obtenidos por ambos métodos; así como los valores de coeficiente de correlación pendiente y ordenada. Los parámetros comparativos son adecuados para las muestras reales analizadas, sobre todo, teniendo en cuenta la complejidad de la matriz de la muestra. La pendiente y ordenada en el origen son significativos ya que los valores ideales se encuentran dentro del intervalo de confianza obtenido, lo que evidencia que no hay diferencias apreciables entre el método de valoración complexométrica con detección del punto final con ET potenciométrica y el de referencia (FAAS).

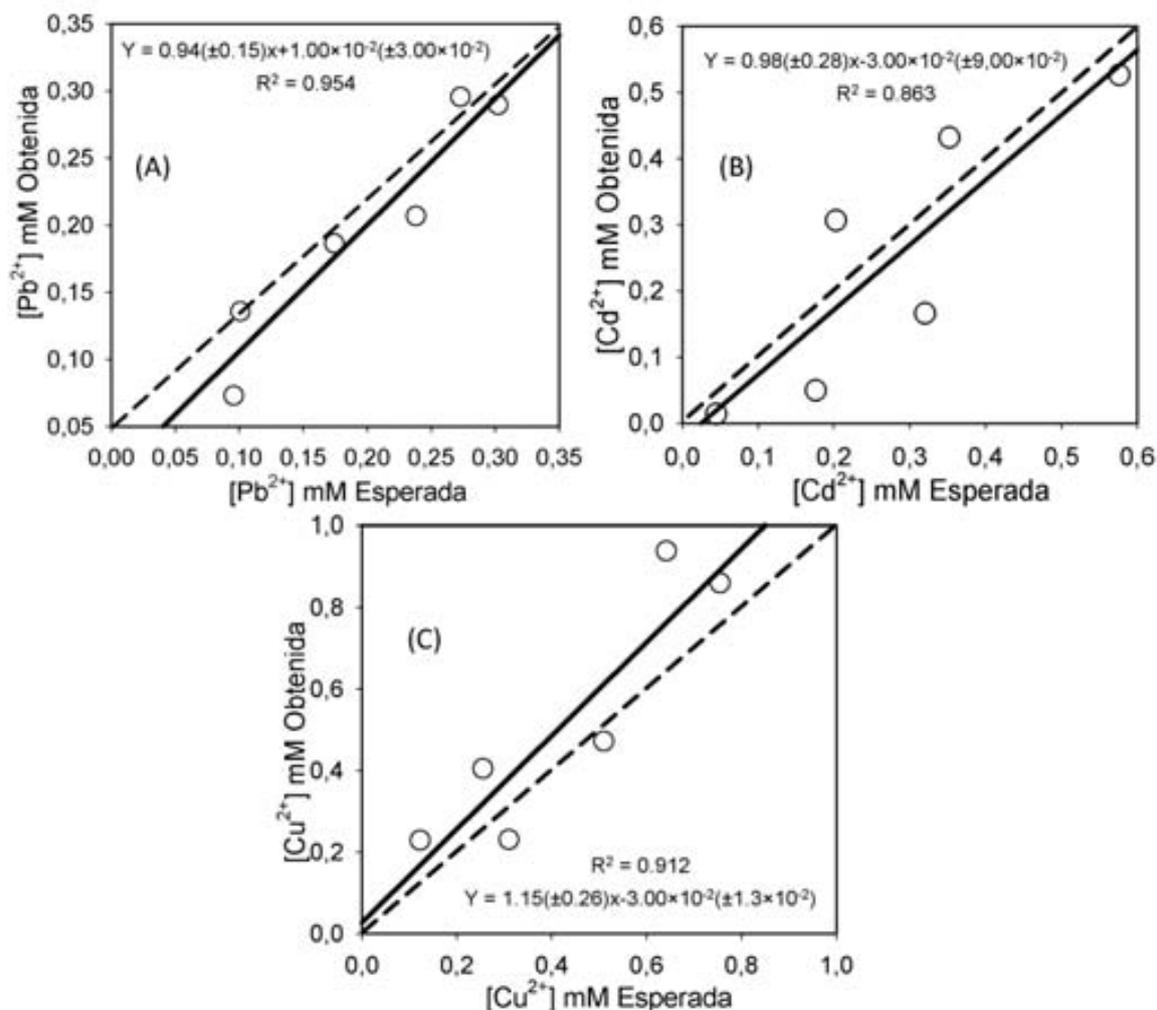


Figura 4.18. Rectas de regresión comparativas para la determinación de Pb^{2+} (A), Cd^{2+} (B) y Cu^{2+} (C) en las muestras de suelo dopadas. La línea discontinua corresponde a la idealidad y la sólida a la regresión realizada. Las incertidumbres se calcularon para un nivel de confianza de 95 %.

Los resultados obtenidos por los dos métodos fueron comparados también, mediante la prueba t de Student para muestras apareadas. Los valores del estadístico t calculados fueron de $t = 0.04$ para Pb^{2+} , $t = 1.63$ para Cu^{2+} y $t = 0.21$ para Cd^{2+} . En los tres casos los valores de t calculados estaban por debajo del valor crítico tabulado de $t^* = 2.57$ (para 5 grados de libertad y 95% de nivel de confianza), lo que corrobora los resultados obtenidos en el análisis de regresión anterior, demostrando que tanto con el sistema propuesto como con el método de referencia se llega a los mismos resultados para la determinación de estos tres iones.

4.7 Construcción, caracterización de los electrodos selectivos de iones para determinaciones en flujo y optimización del equipamiento utilizado

Dentro de los principales aportes de la presente tesis doctoral, se encuentra el desarrollo de un sistema automatizado para la monitorización de procesos de biosorción de metales de transición en el raspo de uva, residuo procedente de la industria vinícola. Los electrodos empleados en estas aplicaciones son de configuración tubular y fueron construidos como se detalla en el epígrafe 3.3.2.

4.7.1 Caracterización de los ISEs de configuración tubular

Tabla 4.10. Caracterización de los ISEs tubulares.

Ion principal Sensor	Pb ²⁺		Zn ²⁺		Ca ²⁺		Cd ²⁺		Cu ²⁺		LD del ion primario (M)
	Pendiente (mV/dec)	Rango (M)									
Ca ²⁺ (1)	9.9 ± 1.9	2.1 × 10 ⁻⁵ ; 7.0 × 10 ⁻³	9.1 ± 2.0	3.1 × 10 ⁻⁵ ; 8.0 × 10 ⁻³	29.8 ± 0.9	7.5 × 10 ⁻⁷ ; 6.5 × 10 ⁻²	7.1 ± 2.5	4.2 × 10 ⁻⁵ ; 9.0 × 10 ⁻³	18.2 ± 2.1	2.2 × 10 ⁻⁵ ; 9.0 × 10 ⁻³	(4.2 ± 0.6) × 10 ⁻⁷
Ca ²⁺ (2)	14.6 ± 1.8	1.4 × 10 ⁻⁵ ; 9.2 × 10 ⁻²	12.9 ± 2.1	2.0 × 10 ⁻⁵ ; 5.3 × 10 ⁻³	30.1 ± 1.1	5.7 × 10 ⁻⁶ ; 0.5 × 10 ⁻²	15.2 ± 2.0	5.0 × 10 ⁻⁵ ; 9.3 × 10 ⁻³	20.8 ± 2.1	1.7 × 10 ⁻⁵ ; 8.1 × 10 ⁻³	(1.3 ± 0.7) × 10 ⁻⁶
Pb ²⁺ (1)	29.8 ± 1.9	5.0 × 10 ⁻⁷ ; 1.0 × 10 ⁻²	6.2 ± 2.5	7.9 × 10 ⁻⁶ ; 5.0 × 10 ⁻³	10.4 ± 2.2	2.3 × 10 ⁻⁵ ; 1.0 × 10 ⁻³	11.4 ± 1.2	5.8 × 10 ⁻⁶ ; 8.0 × 10 ⁻³	29.5 ± 1.4	1.0 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻²	(1.2 ± 1.1) × 10 ⁻⁷
Pb ²⁺ (2)	30.0 ± 2.1	4.2 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻²	5.2 ± 2.1	5.8 × 10 ⁻⁵ ; 5.0 × 10 ⁻³	10.3 ± 2.4	2.7 × 10 ⁻⁵ ; 8.7 × 10 ⁻²	10.3 ± 2.3	8.9 × 10 ⁻⁵ ; 8.5 × 10 ⁻³	24.5 ± 1.5	8.1 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻²	(9.3 ± 2.3) × 10 ⁻⁷
Zn ²⁺	24.1 ± 2.3	7.5 × 10 ⁻⁵ ; 5.0 × 10 ⁻³	31.2 ± 2.4	3.2 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻¹	10.1 ± 1.2	8.2 × 10 ⁻⁵ ; 2.8 × 10 ⁻³	25.4 ± 2.2	4.2 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻²	29.0 ± 2.3	4.2 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻²	(1.2 ± 1.3) × 10 ⁻⁶
Cd ²⁺	11.2 ± 2.0	7.3 × 10 ⁻⁵ ; 8.0 × 10 ⁻³	5.2 ± 2.2	3.0 × 10 ⁻⁵ ; 8.0 × 10 ⁻³	7.8 ± 1.5	3.8 × 10 ⁻⁵ ; 9.1 × 10 ⁻³	29.8 ± 2.1	5.3 × 10 ⁻⁶ ; 1.0 × 10 ⁻¹	17.7 ± 2.1	5.7 × 10 ⁻⁵ ; 5.0 × 10 ⁻³	(2.1 ± 1.2) × 10 ⁻⁶
Cu ²⁺ (2)	19.9 ± 2.3	8.9 × 10 ⁻⁶ ; 9.0 × 10 ⁻²	8.2 ± 1.3	3.1 × 10 ⁻⁵ ; 8.2 × 10 ⁻³	17.6 ± 1.2	5.1 × 10 ⁻⁵ ; 8.9 × 10 ⁻³	20.0 ± 1.9	1.3 × 10 ⁻⁵ ; 5.7 × 10 ⁻³	30.4 ± 1.3	8.6 × 10 ⁻⁶ ; 1.2 × 10 ⁻²	(2.0 ± 0.5) × 10 ⁻⁶
Genérico (1)	28.3 ± 1.9	1.7 × 10 ⁻⁵ ; 1.0 × 10 ⁻²	17.2 ± 2.5	1.5 × 10 ⁻⁵ ; 9.7 × 10 ⁻³	25.8 ± 1.2	2.7 × 10 ⁻⁵ ; 8.9 × 10 ⁻³	19.6 ± 2.5	1.5 × 10 ⁻⁵ ; 1.0 × 10 ⁻²	28.0 ± 1.5	6.8 × 10 ⁻⁶ ; 1.3 × 10 ⁻²	(2.1 ± 1.5) × 10 ⁻⁶ (a)
Genérico (2)	18.2 ± 2.4	2.2 × 10 ⁻⁵ ; 2.0 × 10 ⁻²	14.1 ± 2.5	2.5 × 10 ⁻⁵ ; 1.9 × 10 ⁻²	29.8 ± 0.8	8.7 × 10 ⁻⁶ ; 2.1 × 10 ⁻²	17.1 ± 2.1	2.3 × 10 ⁻⁵ ; 2.0 × 10 ⁻²	21.2 ± 1.6	1.2 × 10 ⁻⁵ ; 2.0 × 10 ⁻²	(4.1 ± 0.9) × 10 ⁻⁶ (b)
Genérico (3)	25.3 ± 2.5	0.5 × 10 ⁻⁵ ; 1.0 × 10 ⁻²	28.8 ± 2.1	8.3 × 10 ⁻⁶ ; 9.6 × 10 ⁻³	16.8 ± 2.1	8.8 × 10 ⁻⁶ ; 3.5 × 10 ⁻³	29.1 ± 1.6	1.1 × 10 ⁻⁵ ; 1.0 × 10 ⁻²	22.0 ± 1.5	6.8 × 10 ⁻⁶ ; 1.3 × 10 ⁻²	(2.3 ± 1.8) × 10 ⁻⁶ (c)

Iones primarios seleccionados: ^(a) Pb²⁺, ^(b) Ca²⁺, ^(c) Zn²⁺

En las Tablas 4.10 y 4.11 se muestran los resultados obtenidos de la caracterización de los electrodos utilizados en las medidas en flujo. Todos los ISEs muestran sensibilidad

Nernstiana para sus correspondientes iones primarios. Según los valores de los coeficientes de selectividad, los ISEs presentan respuesta cruzada entre los iones de interés. El límite de detección se encuentra alrededor de 1.0×10^{-7} y 1.0×10^{-6} M para unos u otros sensores, válidos para las aplicaciones propuestas.

Tabla 4.11. Logaritmo de los coeficientes de selectividad potenciométricos de los ISEs tubulares.

Sensor e ion primario	Ion interferente				
	Ca ²⁺	Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Cu ²⁺
Ca ²⁺ (1)	-	-3.2	-2.8	-3.4	-3.2
Ca ²⁺ (2)	-	-3.1	-2.5	-4.1	-2.5
Pb ²⁺ (1)	-4.8	-	-3.1	-3.6	+0.7
Pb ²⁺ (2)	-4.2	-	-2.4	-3.7	-1.1
Zn ²⁺	-3.8	-2.1	-	-2.6	-1.8
Cd ²⁺	-4.1	-2.8	-2.3	-	-2.5
Cu ²⁺ (2)	-3.5	-1.8	-2.3	-4.1	-
Genérico (1)	2.6	-	-1.8	-1.7	-1.3
Genérico (2)	-	-2.1	-1.4	-2.4	-1.1
Genérico (3)	-2.5	-0.8	-	0.4	-0.9

4.7.2 Verificación de los principales parámetros analíticos del FIP y selección de las condiciones de trabajo

El sistema analítico propuesto (FIP-ET) fue optimizado completamente por Florido y colaboradores en trabajos previos [22]. En nuestros experimentos incluimos muy pocas variaciones en el equipo de medición; se acopló una matriz de sensores como sistema de detección para realizar las determinaciones simultáneas de los diferentes metales. Teniendo en cuenta esta modificación, se cambió la composición de la disolución portadora. Ésta tuvo como componente principal una disolución de nitrato de sodio 0.2 M como estabilizador de fuerza iónica y otra disolución que contiene sales de nitratos de los iones a determinar en cantidad equimolar, con una concentración total 2.0×10^{-6} M. Este nivel de fondo de los analitos cercano a los límites de detección se añade para que la recuperación de la línea base de los picos FIA se produzca con mayor rapidez.

Con estas variaciones realizadas, se verificó la influencia del caudal y del volumen de inyección en la respuesta de la matriz de sensores.

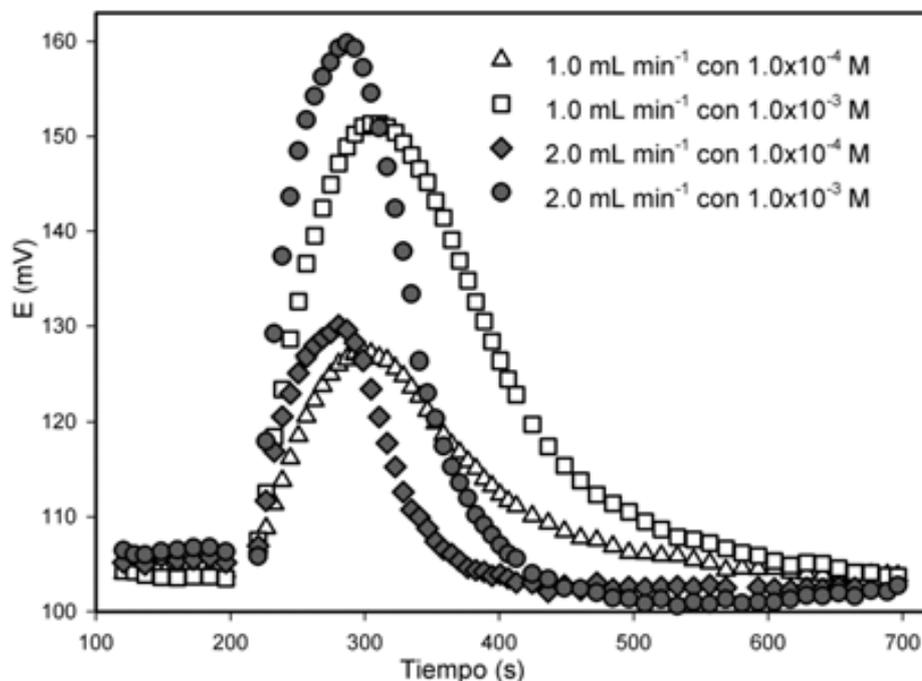


Figura 4.19. Efecto del caudal en la respuesta del ISE- Ca^{2+} (1).

Se estudiaron dos caudales (1.0 y $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) para toda la matriz de sensores (con sus respectivos iones principales) a dos niveles de concentración (1.0×10^{-4} y 1.0×10^{-3} M). Los picos de mayor altura se obtuvieron a $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para los dos niveles de concentración, como se puede observar en la Figura 4.19 para el ISE- Ca^{2+} (1). También se evidencia que la recuperación de la línea base es más rápida a mayor caudal.

El volumen de muestras y patrones inyectado al sistema FIP-ET se ajusta controlando el tiempo de apertura de las válvulas de solenoide, siendo este parámetro estudiado para la respuesta de la matriz de sensores. La Figura 4.20 muestra los tiempos de apertura de las válvulas estudiados (20 , 40 , 60 , 80 , 100 , 140 y 180 s) para el ISE- Ca^{2+} (1). A los 60 s, que equivalen a 2 mL de muestra inyectado, se obtiene una señal con forma de pico que tiene una altura de aproximadamente del 95% del potencial del estado estacionario. Estos mismos resultados se obtienen para el resto de sensores empleados en la ET.

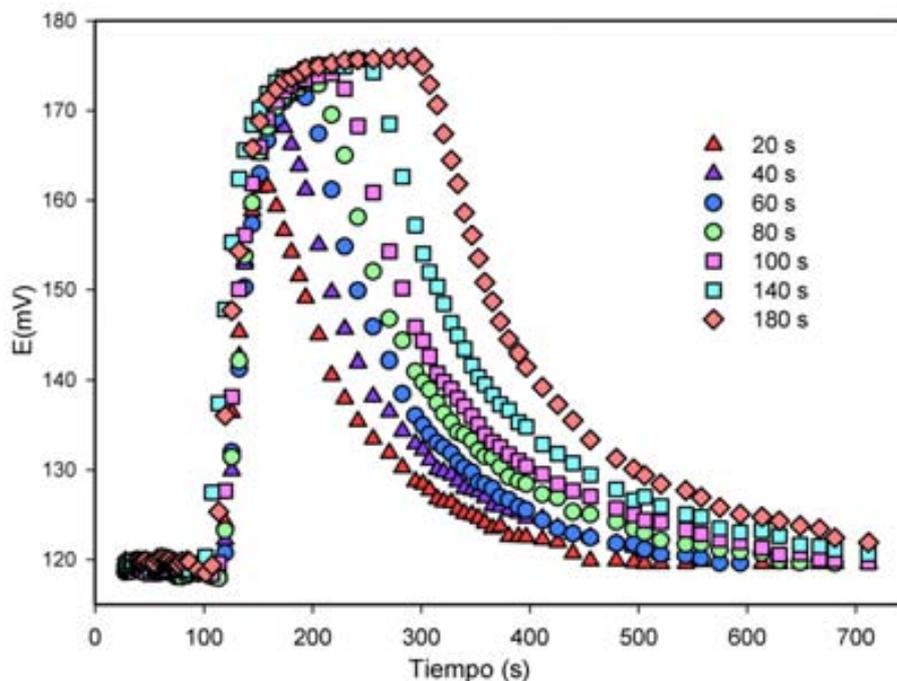


Figura 4.20. Efecto del tiempo de apertura de válvulas (volumen de muestra inyectado) en la respuesta del ISE- Ca^{2+} (1). Los picos fueron obtenidos para una disolución estándar de Ca^{2+} (1.0×10^{-4} M) y a una velocidad de flujo constante de $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El potencial del estado estacionario fue de 176 ± 1 mV.

Para terminar la verificación del sistema, se comprobó el funcionamiento completo en un ciclo de operación. Así, se introdujeron disoluciones patrón de Cu^{2+} y Ca^{2+} de concentración (5.5×10^{-4} M) desde las diferentes entradas ya sean para patrones o muestra (ver esquema del equipamiento en el epígrafe 3.4.2). Los valores de concentración de los metales fueron determinados a partir de las curvas de calibración realizadas previamente en las mismas condiciones de medición. Los valores de RSD obtenidos fueron de 4.5 % y 4.9 % para Cu^{2+} y Ca^{2+} , respectivamente ($n = 10$ para los dos cálculos realizados).

4.8 Monitorización del proceso de biosorción de cobre y de la salida del calcio del raspado de uva con un sistema basado en FIP-ET

Esta primera aplicación consistió en monitorizar el proceso de biosorción de cobre en el raspado de uva, así como determinar el perfil de salida del calcio como ion intercambiable

mayoritario del biosorbente utilizado. Para realizar este estudio se empleó el sistema de análisis por inyección en flujo optimizado en el apartado anterior y una lengua electrónica basada en 5 electrodos tubulares para mediciones en flujo, previamente caracterizados (ver Tablas 4.10 y 4.11): dos ISEs selectivos a Ca^{2+} basados en ionóforos diferentes (Ca^{2+} (1) y Ca^{2+} (2)), un ISE de membrana cristalina selectivo a Cu^{2+} (Cu^{2+} (2)), y dos sensores genéricos con respuesta cruzada a Cu^{2+} y Ca^{2+} (Genérico (1) y Genérico (2)).

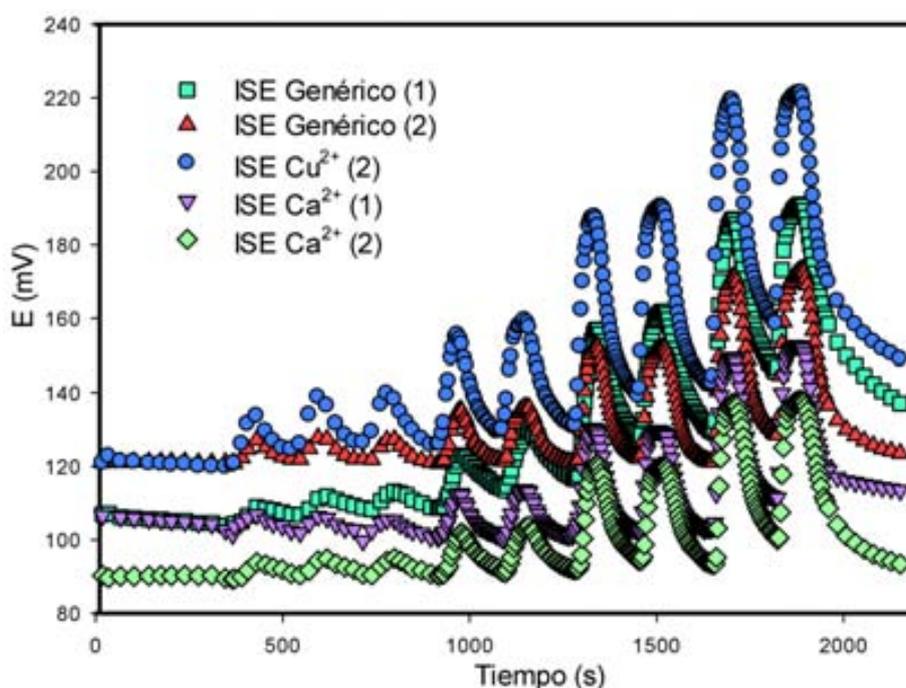


Figura 4.21. Fiagrama obtenido durante la calibración de los 5 ISEs que componen la ET para diferentes niveles de concentración de Cu^{2+} (10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} y 10^{-2} M); dos picos consecutivos para todos los niveles de concentración excepto para 10^{-5} M.

En la Figura 4.21 se muestra la respuesta de la matriz de sensores utilizada en una calibración convencional a ion cobre (II). Se observa que todas las membranas utilizadas muestran respuesta primaria o residual a las adiciones de ion Cu^{2+} , obteniéndose los picos de mayor altura con el ISE- Cu^{2+} (2), como era de esperar.

4.8.1 Construcción del modelo de respuesta con ANN

Para la construcción del modelo de respuesta se emplearon 36 disoluciones que contenían iones Ca^{2+} y Cu^{2+} , preparadas mediante un diseño factorial completo con 2 factores y 6 niveles (36 muestras). De estos patrones se utilizaron 26 para el subconjunto de entrenamiento y el resto para la validación externa del modelo. En la Figura 3.12 se muestra la distribución lograda. El proceso de optimización de la arquitectura de la ANN se realizó de la misma manera que en los casos anteriores. Los mejores resultados se obtuvieron para 5 neuronas en la capa de entrada (una por cada ISE), 8 neuronas en la capa oculta y 2 en la capa de salida (una por cada analito) y con las funciones de transferencia *tansig* y *purelin* para la capa oculta y de salida respectivamente. Un fragmento del proceso de optimización se muestra en la Figura 4.22.

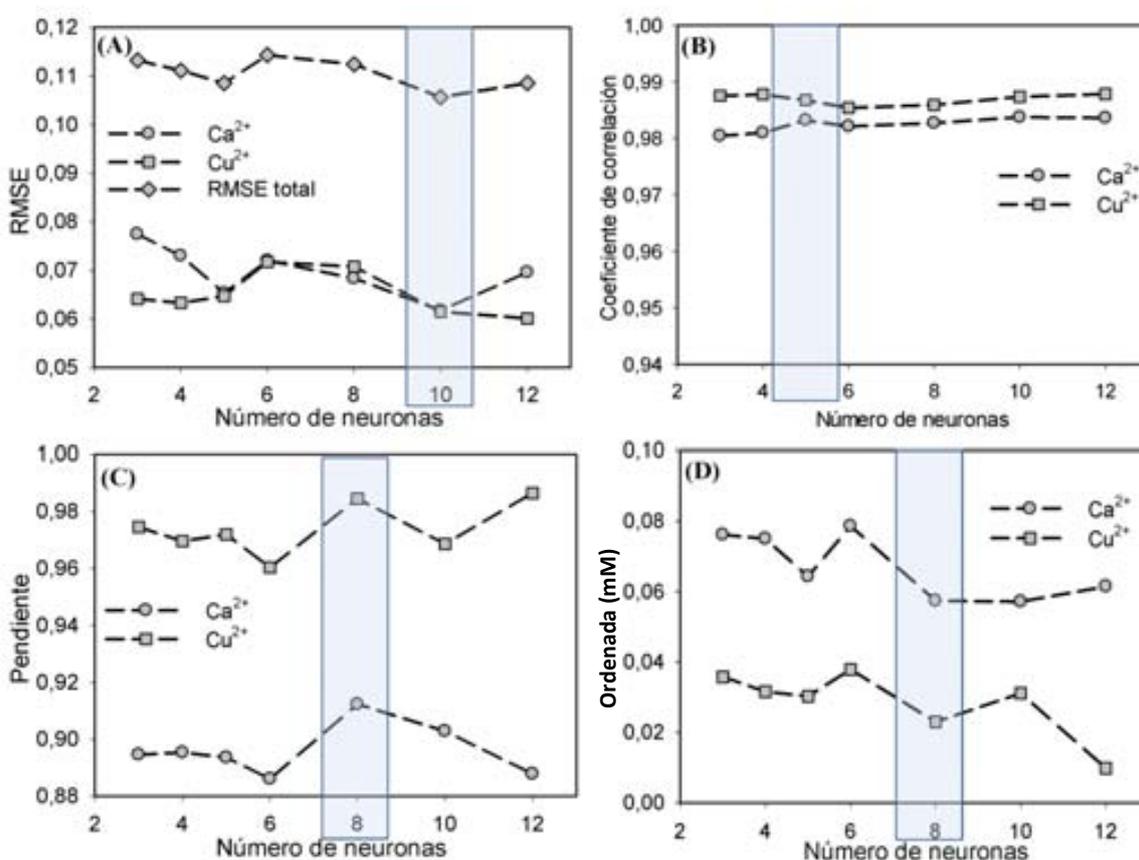


Figura 4.22. Selección del número de neuronas óptimo en la capa oculta de la ANN: (A) valores de RMSE; (B) coeficiente de correlación; (C) pendiente y (D) ordenada.

La Figura 4.23 ilustra las rectas de correlación obtenidas entre la concentración obtenida y la esperada para el subconjunto de patrones de entrenamiento de los dos analitos. La habilidad predictiva del modelo es muy buena para los dos iones, con valores de coeficientes de correlación, pendientes y ordenada cercanos a 1.0, 1.0, 0.0, respectivamente, si se tienen en cuenta los intervalos de confianza (los intervalos de confianza fueron calculados para un 95 % de confiabilidad).

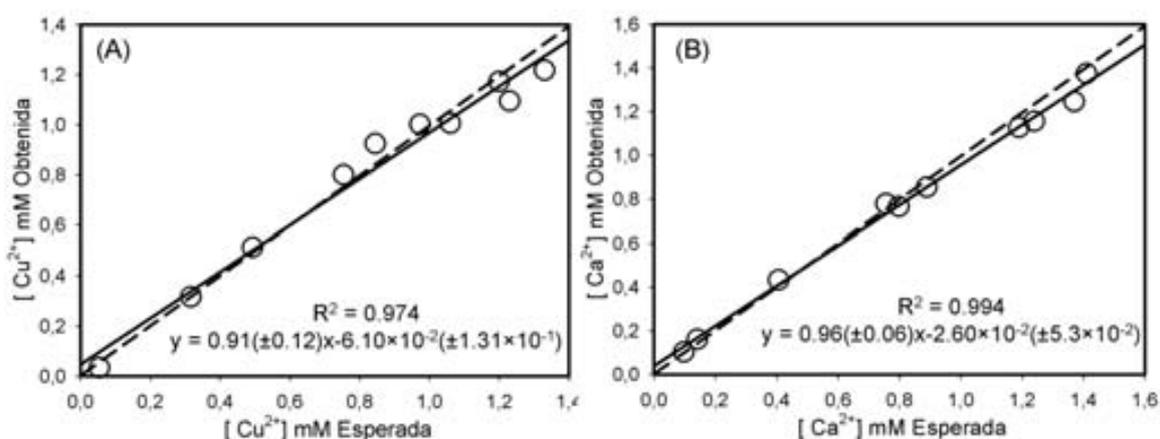


Figura 4.23. Rectas de regresión comparativas para el subconjunto de validación externa con la ANN optimizada, (A) Cu^{2+} , (B) Ca^{2+} . La línea discontinua corresponde a la idealidad y la sólida a la regresión realizada.

4.8.2 Monitorización del proceso de biosorción

Para realizar la monitorización del proceso de biosorción de metales se acoplaron la parte A (sistema de medición) con la B (sistema de biosorción) (ver esquema de la Figura 3.5). La sección B contiene la disolución de Cu^{2+} a depurar, que pasará a través de la columna de lecho fijo que contiene el residuo de raspo de uva (como biosorbente), donde será retenido el cobre, liberándose el calcio contenido en la estructura original del raspo de uva. La disolución que sale de la columna, pasará a la sección A (de medida) cada cierto tiempo, donde se obtiene la respuesta con la matriz de sensores. La información multivariable obtenida se procesa con el modelo de la ANN previamente optimizado, obteniendo la concentración de los dos iones en el tiempo.

El tiempo de monitorización y el de medición de las muestras para la calibración cruzada fue de 26 y 8 horas, respectivamente; estos procesos se realizaron uno inmediatamente después del otro. Durante los dos procesos se incluyó una disolución patrón para determinar el efecto de la deriva, comprobándose que, en las 34 horas de medición, la mayor variación de la señal fue de $\pm 0.2 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$, considerándose no relevante en este estudio.

La Figura 4.24 muestra las curvas de ruptura del proceso de biosorción de cobre y el perfil de salida de calcio del raspo de uva, representadas con respecto al volumen de efluente bombeado y obtenidas mediante el sistema propuesto (FIP-ET). En estas curvas también se han representado la concentración de los analitos determinadas por el método convencional de curva de calibración correspondiente a un solo ISE, sin ninguna corrección de interferencia, así como la concentración obtenida por los métodos de referencia ICP-OES y FAAS, para calcio y cobre, respectivamente. Se puede observar que, existe una discrepancia importante entre los resultados obtenidos entre la metodología FIP-ET y los ISEs individuales, sin embargo coinciden al contrastar la metodología FIP-ET con los métodos de referencia. Para corroborar los efectos observados, los resultados obtenidos por el método convencional con ISE, se compararon con los obtenidos por la ET mediante una prueba t de Student de muestras apareadas. El valor del estadístico t calculado fue de $t = 8.17$ para la determinación de calcio y $t = 4.77$ para la de cobre. En ambos casos los valores son superiores al valor crítico tabulado $t^* = 2.10$ y 2.11 para calcio y cobre con 18 y 17 grados de libertad, respectivamente, y 95 % de confiabilidad. Esta comparación es una evidencia de que existen diferencias significativas entre el método convencional de curva de calibración con un ISE individual y la lengua electrónica. La diferencia entre los dos métodos se debe a la interferencia que experimentan los ISEs de manera individual en presencia de concentraciones relevantes del ion interferente.

La otra comparación realizada para validar el método FIP-ET, se contrastaron los resultados obtenidos entre el método propuesto y los métodos de referencia. En este caso el valor del estadístico t de Student para la determinación de calcio fue de $t = 2.27$, más bajo que el tabulado para 7 grados de libertad ($t^* = 2.36$) y, en el caso cobre, $t = 0.65$, también más bajo que el valor crítico tabulado para 4 grados de libertad ($t^* =$

2.78). Los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0.995 ($n = 8$) y 0.994 ($n = 5$) para calcio y cobre respectivamente. Esta comparación estadística demuestra que los resultados obtenidos por el método propuesto de FIP-ET no se diferencian significativamente de los obtenidos con los métodos de referencia para los dos iones, validando la metodología desarrollada.

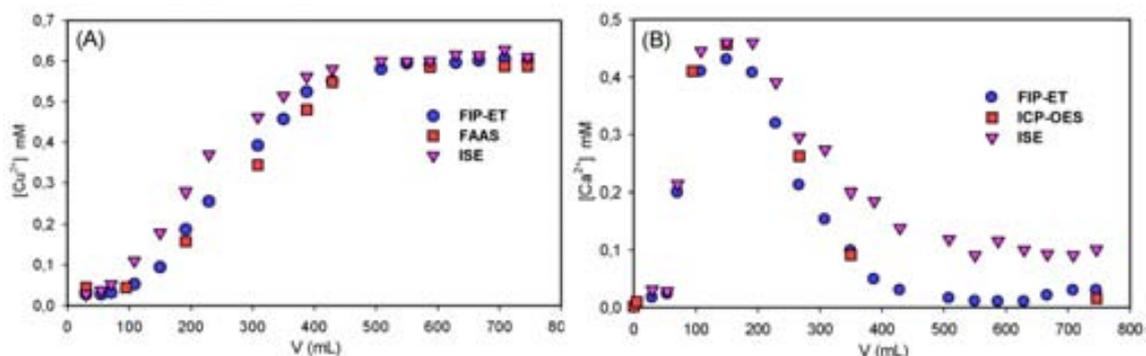


Figura 4.24. Curvas de rupturas para la biosorción de ion Cu^{2+} en el raspo de uva obtenida por el sistema on-line FIP-ET, por el método convencional de curva de calibración con un ISE y por FAAS (A); y el perfil de salida del ion Ca^{2+} obtenido por el sistema on-line FIP-ET, por el método convencional de curva de calibración con un ISE y por ICP-OES (B).

4.8.3 Modelación del mecanismo de biosorción

Los datos experimentales obtenidos durante la monitorización con el sistema propuesto FIP-ET fueron utilizados para establecer el mecanismo que rige la biosorción en el raspo de uva dentro de la columna de lecho fijo. Éstos fueron ajustados a los modelos de Thomas, BDST y Yoon-Nelson (ver epígrafe 3.7). Los volúmenes de ruptura y saturación se obtuvieron experimentalmente a 71 y 420 mL respectivamente. En la Tabla 4.12 están resumidos los parámetros de sorción obtenidos a partir de las pendientes y ordenadas del ajuste lineal de las ecuaciones (3.13)-(3.15) [23], comparados con los obtenidos experimentalmente. La capacidad de sorción (q_0) obtenida a partir del modelo de Thomas de $0.112 \text{ mmol L}^{-1}$ es similar a la obtenida experimentalmente de $0.116 \text{ mmol L}^{-1}$; la diferencia representa menos de un 3.7 % de error. En este mismo sentido, la capacidad de sorción del volumen del lecho (N_0)

reportado por el modelo BDST y el tiempo requerido para que se alcance el 50 % del sorbato (θ_r), obtenido por el modelo de Yoon-Nelson, también estuvieron muy cercanos a los valores obtenidos con los datos experimentales, como se muestra en la Tabla 4.12. Además, el valor de *MPSD* indica un buen ajuste entre los modelos de Thomas, BDST y Yoon-Nelson y el obtenido por los datos experimentales para la sorción de Cu^{2+} .

Tabla 4.12. Comparación de los modelos teóricos de Thomas, BDST y Yoon-Nelson y los parámetros experimentales para la sorción de Cu^{2+} en el raspo de uva.

	Modelo		Experimental	
Thomas	q_0 (mmol·g ⁻¹)	0.112	q_0 (mmol·g ⁻¹)	0.116
	K_{Th} (mL·mmol ⁻¹ ·min ⁻¹)	15.63		
BDST	N_0 (mmol·L ⁻¹)	27.60	N_0 (mmol·L ⁻¹)	28.75
	K_{BDST} (mL·mmol ⁻¹ ·min ⁻¹)	15.63		
Yoon-Nelson	θ_r (min)	502.6	θ_r (min)	509.7
	K_{YN} (min ⁻¹)	0.009		
r^2	0.97			
MPSD	9.67			

En este trabajo se demostró que los iones Ca^{2+} se intercambian de forma significativa desde el raspo de uva (entre otros más minoritarios como K^+ , Mg^{2+} y protones), cuando tiene lugar la sorción de Cu^{2+} , indicando que el intercambio iónico es el efecto predominante y responsable del mecanismo de biosorción. En la Figura 4.25 se puede ver que la biosorción de iones Cu^{2+} involucra un proceso de intercambio con los iones Ca^{2+} presentes en la estructura original del raspo de uva y por tanto su salida de los sitios activos. Es por ello, que después del punto de ruptura (alrededor de 70 mL) se alcanza la concentración máxima de Ca^{2+} cuando el Cu^{2+} está experimentando un incremento continuo. El posterior decrecimiento de la concentración de Ca^{2+} indica el agotamiento de la capacidad de intercambio de la columna (punto de saturación, alrededor de 420 mL). La cantidad total de metal absorbido y liberado fue de 0.233 y 0.147 meq·g⁻¹ para Cu^{2+} y Ca^{2+} respectivamente. Estos valores son cercanos a los obtenidos en experimentos en batch [24].

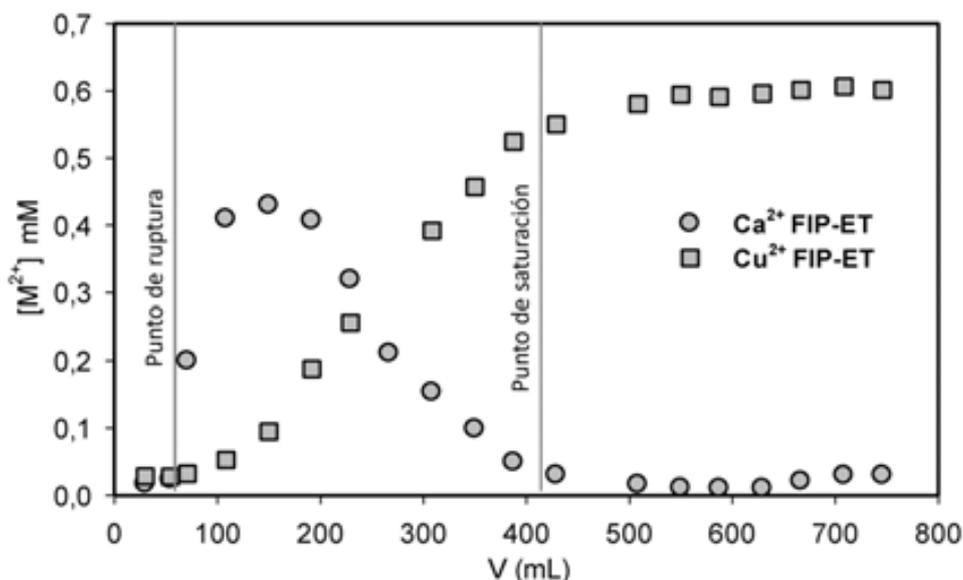


Figura 4.25. Curva de ruptura para sorción de Cu^{2+} en el raspo de uva y perfil de salida del Ca^{2+} , ambos obtenidos por el sistema on-line FIP-ET.

4.9 Monitorización del proceso de biosorción de mezclas multimetálicas y de la liberación de calcio del raspo de uva con un sistema basado en FIP-ET

En esta aplicación se estudiaron los procesos de biosorción de mezclas de dos y tres metales de transición y el perfil de salida del calcio del raspo de uva. Para ello se utilizó el mismo sistema FIP-ET de los experimentos anteriores y, como sistema de detección, se emplearon matrices de sensores compuestas por combinaciones de los electrodos tubulares para medidas en flujo, caracterizados previamente.

4.9.1 Construcción del modelo de respuesta con ANN

El modelo de respuesta se obtuvo mediante redes neuronales artificiales, siguiendo la misma metodología implementada en los trabajos anteriores. Para la construcción del modelo se emplearon 27 disoluciones. Se estudiaron cuatro casos en total: dos mezclas ternarias compuestas por (Cu^{2+} , Pb^{2+} y Ca^{2+}) y (Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+}) (Figura 3.13); además, dos cuaternarias compuestas por (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+}) y (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}

y Ca^{2+}) (Tabla 3.5), en el rango de concentración entre 4.0×10^{-6} y 8.0×10^{-3} M, para todos los iones y todas las combinaciones. Los esquemas de preparación de las muestras empleadas fueron: un diseño factorial completo con 3 niveles de concentración y 3 factores (iones) para las mezclas ternarias y, para las cuaternarias, un diseño factorial fraccionado con tres niveles de concentración y cuatro factores (iones) (3^{4-1}). Además se prepararon 10 muestras sintéticas definidas de forma aleatoria en el rango de concentraciones escogido, compuestas por las mezclas ternarias y cuaternarias de los iones antes citados. Estas últimas fueron escogidas para evaluar las habilidades predictivas de los modelos.

La optimización de la arquitectura de los modelos se realizó siguiendo el procedimiento de los trabajos anteriores. En primer lugar, se empleó como señal de entrada a la ANN la altura de los picos FIA, pero los modelos obtenidos no fueron satisfactorios. A partir de estos resultados, se decidió realizar un tratamiento dinámico de la señal. Para cada patrón de entrenamiento y de validación externa, se seleccionó el pico FIA obtenido por cada uno de los ISEs que componen la ET y se le aplicó la transformada rápida de Fourier. De esta manera, las señales de entrada a la red fueron los módulos de los coeficientes de Fourier. Durante el proceso de optimización se evaluaron una gran cantidad de combinaciones (probadas 5 veces), comprobándose hasta 12 números de neuronas en la capa oculta, 4 funciones de transferencia y 8 coeficientes de Fourier.

4.9.1.1 ANN para las mezclas ternarias

Para la primera mezcla ternaria estudiada compuesta por Cu^{2+} , Pb^{2+} y Ca^{2+} se emplearon 7 ISEs: dos selectivos a Ca^{2+} (Ca^{2+} (1) y Ca^{2+} (2)), uno selectivo a Cu^{2+} (Cu^{2+} (2)), los dos selectivos a Pb^{2+} (Pb^{2+} (1) y Pb^{2+} (2)) y los dos sensores genéricos (Genérico (1) y Genérico (3)). El mejor modelo se obtuvo para un coeficiente de Fourier, 7 neuronas en la capa de entrada ($7 \text{ ISEs} \times 1 \text{ coeficiente}$), 4 neuronas en la capa oculta, 3 neuronas en la capa de salida (una por analito) y función de transferencia *tansig*, tanto para la capa oculta como de salida.

En el monitoreo de Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} se incluyeron en la matriz de sensores 7 ISEs: dos selectivos a Ca^{2+} (Ca^{2+} (1) y Ca^{2+} (2)), el de membrana cristalina selectivo a Cu^{2+} (Cu^{2+} (2)), el ISE selectivo a Zn^{2+} con una réplica del mismo y los dos sensores genéricos (Genérico (1) y Genérico (3)). La mejor arquitectura lograda fue idéntica a la de la optimización anterior.

4.9.1.2 ANN para las mezclas cuaternarias

El contenido de la primera mezcla cuaternaria a monitorizar fue: Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+} , en este experimento en la matriz de sensores se emplearon los 9 ISEs que se utilizaron en la determinación de estos iones en las mezclas ternarias. El resultado del proceso de optimización de la arquitectura de la ANN arrojó los siguientes resultados: 36 neuronas en la capa de entrada (9 ISEs \times 4 coeficientes de Fourier), 10 neuronas en la capa oculta y 4 en la de salida (una por analito), la función de transferencia *tansig* fue usada tanto en la capa oculta como en la de salida.

La última mezcla estudiada estuvo compuesta por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Ca^{2+} . También en este caso la matriz de sensores empleada contenía 9 ISEs: el electrodo de membrana cristalina de Cu^{2+} , los dos sensores de calcio, dos réplicas de los electrodos de Cd^{2+} y Zn^{2+} y los dos genéricos. La arquitectura con la que se obtuvo el mejor modelo fue 27 neuronas en la capa de entrada (9 ISEs \times 3 coeficientes de Fourier), 8 neuronas en la capa oculta y 4 en la de salida, las funciones de transferencia empleadas fueron *tansig* para la capa oculta y *purelin* para la capa de salida.

En la Tabla 4.13 se muestra un resumen de los parámetros comparativos que se tuvieron en cuenta durante el proceso de optimización de las cuatro mezclas estudiadas. Se puede ver que los modelos obtenidos tienen muy buen ajuste, las rectas comparativas de regresión para los subconjuntos de entrenamiento son prácticamente iguales a la ideal, con coeficientes de correlación de 1.0, pendiente de 1.0 y ordenada de 0.0, además de valores bajos de RMSE. Los modelos tienen muy buena habilidad predictiva, siendo los valores de coeficientes de correlación, pendiente y ordenada para los subconjunto de validación externa de 1.0, 1.0 y 0.0, respectivamente, teniendo en cuenta los intervalos

de confianza. En los análisis de regresión todos los intervalos de confianza se calcularon para un 95 % de confiabilidad.

Tabla 4.13. Optimización de las arquitecturas de las ANNs.

Ion	Subconjunto de entrenamiento				Subconjunto de validación externa			
	Pendiente	Ordenada(mM)	R ²	RMSE	Pendiente	Ordenada(mM)	R ²	RMSE
Pb ²⁺	1.015 ± 0.016	-0.003 ± 0.054	0.999	0.018	1.050 ± 0.055	-0.023 ± 0.235	0.978	0.051
Cu ²⁺	1.014 ± 0.019	-0.003 ± 0.049	0.998	0.003	1.048 ± 0.084	-0.021 ± 0.328	0.957	0.069
Ca ²⁺	1.020 ± 0.036	-0.002 ± 0.027	0.999	0.010	0.947 ± 0.068	0.044 ± 0.317	0.963	0.051
Zn ²⁺	1.002 ± 0.003	-0.008 ± 0.014	0.999	0.007	0.978 ± 0.254	0.042 ± 0.253	0.974	0.042
Cu ²⁺	1.001 ± 0.001	-0.002 ± 0.005	0.999	0.008	0.974 ± 0.039	-0.026 ± 0.184	0.988	0.004
Ca ²⁺	1.002 ± 0.002	-0.006 ± 0.014	0.999	0.006	1.027 ± 0.053	-0.007 ± 0.180	0.979	0.016
Pb ²⁺	1.024 ± 0.029	-0.010 ± 0.040	0.998	0.031	0.955 ± 0.110	0.060 ± 0.311	0.958	0.070
Zn ²⁺	1.034 ± 0.041	-0.008 ± 0.037	0.998	0.009	0.990 ± 0.092	0.018 ± 0.209	0.971	0.072
Cu ²⁺	1.029 ± 0.038	-0.001 ± 0.034	0.999	0.022	0.991 ± 0.076	0.197 ± 0.118	0.960	0.067
Ca ²⁺	1.033 ± 0.037	-0.003 ± 0.029	0.999	0.013	0.970 ± 0.083	0.240 ± 0.023	0.975	0.065
Cd ²⁺	1.004 ± 0.008	-0.010 ± 0.039	0.999	0.013	0.945 ± 0.071	0.268 ± 0.298	0.954	0.057
Zn ²⁺	1.003 ± 0.008	-0.010 ± 0.036	0.999	0.086	0.935 ± 0.075	0.167 ± 0.394	0.959	0.099
Cu ²⁺	1.001 ± 0.001	-0.007 ± 0.004	0.999	0.012	0.968 ± 0.055	0.057 ± 0.406	0.968	0.045
Ca ²⁺	1.003 ± 0.007	-0.011 ± 0.036	0.999	0.007	1.040 ± 0.062	0.158 ± 0.252	0.968	0.032

4.9.2 Evaluación de la monitorización de los procesos de biosorción de mezclas multimetálicas con FIP-ET

El sistema FIP-ET se implementó a la sección del equipo en la que tiene lugar la biosorción (ver esquema del equipo Figura 3.5) con el objetivo de realizar el estudio de 4 mezclas compuestas por metales de transición y la consiguiente salida del ion Ca²⁺ del raspo de uva. Los experimentos se realizaron de la misma manera que en la aplicación anterior. Cada mezcla fue monitorizada inmediatamente después de realizar la calibración cruzada, evitando así una posible variabilidad en los potenciales por el efecto del tiempo. Las respuestas de las matrices de sensores fueron preprocesadas mediante la transformada de Fourier antes de realizar el tratamiento con las ANNs optimizadas previamente.

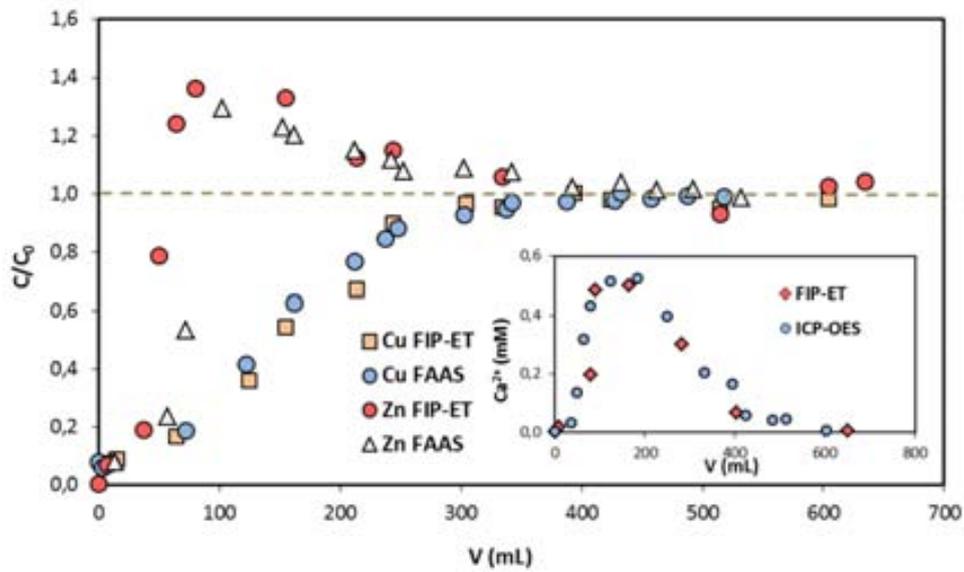


Figura 4.26. Curvas de ruptura para la biosorción de Zn^{2+} y Cu^{2+} en el raspo de uva, obtenidas por el sistema *on-line* FIP-ET y por FAAS. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+} obtenido por el sistema *on-line* FIP-ET y por ICP-OES.

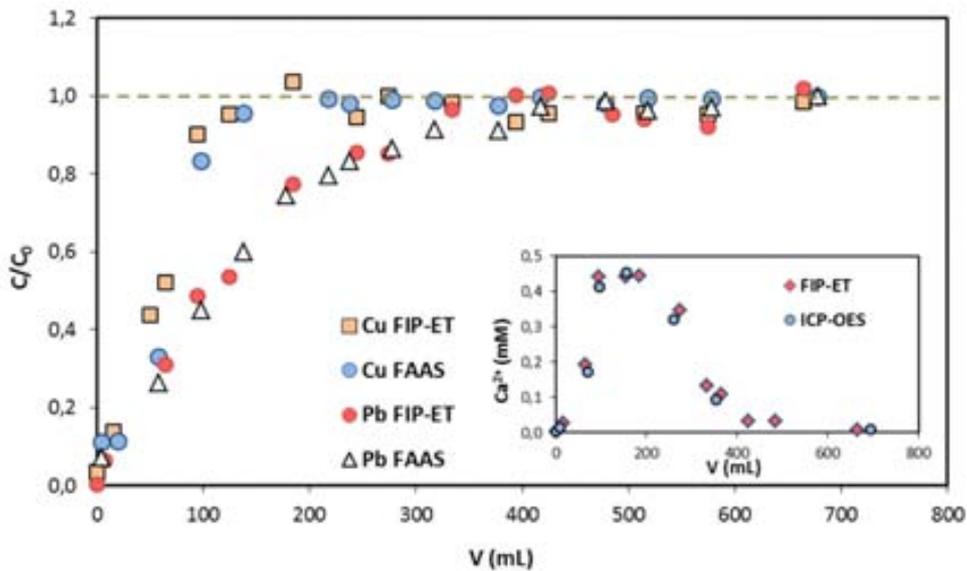


Figura 4.27. Curvas de ruptura para biosorción de Pb^{2+} y Cu^{2+} en el raspo de uva, obtenidas por el sistema *on-line* FIP-ET y por FAAS. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+} obtenido por el sistema *on-line* FIP-ET y por ICP-OES.

Las Figuras 4.26 a 4.29 muestran las curvas de ruptura para los procesos de biosorción de las mezclas estudiadas. En estas figuras además, se muestran las curvas de ruptura obtenidas por los métodos de referencia FAAS e ICP-OES para los metales de

transición y para el perfil de salida del calcio, respectivamente, como forma de validación del método propuesto. En todos los casos, se obtuvo muy buen ajuste entre las curvas obtenidas por el método propuesto (FIP-ET) y los métodos de referencia (AAS o ICP-OES).

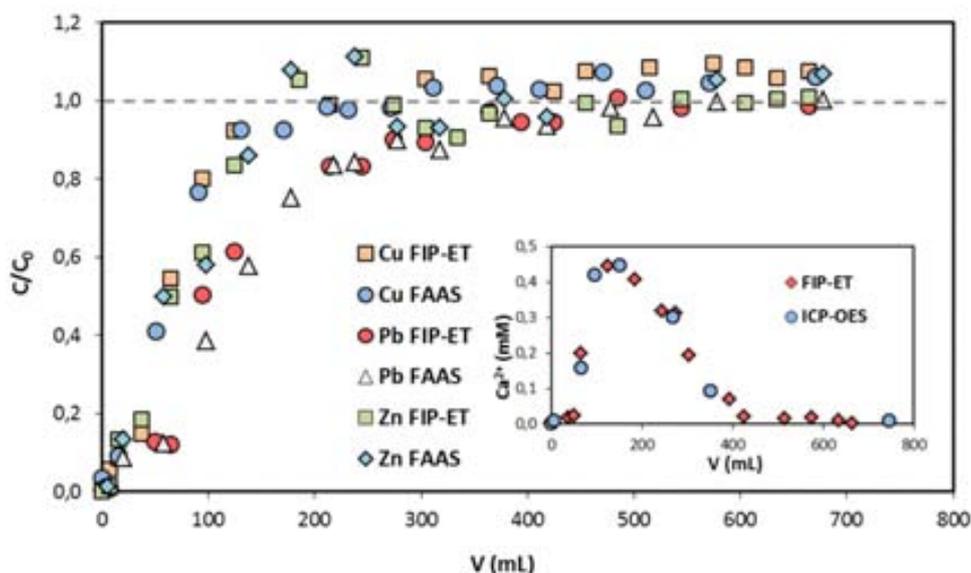


Figura 4.28. Curvas de ruptura para biosorción de Zn^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} en el raspo de uva, obtenidas por el sistema on-line FIP-ET y por FAAS. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+} obtenido por el sistema on-line FIP-ET y por ICP-OES.

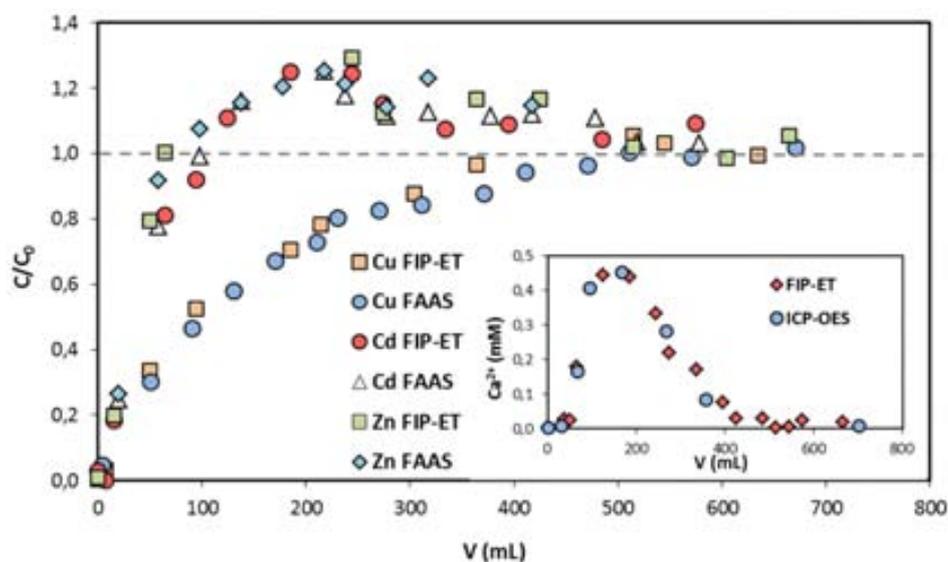


Figura 4.29. Curvas de ruptura para biosorción de Cd^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} en el raspo de uva, obtenidas por el sistema on-line FIP-ET y por FAAS. El gráfico insertado es el perfil de salida del Ca^{2+} obtenido por el sistema on-line FIP-ET y por ICP-OES.

Para tener una idea comparativa de la respuesta del sistema propuesto con los métodos de referencia seleccionados, se determinaron los valores de capacidad de sorción (q_0) para cada metal (Tabla 4.14). Los valores de error relativo fueron menores del 5 %, lo que evidencia que no hay diferencias significativas entre los métodos utilizados. En el caso del Zn^{2+} en el experimento mostrado en la Figura 4.26, se llega a un 7 % de error relativo. Esto puede ser indicativo a la necesidad de obtener más puntos en la zona de máxima absorción y así determinar con más precisión el valor de q_0 .

4.9.3 Rendimiento de la sorción para mezclas multicomponentes

Con los datos experimentales obtenidos mediante la técnica analítica FIP-ET, se evaluó el rendimiento del raspo de uva como biosorbente de mezclas de metales de transición en columnas de lecho fijo. Las capacidades de sorción para las mezclas binarias y ternarias se muestran en la Tabla 4.14.

En algunos de los sistemas estudiados la concentración sobrepasa la relación $C/C_0 = 1$, en las curvas de ruptura como se puede ver en las Figuras 4.26, 4.28 y 4.29. Este fenómeno se debe a que la afinidad del raspo de uva por los metales divalentes es diferente. Así en el primer caso (Figura 4.26), la afinidad del biosorbente es mucho mayor para los iones Cu^{2+} que para los iones Zn^{2+} (catión competitivo) provocando el reemplazamiento gradual de estos iones por Cu^{2+} en el interior de la columna del raspo de uva [25-28].

Por otro lado, la selectividad del raspo de uva por los iones Pb^{2+} es mayor que la que tiene por los otros tres metales; esto se puede comprobar en la Figura 4.27, donde el Cu^{2+} alcanza el punto de ruptura mucho antes que el Pb^{2+} . Este mismo efecto se observa con los iones Zn^{2+} y Cu^{2+} en el sistema (Pb/Cu/Zn/Ca) (Figura 4.28). Sin embargo el Cu^{2+} es mucho más afín para el biosorbente que los iones Cd^{2+} y Zn^{2+} como se puede ver en la Figura 4.29; por último, los iones Cd^{2+} y Zn^{2+} presentan una selectividad muy parecida, esto se puede comprobar en esta misma figura.

Tabla 4.14. Capacidad de sorción.

Sistema	Cación	FIP-ET	Método de referencia*	Error relativo (%)
		q_0 (mmol·g ⁻¹)	q_0 (mmol·g ⁻¹)	
Cu/Pb/Ca	Ca ²⁺	0.067	0.064	0.03
	Cu ²⁺	0.026	0.026	0.02
	Pb ²⁺	0.070	0.067	0.05
Cu/Zn/Ca	Ca ²⁺	0.069	0.066	0.04
	Cu ²⁺	0.065	0.062	0.04
	Zn ²⁺	0.015	0.014	0.07
Cu/Pb/Zn/Ca	Ca ²⁺	0.060	0.062	0.03
	Cu ²⁺	0.033	0.033	0.02
	Pb ²⁺	0.061	0.064	0.05
	Zn ²⁺	0.029	0.031	0.05
Cu/Zn/Cd/Ca	Ca ²⁺	0.060	0.061	0.01
	Cu ²⁺	0.059	0.062	0.05
	Zn ²⁺	0.014	0.014	0.01
	Cd ²⁺	0.021	0.020	0.03

* ICP-OES para calcio y FAAS para el resto de metales

Comparando las 4 curvas de ruptura obtenidas y teniendo en cuenta las capacidades de sorción resumidas en la Tabla 4.14, se puede establecer que el orden de afinidad del raspo de uva en las condiciones de estudiadas es: $Pb^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} \geq Cd^{2+}$, lo que es coherente con los datos reportados en la bibliografía para otros biosorbentes [28].

El estudio de los perfiles de salida del Ca²⁺ en todos los experimentos de biosorción realizados indica que el intercambio iónico es el mecanismo predominante. El contenido de Ca²⁺ que se libera del biosorbente en mmol·g⁻¹ se muestra en la Tabla 4.14, observándose que la cantidad de Ca²⁺ liberada en los sistemas binarios es mayor que en los ternarios. Esto indica que el intercambio de Ca²⁺ en los sistemas ternarios es menor debido a que el biosorbente tiene mucho más afinidad por este ion que por el Zn²⁺ y el Cd²⁺ como se ha reportado para otros biosorbentes [28].

4.10 Bibliografía

- [1] E. Otazo, L. Pérez, O. Estévez, S. Rojas, J. Alonso, Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes, *J. Chem. Soc. Perkin T. 2*, 292 (2001) 2211-2218.
- [2] E.I. Thiam, M. Diop, M. Gaye, A.S. Sall, A.H. Barry, 1,2-Bis(N'-benzoylthioureido) benzene, *Acta Crystallogr. Sect. E.-Struct Rep. Online*, 64 (2008) O776-U1171.
- [3] O. Estévez, E. Otazo, J. de Cisneros, I. Naranjo, E. Reguera, A Raman and infrared study of 1-furoyl-3-monosubstituted and 3,3-disubstituted thioureas, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 62 (2005) 964-971.
- [4] E. Otazo, P. Ortiz, O. Estévez, L. Perez, I. Goicoechea, A.C. Beltrán, J.R. Villagómez, Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy metal ion selective electrodes. A nuclear magnetic resonance study, *Spectroc. Acta Pt. A-Molec. Biomolec. Spectr.*, 58 (2002) 2281-2290.
- [5] N. Tavakkoli, M. Shamsipur, Lead-Selective Membrane Electrode Based on Dibenzopyridino-18-Crown-6, *Anal. Lett.*, 29 (1996) 2269-2279.
- [6] T. Rosatzin, E. Bakker, K. Suzuki, W. Simon, Lipophilic and immobilized anionic additives in solvent polymeric membranes of cation-selective chemical sensors *Anal. Chim. Acta*, 280 (1993) 197-208.
- [7] S.Y. Kazemi, M. Shamsipur, H. Sharghi, Lead-selective poly(vinyl chloride) electrodes based on some synthesized benzo-substituted macrocyclic diamides, *J. Hazard. Mater.*, 172 (2009) 68-73.
- [8] H. Karamia, M.F. Mousavi, M. Shamsipur, Flow injection potentiometry by a new coated graphite ion-selective electrode for the determination of Pb^{2+} , *Talanta*, 60 (2003) 775-786.
- [9] M.M. Ardakania, M.K. Kashania, M. Salavati-Niasaria, A.A. Ensafib, Lead ion-selective electrode prepared by sol-gel and PVC membrane techniques *Sens. Actuator B-Chem.*, 107 (2005) 438-445.
- [10] S.S.M. Hassan, M.H.A. Ghalia, A.G.E. Amr, A.H.K. Mohamed, New lead (II) selective membrane potentiometric sensors based on chiral 2,6-bis-pyridinecarboximide derivatives, *Talanta*, 60 (2003) 81-91.

- [11] X. Lu, Z. Chen, S.B. Hall, X. Yang, Evaluation and characteristics of a Pb(II) ion-selective electrode based on aquatic humic substances, *Anal. Chim. Acta*, 418 (2000) 205-212.
- [12] A. Abbaspour, E. Mirahmadi, A. Khalafi-nejad, S. Babamohammadi, A highly selective and sensitive disposable carbon composite PVC-based membrane for determination of lead ion in environmental samples, *J. Hazard. Mater.*, 174 (2010) 656–661.
- [13] M.F. Mousavi, S. Sahari, N. Alizadeh, M. Shamsipur, Lead ion-selective membrane electrode based on 1,10-dibenzyl-1,10-diaza-18-crown-6, *Anal. Chim. Acta*, 414 (2000) 189-194.
- [14] A. Abbaspour, F. Tavakol, Lead-selective electrode by using benzyl disulphide as ionophore, *Anal. Chim. Acta*, 378 (1999) 145-149.
- [15] G. Horvai, E. Pungor, Comparative study on the precision of potentiometric techniques applied with ion selective electrodes. Part 1. Direct techniques, *Anal. Chim. Acta*, 113 (1980) 287-294.
- [16] M. Püntener, T. Vigassy, E. Baier, A. Ceresa, E. Pretsch, Improving the lower detection limit of potentiometric sensors by covalently binding the ionophore to a polymer backbone, *Anal. Chim. Acta*, 503 (2004) 187-194.
- [17] M.R. Ganjali, M.R. Pourjavid, M. Shamsipur, T. Poursaeri, M. Rezapour, M. Javanbakht, H. Shargi, *Anal. Sci.*, 19 (2003) 995-999.
- [18] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, Multivariate Data Analysis in Electroanalytical Chemistry, *Electroanal.*, 14 (2002) 1533-1542.
- [19] A. Mimendia, J.M. Gutiérrez, L. Leija, P.R. Hernández, L. Favari, R. Muñoz, M. del Valle, A review of the use of the potentiometric electronic tongue in the monitoring of environmental systems, *Environ. Modell. Softw.*, 25 (2010) 1023-1030.
- [20] M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle, Potentiometric bioelectronic tongue for the analysis of urea and alkaline ions in clinical samples, *Biosens. Bioelectron.*, 22 (2007) 2171-2178.
- [21] Commission of the European Communities, 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture, in: , *Official Journal L 181*, 1986, 0006–0012.

- [22] A. Florido, C. Valderrama, S. Nualart, L. Velazco-Molina, O.A. de Fuentes, M. del Valle, Computer controlled-flow injection potentiometric system based on virtual instrumentation for the monitoring of metal-biosorption processes, *Anal. Chim. Acta*, 668 (2010) 26-34.
- [23] C. Valderrama, J. Barios, A. Farrán, J. Cortina, Evaluation of Phenol/Aniline (Single and Binary) Removal from Aqueous Solutions onto Hyper-cross-linked Polymeric Resin (Macronet MN200) and Granular Activated Carbon in Fixed-Bed Column, *Water Air Soil Poll.*, 215 (2011) 285-297.
- [24] I. Villaescusa, N. Fiol, M. Martínez, N. Miralles, J. Poch, J. Serarols, Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes, *Water Res.*, 38 (2004) 992-1002.
- [25] M.M. Figueira, B. Volesky, K. Azarian, V.S.T. Ciminelli, Biosorption column performance with a metal mixture, *Environ. Sci. Technol.*, 34 (2000) 4320-4326.
- [26] G. Naja, B. Volesky, Multi-metal biosorption in a fixed-bed flow-through column. *Colloids and Surfaces A: Physicochem, Eng. Aspects*, 281 (2006) 194-201.
- [27] A.H. Hawari, C.N. Mulligan, Heavy metals uptake mechanisms in a fixed-bed column by calcium-treated anaerobic biomass, *Process Biochem.*, 42 (2007) 1546-1552.
- [28] D. Kratochvil, B. Volesky, Multicomponent biosorption in fixed beds, *Water Res.*, 34 (2000) 3186-3196.

5 CONCLUSIONES GENERALES

A partir del análisis de los resultados obtenidos podemos llegar a las siguientes conclusiones.

Relacionadas con el desarrollo de nuevos electrodos selectivos a iones:

1. Se sintetizaron y caracterizaron satisfactoriamente dos bis-tioureas nóveles, no reportadas en la literatura científica. Por su gran capacidad para formar complejos reversibles con Pb(II) fueron empleadas como elementos de reconocimiento en membranas polimérica de portador móvil neutro.
2. Con las dos nuevas bis-tioureas obtenidas se prepararon diferentes membranas selectivas que fueron optimizadas satisfactoriamente para la determinación de Pb(II).

3. Se obtuvieron dos nuevos electrodos selectivos a Pb(II) que fueron completamente caracterizados, mostrando muy buenas características de respuesta, límite de detección cercano a 10^{-6} M, sensibilidad Nernstiana y muy buena selectividad, siendo el Cu^{2+} la especie interferente que más afecta a las dos membranas; parámetros analíticos comparables con otros ISEs reportados en la literatura. La diferencia estructural (grupo terminales: furoilo y benzoilo) entre los dos ionóforos propuestos solo se manifestó en el tiempo de vida, que fue mucho mayor para membrana de FTB y la selectividad, que también para la membrana de FTB fue superior frente a los principales iones interferentes (Cu^{2+} , Cd^{2+} y Zn^{2+}).
4. Teniendo en cuenta la caracterización realizada de los ISEs propuestos se seleccionaron las principales condiciones experimentales para una aplicación analítica, como por ejemplo el pH de trabajo de 4, empleando un tampón (acético/acetato), el método de adición de estándar, como técnica de determinación, entre otras.
5. Los dos ISEs propuestos mostraron ser adecuados para la determinación de Pb(II) en muestras complejas. Se aplicaron a la determinación de este metal en muestras de suelos con niveles de concentración entre 18 y 36 mg/Kg y los resultados fueron validados satisfactoriamente con un método de referencia.

Conclusiones relacionadas con las aplicaciones desarrolladas con lenguas electrónicas para medidas en batch:

6. Se construyeron 10 electrodos selectivos de configuración convencional (para medidas en batch), incluyendo los desarrollados en los estudios previos, para ser aplicados en diferentes determinaciones de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) con lenguas electrónicas.
7. Se realizó la caracterización cruzada de los electrodos construidos teniendo en cuenta la respuesta de los cuatro iones de interés. Según los valores de coeficiente de selectividad obtenidos (-1.5 o superior para la mayoría de los ISEs); se comprobó la existencia de respuesta cruzada, premisa necesaria en las lenguas

electrónicas para llevar a cabo una multideterminación. Los límites de detección entre 10^{-7} y 10^{-6} M fueron adecuados para las aplicaciones previstas, excepto para el caso del Cd(II), por el bajo nivel de concentración en que se encuentra generalmente este metal en muestras de suelo.

8. Se construyó una lengua electrónica potenciométrica basada en 9 electrodos selectivos de iones y ANNs como técnica de procesamiento avanzado, para la determinación simultánea de trazas de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras ambientales con niveles de concentración entre 10^{-7} y 10^{-3} M de los cuatro analitos.
9. Se seleccionaron las condiciones experimentales adecuadas partiendo de la caracterización realizada para construir el modelo mediante ANN. Se logró optimizar satisfactoriamente la arquitectura de la ANN, los mejores resultados se obtuvieron con 6 neuronas en la capa oculta, con las funciones de transferencia *logsig* y *tansig* en la capa oculta y de salida, respectivamente.
10. El modelo optimizado mostró muy buena habilidad predictiva para la determinación de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en las muestras de validación externa, con coeficientes de correlación superiores a 0.98; las pendientes y ordenadas también fueron significativas, los intervalos de confianza obtenidos incluyen los valores ideales de 1.0 y 0.0 para la pendiente y la ordenada respectivamente. Según estos resultados fue posible aplicar la lengua electrónica al análisis de Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras reales.
11. Se obtuvo muy buena correlación para la determinación de Cu(II), Zn(II) y Pb(II) en muestras de suelo al ser comparados con el método de referencia ICP-MS, los valores de coeficiente de correlación obtenidos fueron superiores a 0.95 para los tres analitos. El bajo contenido de Cd(II) en las muestras de suelo no permitió obtener resultados satisfactorios para este elemento.

Conclusiones del método de valoración complexométrica con detección del punto final con una ET.

12. Se propone por primera vez la resolución de mezclas ternarias de metales de transición empleando una lengua electrónica (formada por 8 ISEs, 5 con respuesta primaria a Cu(II), Cd(II) y Pb(II) y tres genéricos) como sistema de detección en una valoración complexométrica.
13. Con un número fijo de 5 adiciones de agente valorante EDTA se logró obtener un modelo de respuesta muy bien ajustado, con bajos valores de RMSE y buena correlación entre los valores de concentraciones esperadas vs. obtenidas para las muestras de entrenamiento con rango de concentración entre 2.0×10^{-6} y 2.0×10^{-3} M de los tres iones de interés.
14. El modelo optimizado mostró muy buena habilidad predictiva para el análisis de Cu(II), Cd(II), y Pb(II) en las muestras de validación externa, con valores de precisión de 4.10 % para Cd^{2+} , 5.20 % para Cu^{2+} y 3.00 % para Pb. Lo que permitió la aplicación de la estrategia analítica propuesta en la resolución de mezclas ternarias de estos iones en muestras reales.
15. La combinación del método de valoración complexométrica con una lengua electrónica potenciométrica como técnica de detección del punto final, fue una estrategia analítica apropiada para la resolución de mezclas ternarias de metales de transición (Cu^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}). El equivalente a esta determinación mediante procedimientos convencionales se considera inviable, lo que demuestra el potencial de la aproximación realizada.

Conclusiones relacionadas con las aplicaciones desarrolladas con lenguas electrónicas para monitorización de procesos:

16. Se construyeron 10 ISEs de configuración tubular con respuesta a Ca (II), Cu(II), Cd(II), Zn(II) y Pb(II) para monitorizar diferentes procesos de biosorción.

17. Se realizó la caracterización cruzada de los electrodos construidos hacia los 5 iones de interés. Los valores de los coeficientes de selectividad obtenidos para algunos ISEs superiores a -1.5 y para otros superiores a -2.5, muestran la existencia de respuesta cruzada. La sensibilidad fue Nernstiana para los iones principales en todos los casos y los límites de detección entre 10^{-7} y 10^{-6} M, parámetros adecuados para las aplicaciones propuestas.
18. Se optimizó la velocidad del flujo, el volumen de inyección de muestra y la composición de la disolución portadora. Con un caudal de $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y con 60 s de apertura de válvula se obtuvieron picos adecuados para toda la matriz de sensores que permiten desarrollar un buen análisis de FIA.
19. Para la monitorización del proceso de biosorción de cobre y el perfil de salida del calcio del raspo de uva, se construyó una lengua electrónica potenciométrica basada en 5 ISEs, de los caracterizados previamente (3 con respuesta primaria a Ca^{2+} y Cu^{2+} y dos genéricos con respuesta a los dos iones).
20. Se seleccionaron las condiciones experimentales óptimas para construir el modelo mediante ANN. Se logró optimizar satisfactoriamente la arquitectura de la ANN, los mejores resultados se obtuvieron con 8 neuronas en la capa oculta y con las funciones de transferencia *tansig* y *purelin* en la capa oculta y de salida, respectivamente.
21. El modelo optimizado mostró muy buena habilidad predictiva para la determinación de Ca(II) y Cu(II) en las muestras de validación externa, los coeficientes de correlación determinados mediante los análisis de regresión realizados fueron altamente significativos, de 0.974 y 0.994 para Cu^{2+} y Ca^{2+} respectivamente, y las pendientes de 0.96 ± 0.06 para Ca^{2+} y 0.91 ± 0.12 Cu^{2+} , resultados que permitieron la aplicación de la lengua electrónica en el análisis de estos iones en muestras reales.

22. Con el sistema FIP-ET propuesto se logró monitorizar de forma automatizada el proceso de biosorción estudiado, obteniendo las curvas de ruptura del cobre y el perfil de salida del calcio del raspo de uva.
23. El método de determinación convencional de calibración con un electrodo selectivo mostró tener errores debido a la fuerte interferencia en las etapas de mayor intercambio iónico. En el caso del sistema propuesto FIP-ET se obtuvieron resultados con muy buena correlación cuando se comparan con los obtenidos con los métodos de referencia FAAS para cobre (0.994) y ICP-OES para calcio (0.995).
24. Con los datos generados por el sistema propuesto (FIP-ET) se obtuvieron los principales parámetros de la biosorción. La capacidad de sorción (q_0) obtenida experimentalmente se diferencia un 3.7 % de la calculada por el modelo teórico de Thomas; la capacidad de sorción del volumen del lecho (N_0) fue semejante a la obtenida por el modelo de BDST, con una diferencia de 4.2 % y el tiempo requerido para alcanzar el 50 % del sorbato (θ_r) también fue cercano al obtenido por el modelo de Yoon-Nelson con una diferencia de 1.4 %. El valor del MPSD obtenido de 9.67 indica un buen ajuste entre los tres modelos teóricos utilizados y el obtenido experimentalmente. Además se determinó que el mecanismo predominante es el de intercambio iónico.

Conclusiones de la aplicación del sistema FIP-ET para la monitorización de los procesos de biosorción de mezclas multimetálicas en raspo de uva:

25. La versatilidad de la matriz de sensores construida, permitió configurar diferentes combinaciones de ISEs con las que se logró estudiar satisfactoriamente los procesos de biosorción de mezclas multimetálicas en el raspo de uva.
26. Se lograron obtener modelos satisfactorios para monitorizar todas las mezclas estudiadas empleando transformadas de Fourier como método de preprocesamiento de la señal. Tanto para las mezclas de tres componentes (Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ca^{2+}) y (Cu^{2+} , Pb^{2+} y Ca^{2+}) y las cuaternarias (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} y Ca^{2+}) y (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Ca^{2+}), se obtuvieron pendientes prácticamente ideales, y coeficientes de

correlación superiores a 0.998 en todos los análisis de regresión realizados para las muestras de entrenamiento.

27. Los modelos optimizados en todos los casos mostraron buena habilidad predictiva, resultados que se infieren del análisis de regresión de las muestras de validación externa. Los valores de las pendientes fueron mayores que 0.947 ± 0.068 , peor resultado obtenido, que corresponde a la determinación de calcio en la primera mezcla estudiada. Los valores de RMSE fueron inferiores a 0.099 y los coeficientes de correlación superiores a 0.954.
28. Con el sistema FIP-ET se monitorizaron las 4 mezclas de interés, obteniendo las curvas de rupturas características de los metales absorbidos (Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+}) y el perfil de salida del Ca^{2+} del raspo de uva.
29. En las determinaciones de los 5 componentes se obtuvieron errores relativos cercanos al 5 %, valores contrastados con los métodos de referencias (FAAS y ICP-OES).
30. El estudio de los diferentes parámetros de biosorción en las mezclas, permitió obtener el orden de selectividad del raspo de uva hacia los diferentes metales evaluados, quedando de la siguiente manera: $\text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \geq \text{Cd}^{2+}$.

Como conclusiones generales de esta tesis doctoral es posible plantear que:

- I. Las lenguas electrónicas, como estrategias de cuantificación tienen las ventajas de ser una alternativa económica y versátil a los métodos establecidos para la determinación de trazas de metales transición en muestras complejas.
- II. La combinación de una matriz de sensores con técnicas establecidas como el análisis por inyección en flujo o las valoraciones complexométricas, con una adecuada selección de los métodos de tratamiento de los datos, potencia la capacidad analítica de estos procedimientos, permitiendo abordar problemas analíticos complejos.

6 ARTÍCULOS PUBLICADOS

(Aprobados para la solicitud de tesis)

1. Lead (II) ion selective electrodes with PVC membranes based on two bis-thioureas as ionophores: 1,3-bis(N-benzoylthioureido)benzene and 1,3-bis(N-furoylthioureido)benzene, Deivy Wilson, María de los Ángeles Arada, Salvador Alegret, Manel del Valle, *J. Hazard. Mater.*, 18 (2010), 140-146.
2. Potentiometric electronic tongue-flow injection analysis system for the monitoring of heavy metal biosorption processes, Deivy Wilson, Manel del Valle, Salvador Alegret, Cesar Valderrama, Antonio Florido, *Talanta*, 93 (2012), 285-292.
3. Potentiometric Electronic Tongue to Resolve Mixtures of Sulfide and Perchlorate Anions, Deivy Wilson, Mohammed Nooredeen Abbas, Abd Ellatef Abbas Radwan, Manel del Valle, *Sensors*, 11 (2011), 3214-3226.

ARTÍCULO 1

Lead (II) ion selective electrodes with PVC membranes based on two bis-thioureas as ionophores: 1,3-bis(N-benzoylthioureido)benzene and 1,3-bis(N-furoylthioureido)benzene, **Deivy Wilson**, María de los Ángeles Arada, Salvador Alegret, Manel del Valle, *J. Hazard. Mater.*, 18 (2010), 140-146.



Lead(II) ion selective electrodes with PVC membranes based on two bis-thioureas as ionophores: 1,3-bis(N'-benzoylthioureido)benzene and 1,3-bis(N'-furoylthioureido)benzene

Deivy Wilson^{a,b}, María de los Ángeles Arada^b, Salvador Alegret^a, Manel del Valle^{a,*}

^a Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, Edifici Cn, 08193 Bellaterra, Catalonia, Spain

^b Department of Chemistry, Universidad de Oriente, Ave. Patricio Lumumba s/n, 90500 Rpto Jiménez, Santiago de Cuba, Cuba

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 January 2010

Received in revised form 23 March 2010

Accepted 27 April 2010

Available online 2 May 2010

Keywords:

Lead ion selective electrode

Bis-thiourea

PVC membrane

Potentiometric sensor

ABSTRACT

Two PVC membrane ion selective electrodes for Pb(II) ion based on two bis-thioureas: 1,3-bis(N'-benzoylthioureido)benzene and 1,3-bis(N'-furoylthioureido)benzene as ionophores, are reported. A first membrane formulated using 1,3-bis(N'-benzoylthioureido)benzene as carrier exhibited a Nernstian response to Pb(II) over a wide concentration range (4.0×10^{-6} to 1.0×10^{-2} M) with a slope of 31.5 ± 1.6 mV/dec. It showed a fast response time ($t_{90\%} = 14$ s) and could be used for 10 weeks without any divergence in potentials. The membrane formulated using 1,3-bis(N'-furoylthioureido)benzene as carrier exhibited a Nernstian response in the concentration range (5.0×10^{-6} to 1.0×10^{-2} M), with a slope of 30.0 ± 1.3 mV/dec. Its response time was $t_{90\%} = 14$ s, and it could be used for 14 weeks without any divergence in potentials. The two proposed potentiometric sensors revealed acceptable selectivities for Pb(II) over a wide variety of other metal ions and could be used in a pH range of 2.2–6.0. Both electrodes were assayed in direct potentiometric determination of lead in soils (10–30 mg/kg range) with very good performance (0.99935 correlation coefficient in the comparison against ICP-MS method).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, there is a growing interest on research directed to the automation of environmental control, industrial processes and clinical analysis in the medicine field. This progress has encouraged the development of materials for the recognition and sensing of highly pollutant chemical species, such as the heavy metals, which may harm different ecosystems and, in general, the human health.

In this sense, thiourea derivatives are a versatile family of ligands able to form complexes with transition metals and post-transition metals, such as: Ni(II), Cu(II/I), Co(III), Zn(II), Ag(I), Cd(II), Pt(II), Pd(II), Au(III), Rh(III), Re(III), Tc(III), Pb(II), Sb(III), and Bi(III) [1–3]. Coordination chemistry of thiourea derivatives is diverse; they contain S and N atoms which are donor sites available to coordinate with metal ions, but also present specific effects caused by the conformational isomerism, steric hindrance, presence of donor sites in the substituent groups or existence of intra-molecular interactions. This versatility as ligands has fostered the use of thiourea derivatives towards new applications in the field of chemical sensors.

When examining the scientific literature, a number of contributions appear about this topic. Otazo et al. described 46 thiourea derivatives as potential ionophores for ion selective electrodes (ISEs). Some of these were used in potentiometric sensors for heavy metals Pb(II), Cd(II) and Hg(II) [4]. The use of thiourea derivatives was also proposed in the voltammetric determination of Pd(II) and Cd(II) [5,6]. A very recent contribution of Singh et al. described a polymeric membrane electrode with a thiourea derivative as ionophore in the determination of ytterbium with a very low detection limit (5.5×10^{-8} M) [7].

Thiourea derivatives have been generally used in cation selective electrodes by their well known property of forming complex with metal ions. Opposite to this, there are some reports where the thiourea derivatives are used as neutral carriers in selective electrodes for anions [8,9]. Besides, compounds with bis-thiourea functional groups called podands (two arms) have been described in anion selective electrodes [8,9]; podands fundament their interaction on the complex formation with anions through hydrogen bonds [10].

In our case, the possibility that bis-thioureas may be forming complexes with heavy metals is an alternative which has not been sufficiently explored but constitutes an interesting option to obtain ISEs for heavy metals with good performance. Some reports show that molecules with bis-amide and bis-thioamide functional groups

* Corresponding author. Tel.: +34 93 5811017; fax: +34 93 5812379.

E-mail address: manel.delvalle@uab.es (M. del Valle).

[11–15] may be employed as ionophores in the determination of Cd(II) and Pb(II).

In this work, it is presented the synthesis and characterization of two new bis-thioureas 1,3-bis(*N'*-benzoylthioureido)benzene (BTB) and 1,3-bis(*N'*-furoylthioureido)benzene (FTB), and their performance results as ionophores in polymeric membrane electrode for heavy metals, specifically Pb(II), Cu(II), Cd(II) and Zn(II). Besides, the detailed application of the proposed sensors in the determination of Pb(II) in a polluted soil sample is described and validated.

2. Experimental

2.1. Reagents

The reagents employed in the bis-thiourea synthesis were ammonium thiocyanate (Sigma–Aldrich), *m*-phenylenediamine (Aldrich), furoyl chloride (Fluka), benzoyl chloride (Sigma–Aldrich). The solvents acetone (Panreac), tetrahydrofuran (THF, Fluka), methanol (Panreac), benzene and chloroform (J.T. Baker). The ion selective poly(vinyl chloride) (PVC) membranes were prepared from high-molecular weight PVC (Fluka), using dioctyl sebacate (DOS) and *o*-nitrophenyloctyl ether (*o*-NPOE) (both from Fluka) as plasticizers. The additive used was potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KpClPB) (Fluka). The materials used to prepare the solid electrical contact were the epoxy resin components: Araldite M, Araldite M hardener, Araldite M accelerator, dibutyl phthalate (all from Fluka), and graphite powder (BDH, UK) as conductive filler. Other reagents used were of analytical grade; solutions were prepared in doubly distilled water.

2.2. Apparatus

Infrared (IR) spectra were recorded on a spectrophotometer (Tensor 27, Bruker, Germany) in the range of 4000–400 cm^{-1} with Golden Gate attenuated total reflectance (ATR). Mass spectrometry (MS) was performed using ion trap mass spectrometry with electrospray ionization (Esquire 3000, Bruker, Germany). The elemental analysis (EA) was performed using Elemental Analyzer CHNS (3011, EuroVector, Italy). The reference method for lead soil determination were made employing ICP-MS equipment (Agilent 7500ce, Santa Clara, CA).

The emf measurements were performed with a laboratory-made data acquisition system consisting of 32 input channels made with differential instrumentation amplifiers (INA116, Burr-Brown, USA) that adapted the impedance for each sensor. Emf measurements were performed against a double junction Ag/AgCl reference electrode (Thermo Orion 90-02-00). Each channel was noise-shielded with its signal guard. The output of each amplified channel was filtered with a second order low pass active filter centred at a 2 Hz frequency and connected to an Advantech PC-Lab 813 A/D conversion card installed in a PC. Readings were acquired by using custom software developed by our group in Microsoft QuickBasic Version 4.5.

2.3. Synthesis of ionophores

To a mixture of 25 mmol (1.903 g) of ammonium thiocyanate and 25 mL of acetone, a solution formed by 25 mmol (2.897 g) of benzoyl chloride or 2.460 g of furoyl chloride) in 13 mL of acetone was added dropwise. The resulting mixture was stirred under reflux for 1 h and cooled to room temperature. A solution of 12.5 mmol (2.460 g) of 1,3-diaminobenzene in 5 mL of acetone was then added. The solution obtained was stirred at room temperature during 2 h. After cooling, the reaction mixture was poured slowly into 600 mL

of iced water with strong stirring. The bis-thiourea precipitated was filtered and washed with 3×50 mL of water and vacuum dried. For the recrystallization, a mixture of methanol:chloroform (1:1) was employed for (FTB) and THF for (BTB) [4,16]. The purity was tested by TLC using benzene–chloroform (90:10) as solvent.

2.4. Characterization of bis-thioureas

The structures of bis-thioureas were established through Spectroscopic techniques (IR, ^1H NMR), mass spectrometry (MS) and elemental analysis (EA). The molecular weight values and qualitative analysis data correspond favourably with those expected. In the IR a large number of signals are observed with pronounced overlapping resulting in relatively complex spectra. In the study of thiourea derivatives using IR spectroscopy, usually a set of fundamentals involving the N–C and C=S bonds are identified and can be used as indicators of the electronic structure around these bonds. In compounds containing the thioamide group (HNCS) these fundamentals are known as “thioamide” bands: I, II, III and IV [17,18]. These bands have a large contribution from $\nu(\text{C–N}) + \delta(\text{NH})$ (I), $\nu(\text{C–N}) + \nu(\text{C=S})$ (II and III) and $\nu(\text{C=S})$ (IV) motions and are usually reported around 1470, 1250, 1080 and 750 cm^{-1} , respectively [18].

2.5. PVC membranes and sensors

Potentiometric sensors used were all-solid-state ion selective electrodes (ISEs) with a solid electrical contact made from a conductive composite. They were constructed by following a standard procedure developed in our laboratory [19]. Polymeric PVC membranes were formed by solvent casting of a membrane cocktail further diluted with THF (1 mL per 20 mg PVC) on a previously formed 1:1 epoxy–graphite composite solid contact. Membranes were dried and conditioned in a 0.1 M solution of their primary ion for 24 h before use.

2.6. Evaluation of potentiometric response

Sensor calibration consisted on the recording of potential after accumulated microadditions of concentrated primary ion solution over a fixed initial volume. The detection limit (LD) was taken as the intersection of the two asymptotic behaviours of the calibration curve, as recommended by IUPAC [20]. Reproducibility was examined by repeated monitoring of the slope and the LD of calibration curve. The activity coefficients of ions in solution were calculated according to the Debye–Hückel formalism [21]. Selectivity characteristics were determined according to the IUPAC recommended fixed interference method [22] (FIM). pH influence, determined as the Reilley diagram [23] was recorded in a NaOH solution at two concentration of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ solution (of 1.0×10^{-3} and 1.0×10^{-4} M) varying the pH from 10 to 2 with HNO_3 . The response time ($t_{90\%}$) of tested sensors was determined as the time required to achieve 90% of steady potential [24] corresponding to four additions of primary ion, when the concentrations were rapidly increased by 1 dec.

2.7. Lead soil determination

For lead soil determination, 4 g of soil were placed in a 100 mL round bottom flask with 31 mL concentrated nitric acid (65%). After fitting a water condenser, the mixture was heated to boiling until the volume was reduced to 10 mL. 25 mL of water were next added down the condenser before filtration of the mixture. The filtered residue was rinsed twice with 5 mL of water, reunited with the extract, and then diluted with deionized water to mark of volumetric flask. The lead content was measured using the proposed

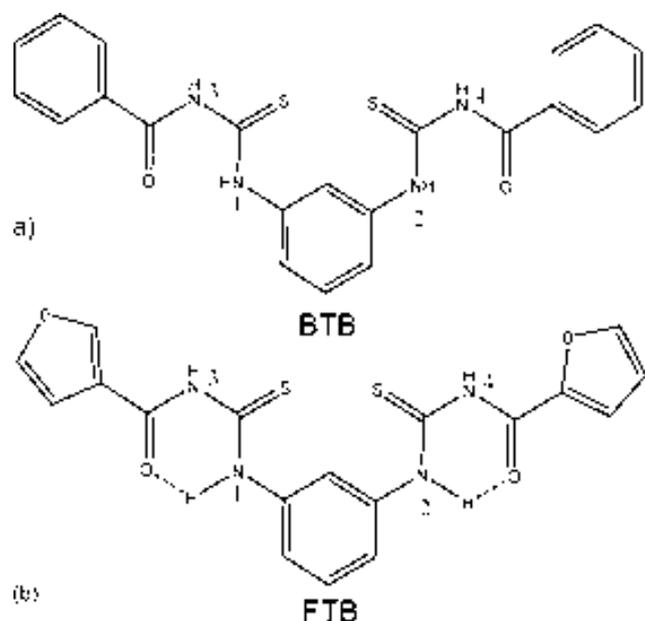


Fig. 1. Structure of bis-thioureas used as ionophores. (a) 1,3-bis(*N*-benzoylthioureido)benzene (BTB) and (b) 1,3-bis(*N*-furoylthioureido)benzene (FTB).

Pb(II)-sensors and also by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

3. Results and discussion

3.1. Synthesis and characterization of bis-thioureas

The bis-thioureas suggested as ionophores (Fig. 1) have as clear advantage a quick and easy synthesis and purification. They contain furoyl, or benzoyl groups to increase their lipophilicity, a desired feature to promote their solubility in the polymeric membrane and to prevent leaching to the aqueous solutions tested. Besides, the different coordination sites (N, O and S) in specific geometry and with different chemical hardness can influence selectivity towards different metals. Table 1 shows the main data of the synthesis and characterization of both compounds. Good yields were obtained of 79.2 and 84.9% for FTB and BTB, respectively.

The main IR bands have been identified and Table 1 shows their frequency values. The stretches of N–H groups vibrations at 3322 and 3271 cm^{-1} for BTB and FTB, respectively. Carbonyl vibration $\nu(\text{C}=\text{O})$ detected to 1666 cm^{-1} for BTB and 1667 cm^{-1} for FTB. There is a shift of these bands to shorter wavelengths than expected; this is attributed by several authors [4,16,25] to the formation of intramolecular hydrogen bonds (Fig. 1b). In this configuration the S atom is arranged outside the molecule preventing the formation of very stable chelates.

Table 1
Characterization of the bis-thioureas synthesized.

Ionophore	Yield (%)	m.p. ($^{\circ}\text{C}$)	Chemical formula	Mass spectrum m/z (M^+)	Elemental analysis	IR	^1H NMR (DMSO- d_6)
BTB	84.9	218 \pm 2	$\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ (434.5)	434.1	Calculated: C, 60.81; H, 4.18; N, 12.89; S, 14.76. Found: C, 59.07; H, 4.05; N, 12.05; S, 14.32.	ν 3322 (NH), 1666 (C=O), 1523 (I), 1260 (II), 1142 (III), 738 (IV)	6.48–8.22 (m, 14H, arom. H), 11.32 (s, 2H, 2NH), 12.20 (s, 2H, 2NH)
FTB	79.2	226 \pm 2	$\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}_2$ (414.5)	413.1	Calculated: C, 52.16; H, 3.40; N, 13.52; S, 15.47. Found: C, 51.97; H, 3.35; N, 13.55; S, 15.32.	ν 3271 (NH), 1667 (C=O), 1518 (I), 1237 (II), 1073 (III), 752 (IV)	6.45–8.13 (m, 10H, arom. H), 11.21 (s, 2H, 2NH), 12.11 (s, 2H, 2NH)

In 1523 cm^{-1} (BTB) and 1518 cm^{-1} (FTB) a medium intensity band appears thioureido band I, thioureido band II observed at 1260 and 1237 cm^{-1} for BTB and FTB, respectively, thioureido band III at 1142 cm^{-1} for BTB and 1073 cm^{-1} for FTB, and thioureido band IV at 738 and 752 cm^{-1} for BTB and FTB, respectively.

In the ^1H NMR spectra of both compounds, 3 main groups of signals are observed: two D_2O exchangeable singlets were assigned to NH protons and a multiplet corresponding to aromatic protons. The most deshielded signal ($\delta = 12.20$ and 12.11 ppm for BTB and FTB, respectively) was assigned to N (3)H and N (4)H. This chemical shift is that high because these protons form hydrogen bonds [4,16,25]. This was demonstrated by a correlation analysis of δ NH in DMSO- d_6 vs. σ Hammett and by addition of europium (III) in CDCl_3 [26]. The signal assigned to protons N (1)H and N (2)H was found at $\delta = 11.32$ ppm and at 11.21 ppm for BTB and FTB, respectively. The presence of 2 NH residues confirms the formation of bis-thiourea derivatives. Between $\delta = 6$ ppm and 8.3 ppm multiplets were found and were assigned to aromatic protons in both compounds.

3.2. Optimization of the membrane composition

ISEs employing PVC membranes based on BTB and FTB as neutral ionophore were found to be highly responsive to Pb(II) in respect to several other cations. Therefore, the performance of the electrodes for lead ions was firstly studied in detail. In order to test the ISE performance, several characteristics were investigated, including: selectivity, response time, sensitivity, lifetime, working pH range of the electrode at different concentrations of the metal ion, and the effect of the membrane composition.

It is well known that the sensitivity and selectivity obtained for a given ionophore depend significantly on the membrane composition and the nature of plasticizer and additives used [27,28]. Several membrane compositions were investigated by varying the ratio of plasticizers and ionophores (BTB and FTB). The potentiometric response of the membrane was greatly improved with minute amounts of lipophilic anionic additive, KpClPB.

Among the different compositions studied (Table 2), the membrane incorporating 33.0% PVC, 61.5% DOS, 0.5% KpClPB and 5.0% BTB exhibited the better Nernstian response. Also, the sensor 4 employing 8% BTB (Table 2) showed good response, but presenting strong potassium interference due to high concentration of the additive KpClPB. For FTB ionophore the best result was obtained with 33.0% PVC, 64.7% DOS, 0.3% KpClPB and 2.0% FTB. Both membranes had a preferential Pb(II) response, as demonstrated when performing different single ion calibration towards different heavy metals. Fig. 2 shows the calibration curve against Cu(II), Cd(II), Zn(II) and Pb(II). All measurements were made under the same conditions and after conditioning in the corresponding ions. Two are the electrodes that can be identified in the figure with responses close to the Nernstian behaviour, these are: the electrode containing BTB (31.5 ± 1.6 mV/dec) from 4.0×10^{-6} to 1.0×10^{-2} M Pb^{2+} , and

Table 2
Optimization of the selective membrane formulation.

No.	Ionophore (%)		Plasticizer (%)		KpCIPB (%)	PVC (%)	Slope (mV/dec)	Linear range (M)
	BTB	FTB	DOS	<i>o</i> -NPOE				
1	2.0	–	65.0	–	0.0	33.0	20.2 ± 3.2	2.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻²
2	2.0	–	64.7	–	0.3	33.0	24.2 ± 3.2	4.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻²
3	5.0	–	61.5	–	0.5	33.0	31.5 ± 1.6	4.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻²
4	8.0	–	58.0	–	2.0	33.0	30.6 ± 2.3	1.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻²
5	2.0	–	–	65.0	0.0	33.0	16.2 ± 3.2	8.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻²
6	2.0	–	–	64.7	0.3	33.0	19.9 ± 2.2	2.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻²
7	5.0	–	–	61.5	0.5	33.0	22.3 ± 1.5	6.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻³
8	8.0	–	–	58.0	2.0	33.0	24.5 ± 3.0	9.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻³
9	–	2.0	65.0	–	0.0	33.0	14.5 ± 3.1	1.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻²
10	–	2.0	64.7	–	0.3	33.0	30.0 ± 1.3	5.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻²
11	–	5.0	61.5	–	0.5	33.0	26.3 ± 1.4	9.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻²
12	–	8.0	58.0	–	2.0	33.0	24.5 ± 2.5	3.0 × 10 ⁻⁶ to 1.0 × 10 ⁻²
13	–	2.0	–	65	0.0	33.0	15.9 ± 3.1	8.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻³
14	–	2.0	–	64.7	0.3	33.0	19.9 ± 3.1	8.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻³
15	–	5.0	–	61.5	0.5	33.0	21.4 ± 2.3	9.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻³
16	–	8.0	–	58.0	2.0	33.0	20.5 ± 3.3	8.0 × 10 ⁻⁵ to 1.0 × 10 ⁻³

the electrode containing FTB (30.0 ± 1.3 mV/dec) from 5.0 × 10⁻⁶ to 1.0 × 10⁻² M Pb²⁺.

3.3. Performance of sensors

For analytical applications, specially if in automated operation, the response time of a sensor is an important feature. Fig. 3 shows the measured potentials of the proposed sensors corresponding to four decade additions of Pb(NO₃)₂ solution, from the background till 10⁻³ M. The transient response observed for the one-decade step concentration changes had the typical exponential profile in all the cases. The response time (*t*_{90%}) for the two proposed electrodes were 14 s for the wide concentration range (10⁻⁵ to 10⁻² M Pb²⁺) and 22 s for 10⁻⁶ M Pb²⁺.

The effect of pH of the test solution on the response of the two best electrodes was examined at two Pb(II) concentrations (1.0 × 10⁻³ and 1.0 × 10⁻⁴ M). This study showed the range of pH 2.6–6.8 for BTB membrane, and 2.4–6.0 for FTB membrane, where sensitivities maintained a constant value close to 30 mV/dec. At higher pH's, sensitivity decreased down to 23 mV/dec for both membranes. As illustrated in Fig. 4, for 1.0 × 10⁻³ M Pb²⁺, responses

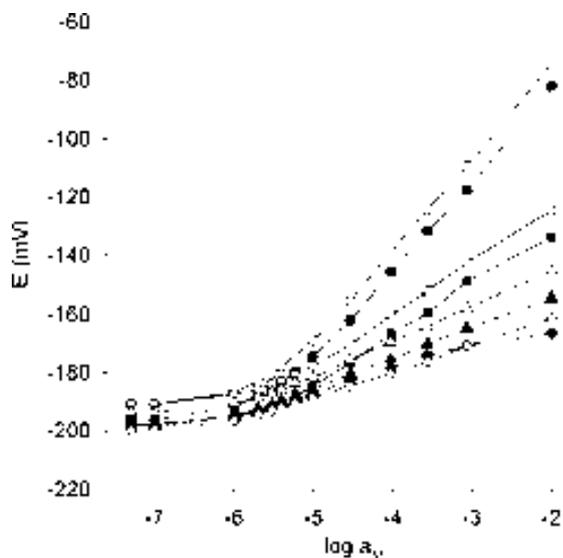


Fig. 2. Emf response of ion-selective electrodes based on BTB and FTB with Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, and Zn²⁺ ions (○, Pb²⁺; □, Cu²⁺; △, Cd²⁺; ◇, Zn²⁺ with BTB membrane; ●, Pb²⁺; ■, Cu²⁺; ▲, Cd²⁺; ◆, Zn²⁺ with FTB membrane).

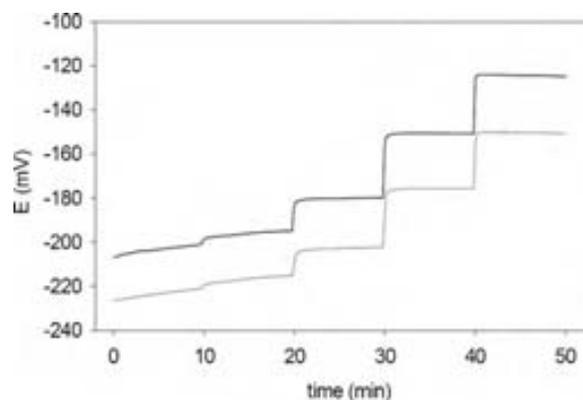


Fig. 3. Dynamic potentiometric responses of the proposed electrodes based in BTB and FTB membranes. Response corresponding to four one-decade concentration step changes from acetate buffer background to 10⁻³ M Pb²⁺ (–, BTB membrane; —, FTB membrane).

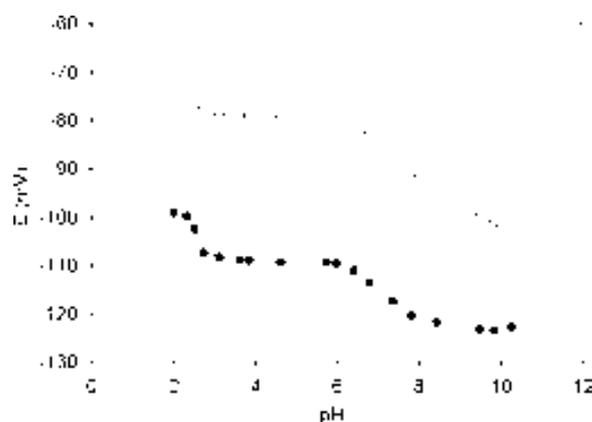


Fig. 4. pH dependence on the response of the Pb(II)-ISEs based on BTB and FTB (○, BTB membrane; ●, FTB membrane). Conditions: 1.0 × 10⁻⁴ M Pb²⁺ in a pH 10 NaOH solution successively acidified with HNO₃.

are maintained constant between pH 2.2 and 6.0. Variation of the potential at pH < 2.6 could be related to protonation of the ligands in the membrane phase, which resulted in a loss of its ability to form complexes with the Pb²⁺ ions. At the higher pH's, the potential drop may be due to the hydrolysis of the Pb²⁺ ions. Given the working pH range is slightly reduced at lower Pb(II) concentrations, therefore,

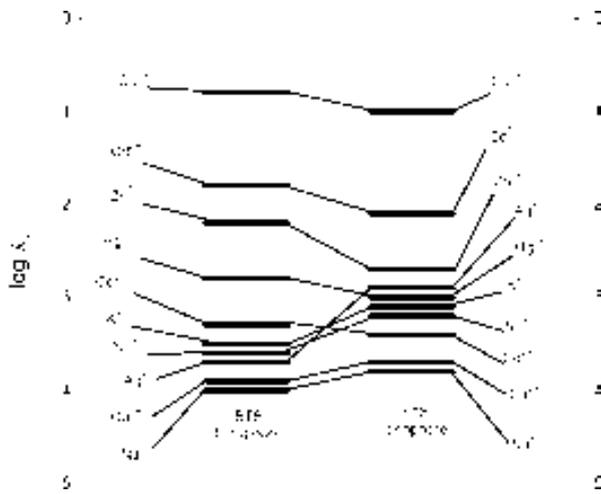


Fig. 5. Selectivity pattern for the Pb(II)-ISEs based on BTB and FTB ionophores.

all of the measurements were performed at pH 4.0 (employing an acetate buffer).

In order to investigate the selectivity of the two proposed Pb(II) ISEs, perhaps as the most important characteristic of a membrane sensor, its response was examined in the presence of various foreign ions according to fixed interference method. The resulting values are illustrated in Fig. 5. As can be seen, for the BTB membrane and Cu(II) and Cd(II) ions, their selectivity coefficients are higher than 10^{-2} , which reveals some reversible interfering effect in the Pb(II) selective electrode functioning. However, it should be noted that, although the Cd(II) similarity, there is a rather more severe interference of Cu(II) ion. For the other metals considered, the selectivity coefficients range at about 10^{-3} or smaller, indicating they would not significantly disturb the functioning of the Pb(II) selective membrane. Considering the FTB membrane, the potentiometric selectivity coefficients of the most interfering ions (Cu(II) and Cd(II)) are slightly improved with respect to BTB membrane. The other ions do not interfere significantly with the FTB membrane, as before.

The lifetime of the electrodes was determined by recording its potential at an optimum pH value and plotting its calibration curve each day. It was observed that there was no significant change in the slope and detection limit (DL) of the electrodes on the following day. The BTB membrane electrode was tested over a period of 10 weeks to investigate its stability. During this period, the electrode was daily used, the values of slope and DL reproductibility were 31.5 ± 1.6 mV/dec and $(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-6}$ M, respectively. Also, the FTB membrane electrode was tested over a period of 14 weeks to investigate its stability, and during this period the analytical parameters were found to be reproducible, the values of slope and

DL reproductibility of 30.0 ± 1.3 mV/dec and $(1.9 \pm 0.9) \times 10^{-6}$ M, respectively.

The stability and reproductibility of the electrodes were also tested. Repeated monitoring of potentials (20 measurements) on the same portion of the sample at 1.0×10^{-3} and 1.0×10^{-4} M Pb²⁺ resulted in standard deviations of -151.8 ± 0.7 and -120.6 ± 0.8 mV for BTB membrane ISE and for FTB membrane ISE -176.3 ± 0.6 and -146.4 ± 0.7 mV, respectively.

Table 3 lists, for comparative purposes, the main performance characteristics (linear range, detection limit, lifetime and slope) of some of the lead-selective electrodes from the literature [29–35], against data of the proposed lead ISEs. As can be seen, the proposed lead-selective electrodes are comparable or improve many of those reported in relevant characteristics of response such as concentration range, selectivity coefficient for potential interfering ions, having similar Nernstian slopes and acceptable DL. If the two proposed sensors are compared one to the other, very similar features are noticed, such as detection limit, sensitivity and linear range of response; also precision and response time values are equivalent for both of them. The only feature to mark is the better selectivity and longer lifetime of the FTB membrane electrode, making it slightly preferable among the options tested.

3.4. Application of the proposed sensors in lead soil determination

The two proposed Pb(II) sensors were found to work well under laboratory conditions. To assess the applicability of the both ISEs to real samples, an attempt was made to determine lead in 6 different samples of soils road, coming from outside of the Barcelona city, and compare results against a reference method.

The amount of lead was obtained by ISE method employing standard addition technique, but first, samples had their pH adjusted to 4.0 (acetate buffer). To cover the different possible lead in soil values, the approximate concentration and volume of added standard were calculated by the methodology proposed by Horvai and Pungor [36], in terms of achieving adequate precision in the analysis. Lead added to the samples was between 0.5 and 1 times of the analyte concentration in the sample, thus yielding the proper emf change for precise calculation.

Calibration data was performed in a blank solution of analyte extraction reagents. To assess the reliability of the results, each sample was analyzed by triplicate using both methods. The results of performed analysis are shown in Table 4; as can be seen, concentration values of the extracts were in the lower linear range of response of the proposed sensors. Precisions obtained were always in the same range for both methods and the two ISEs tested.

When results obtained by reference method and the two ISEs are statistically compared, a satisfactory agreement is

Table 3
Comparison of the response characteristics of different Pb(II) ISEs.

Reference	Slope (mV/dec)	Detection limit (M)	Linear range (M)	Lifetime (weeks)	Interfering ions with $\log k_{Pb^{2+},j}^{pot} \geq -2$
Proposed electrode (BTB)	31.5 ± 1.6	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^{-6}$	4.0×10^{-6} to 1.0×10^{-2}	10	Cu ²⁺ , Cd ²⁺
Proposed electrode (FTB)	30.0 ± 1.3	$(1.9 \pm 0.9) \times 10^{-6}$	5.0×10^{-6} to 1.0×10^{-2}	14	Cu ²⁺
[15]	29.7 ± 0.6	2.0×10^{-6}	3.6×10^{-6} to 1.3×10^{-2}	8	Ba ²⁺
[29]	32.5	5.0×10^{-7}	1.0×10^{-6} to 1.0×10^{-1}	>8	Hg ²⁺ , Tl ⁺ , Ag ⁺
[30]	29.1	3.0×10^{-6}	5.0×10^{-6} to 1.0×10^{-1}	>24	Cu ²⁺ , Cd ²⁺
[31]	33.1	1.8×10^{-5}	5.8×10^{-5} to 1.0×10^{-2}	8	Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Ca ²⁺ , Hg ²⁺
[32]	28.6	2.0×10^{-6}	3.1×10^{-6} to 6.3×10^{-3}	8	Hg ²⁺
[33]	29.5 ± 0.4	3.2×10^{-7}	7.7×10^{-7} to 1.0×10^{-1}	10	Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Fe ²⁺
[34]	28.3	2.8×10^{-5}	5.0×10^{-5} to 1.0×10^{-2}	8	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , K ⁺ , Ag ⁺ , Mn ²⁺ , Tl ⁺ , Li ⁺ , NH ₄ ⁺ , Sr ²⁺
[35]	29.2	1.0×10^{-5}	2.0×10^{-5} to 5.0×10^{-2}	8	Zn ²⁺ , Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Ni ²⁺ , Na ⁺ , Ag ⁺ , Mg ²⁺

Table 4

Determination of lead concentration in soil samples employing the proposed Pb(II) ISEs, and comparison against a reference ICP-MS method.

Sample	ICP-MS (mg/kg)	ISEs-standard addition	
		BTB (mg/kg)	FTB (mg/kg)
1	18.8 ± 0.6	17.9 ± 0.5	18.6 ± 0.6
2	19.7 ± 0.6	19.0 ± 0.7	20.1 ± 0.6
3	20.9 ± 0.6	21.2 ± 0.7	21.1 ± 0.7
4	16.4 ± 0.5	15.9 ± 0.6	16.2 ± 0.5
5	12.8 ± 0.4	12.5 ± 0.6	13.0 ± 0.5
6	36.1 ± 1.0	35.8 ± 0.8	35.4 ± 0.9

obtained. Linear regression of BTB-ISE results vs. ICP-MS yielded a correlation of $R=0.9987$ ($n=6$) with a comparison line $y=(1.008 \pm 0.071)x - (0.57 \pm 1.56)$; linear regression of FTB-ISE yielded a correlation of $R=0.99935$ ($n=6$) with a comparison line $y=(0.965 \pm 0.048)x + (0.69 \pm 1.06)$. As can be seen, both fitted regression lines were indistinguishable from the theoretical $y=x$ comparison line, with slightly better comparison for the FTB-ISE. Analogously, if a paired samples Student's t test is performed, calculated t statistics are: $t=2.36$ for the BTB-ISE vs. ICP-MS and $t=0.31$ for the FTB-ISE vs. ICP-MS. In both cases, t statistics were below the tabulated critical value of $t^*=2.57$ (5 degrees of freedom and 95% confidence level), demonstrating that there are no significant differences between results obtained with the ISE methods and the reference. In short, both sensors showed similar results during their application to the determination of lead in soils.

4. Conclusions

In this work, two new bis-thioureas 1,3-bis(*N'*-benzoylthioureido)benzene, BTB, and 1,3-bis(*N'*-furoylthioureido)benzene, FTB, have been successfully synthesised and characterized. Compounds showed to be very adequate when used as neutral carrier in ISEs with polymeric membrane for determining Pb(II). This is demonstrated by good performance characteristics obtained during application, as sensitivity, stability, response time, detection limit, and precision and linear range. The main structural difference between the two proposed ionophores (furoyl and benzoyl terminals groups) only affected the lifetime and selectivity of the electrodes, in favour of the FTB membrane electrode. On the basis of the results discussed in this paper, the two proposed electrodes can be used for Pb^{2+} ion determination in contaminated soils with good performance.

Acknowledgements

This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation, through project TEC2007-68012-C03-02/MIC. D. Wilson gratefully acknowledges the concession of a PhD grant by the Universitat Autònoma de Barcelona.

References

- [1] V. Carcu, M. Negoiu, T. Rosu, S. Serban, Synthesis, characterization of complexes of *N*-benzoyl-*N'*-2-nitro-4-methoxyphenyl-thiourea with Cu, Ni, Pt, Pd, Cd and Hg, *J. Therm. Anal. Calorim.* 61 (2000) 935–945.
- [2] D. Gambino, E. Kremer, E.J. Baran, Infrared spectra of new Re(III) complexes with thiourea derivatives, *Spectrochim. Acta A* 58 (2002) 3085–3092.
- [3] K.R. Koch, New chemistry with old ligands: *N*-alkyl- and *N,N*-dialkyl-*N'*-acyl(aryl)thioureas in co-ordination, analytical and process chemistry of the platinum group metals, *Coord. Chem. Rev.* 473 (2001) 216–217.
- [4] E. Otazo, L. Pérez, O. Estévez, S. Rojas, J. Alonso, Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy-metal ion selective electrodes, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (2001) 2211–2218.
- [5] K.-H. Lubert, M. Guttman, L. Beyer, Electrode reactions of palladium(II) in chloride solution at carbon paste electrodes modified with derivatives of *N*-benzoylthiourea, *J. Solid State Electrochem.* 6 (2002) 545–552.
- [6] O. Estévez, J.L. Hidalgo, E. Reguera, I. Naranjo, On the complex formation of $CdCl_2$ with 1-furoylthioureas: preconcentration and voltammetric behavior of Cd(II) at carbon paste electrodes modified with 3-monosubstituted and 3,3-disubstituted derivatives, *Sens. Actuators B* 120 (2007) 766–772.
- [7] A.K. Singh, A.K. Jain, S. Mehtab, Ytterbium-selective polymeric membrane electrode based on substituted urea and thiourea as a suitable carrier, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 322–330.
- [8] K.P. Xiao, P. Bühlmann, S. Nishizawa, S. Amemiya, Y. Umezawa, A chloride ion-selective solvent polymeric membrane electrode based on a hydrogen bond forming ionophore, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1038–1044.
- [9] S. Nishizawa, P. Bühlmann, K.P. Xiao, Y. Umezawa, Application of a bis-thiourea ionophore for an anion selective electrode with a remarkable sulfate selectivity, *Anal. Chim. Acta* 358 (1998) 35–44.
- [10] P. Bühlmann, S. Nishizawa, K.P. Xiao, Y. Umezawa, Strong hydrogen bond-mediated complexation of $H_2PO_4^-$ by neutral bis-thiourea hosts, *Tetrahedron* 53 (1997) 1647–1654.
- [11] M. Shamsipur, A.S. Dezaki, M. Akhond, H. Sharghi, Z. Pazirae, K. Alizadeh, Novel PVC-membrane potentiometric sensors based on a recently synthesized sulfur-containing macrocyclic diamide for Cd^{2+} ion. Application to flow-injection potentiometry, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 566–573.
- [12] U. Oesch, W. Simon, Life time of neutral carrier based ion-selective liquid-membrane electrodes, *Anal. Chem.* 52 (1980) 692–700.
- [13] A.F. Shoukry, N.M. Shuaib, Y.A. Ibrahim, R.N. Malhas, Thermal studies of new lead(II) coated-wire membrane electrodes, *Electroanalysis* 17 (2005) 713–718.
- [14] M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusteholz, W. Simon, Lead-selective bulk optodes based on neutral ionophores with subnanomolar detection limits, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1534–1540.
- [15] S.Y. Kazemi, M. Shamsipur, H. Sharghi, Lead-selective poly(vinyl chloride) electrodes based on some synthesized benzo-substituted macrocyclic diamides, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 68–73.
- [16] E.I. Thiam, M. Diop, M. Gaye, A.S. Sall, A.H. Barry, 1,2-bis(*N*-benzoylthioureido)benzene, *Acta Crystallogr. E* 64 (2008) o776–o787.
- [17] E.S. Raper, J.R. Creighton, N.R. Bell, W. Cleg, L. Cucurull-Sánchez, Complexes of heterocyclic thiones and group twelve metals. Part 1. Preparation and characterisation of 1:1 complexes of mercury(II) halides with 1-methylimidazole-2(3H)-thione: the crystal structure of $[(\mu-2)\text{-dibromo}]\text{bis}(\text{trans}\{(\text{bromo})(1\text{-methyl-imidazole-2(3H)-thione})\}\text{mercury(II)})]$ at 160 K, *Inorg. Chim. Acta* 277 (1998) 14–20.
- [18] Z. Popovic, D. Matkovic-Calogovic, Z. Soldin, G. Pavlovic, N. Davidovic, D. Vikić-Topić, Mercury(II) compounds with 1,3-imidazole-2-thione and its 1-methyl analogue. Preparative and NMR spectroscopic studies. The crystal structures of $[\text{di-}\mu\text{-iodo-bis}\{\text{iodo}(1,3\text{-imidazolium-2-thiolato-S})\}\text{mercury(II)}]$, $[\text{bis}\{\text{bromo}(1,3\text{-imidazolium-2-thiolato-S})\}\text{mercury(II)}]$ and $[\text{bis}\{\mu\text{-}(1\text{-N-methyl-1,3-imidazole-2-thiolato-S})\}\text{mercury(II)}]$, *Inorg. Chim. Acta* 294 (1999) 35–46.
- [19] J. Gallardo, S. Alegret, M. De Román, R. Muñoz, P.R. Hernández, L. Leija, M. del Valle, Determination of ammonium ion employing an electronic tongue based on potentiometric sensors, *Anal. Lett.* 14 (2003) 2893–2908.
- [20] E. Bakker, E. Pretsch, Potentiometric sensors for trace-level analysis, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 199–207.
- [21] A.C. Schneider, C. Pasel, M. Luckas, K.G. Schmidt, J.D. Herbell, Determination of hydrogen single ion activity coefficients in aqueous HCl solutions at 25 °C, *J. Soln. Chem.* 33 (2004) 257–273.
- [22] Y. Umezawa, P. Bühlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, Potentiometric selectivity coefficients of ion-selective electrodes. Part I. inorganic cations- (technical report), *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1851–2082.
- [23] A.R. Fakhari, T.A. Raji, H. Naeimi, Copper-selective PVC membrane electrodes based on salens as carriers, *Sens. Actuators B* 104 (2005) 317–323.
- [24] A. Demirel, A. Doan, G. Akku, M. Ylmaz, E. Kilic, Silver(I)-selective PVC membrane potentiometric sensor based on a recently synthesized calix[4]arene, *Electroanalysis* 18 (2006) 1019–1027.
- [25] O. Estévez, E. Otazo, J.L. Hidalgo, I. Naranjo, E. Reguera, A Raman and infrared study of 1-furoyl-3-monosubstituted and 3,3-disubstituted thioureas, *Spectrochim. Acta A* 62 (2005) 964–971.
- [26] E. Otazo, P. Ortiz, O. Estevez, L. Pérez, I. Goicochea, A. Cerón, J.R. Villagomez, Aroylthioureas: new organic ionophores for heavy metal ion selective electrodes. A nuclear magnetic resonance study, *Spectrochim. Acta A* 58 (2002) 2281–2290.
- [27] N. Tavakkoli, M. Shamsipur, Lead-selective membrane electrode based on dibenzopyrydino-18-crown-6, *Anal. Lett.* 29 (1996) 2269–2279.
- [28] T. Rosatzin, E. Bakker, K. Suzuki, W. Simon, Lipophilic and immobilized anionic additives in solvent polymeric membranes of cation-selective chemical sensors, *Anal. Chim. Acta* 280 (1993) 197–208.
- [29] H. Karami, M.F. Mousavi, M. Shamsipur, Flow injection potentiometry by a new coated graphite ion-selective electrode for the determination of Pb^{2+} , *Talanta* 60 (2003) 775–786.
- [30] M. Mazloum, M. Khayat, M. Salavati-Niasari, A.A. Ensafi, Lead ion-selective electrode prepared by sol-gel and PVC membrane techniques, *Sens. Actuators B* 107 (2005) 438–445.

- [31] S.S.M. Hassan, M.H. Abou Ghaliya, A.G.E. Amr, A.H.K. Mohamed, New lead (II) selective membrane potentiometric sensors based on chiral 2,6-bis-pyridinecarboximide derivatives, *Talanta* 60 (2003) 81–91.
- [32] X. Lu, Z. Chen, S.B. Hall, X. Yang, Evaluation and characteristics of a Pb(II) ion-selective electrode based on aquatic humic substances, *Anal. Chim. Acta* 418 (2000) 205–212.
- [33] A. Abbaspour, E. Mirahmadi, A. Khalafi-nejad, S. Babamohammadi, A highly selective and sensitive disposable carbon composite PVC-based membrane for determination of lead ion in environmental samples, *J. Hazard. Mater.* 174 (2010) 656–661.
- [34] M.F. Mousavi, S. Sahari, N. Alizadeh, M. Shamsipur, Lead ion-selective membrane electrode based on 1,10-dibenzyl-1,10-diaza-18-crown-6, *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 189–194.
- [35] A. Abbaspour, F. Tavakol, Lead-selective electrode by using benzyl disulphide as ionophore, *Anal. Chim. Acta* 378 (1999) 145–149.
- [36] G. Horvai, E. Pungor, Comparative study on the precision of potentiometric techniques applied with ion selective electrodes. Part 1. Direct techniques, *Anal. Chim. Acta* 113 (1980) 287–294.

ARTÍCULO 2

Potentiometric Electronic Tongue to Resolve Mixtures of Sulfide and Perchlorate Anions, **Deivy Wilson**, Mohammed Nooredeen Abbas, Abd Ellatef Abbas Radwan, Manel del Valle, *Sensors*, 11 (2011), 3214-3226.

Article

Potentiometric Electronic Tongue to Resolve Mixtures of Sulfide and Perchlorate Anions

Deivy Wilson ¹, Mohammed N. Abbas ², Abdel Latief A. Radwan ² and Manel del Valle ^{1,*}

¹ Sensors and Biosensors Group, Department of Chemistry, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain; E-Mail: dwilson25@gmail.com

² Analytical Laboratory, National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt; E-Mails: mnabbas@menanet.net (M.N.A.); celotfy@yahoo.com (A.L.A.R.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: manel.delvalle@uab.es; Tel.: +34-935811017; Fax: +34-935812379.

Received: 11 January 2011; in revised form: 24 February 2011 / Accepted: 10 March 2011 /

Published: 16 March 2011

Abstract: This work describes the use of an array of potentiometric sensors and an artificial neural network response model to determine perchlorate and sulfide ions in polluted waters, by what is known as an electronic tongue. Sensors used have been all-solid-state PVC membrane selective electrodes, where their ionophores were different metal-phtalocyanine complexes with specific and anion generic responses. The study case illustrates the potential use of electronic tongues in the quantification of mixtures when interfering effects need to be counterbalanced: relative errors in determination of individual ions can be decreased typically from 25% to less than 5%, if compared to the use of a single proposed ion-selective electrode.

Keywords: electronic tongue; ion-selective electrode; artificial neural network; sulfide; perchlorate; phtalocyanine ionophores

1. Introduction

The monitoring of sulfide and perchlorate is required in a variety of environmental and industrial situations, as both ions form toxic compounds. The toxicity of sulfide is well known, especially when

released as the hydrogen sulfide (H₂S) form; this gas at high concentrations can cause permanent brain damage and even death due to its neurotoxic effects [1].

Perchlorate may be found at high concentration levels (higher than 1,000 ppm) in surface and ground waters [2], and has also been found in food products, soil, milk, fertilizers, plants and in human urine. One of its major sources of pollution comes from its use in solid propellants, explosives and other industrial uses. Perchlorate may interact with the production of thyroid hormones and its presence has been related to the occurrence of thyroid cancer.

The sulfide and perchlorate determination can be carried out by a variety of analytical techniques, some of them classical such as titrimetric and gravimetric, or employing instrumental techniques, such as chromatography, atomic absorption, electrochemistry and combinations thereof [3]. However, most of these methods are relatively expensive in terms of analysis time or the need for sophisticated instruments.

In recent years, the use of Ion Selective Electrodes (ISEs) has become a good alternative [4,5] for water monitoring applications; today there are many ISEs commercially available, but these can present limitations with respect to selectivity and utilizable pH. Another feature that may limit the utility of selective electrodes is the short lifetime of their sensing membranes due to exudation of the ionophore from the polymer matrix. A recent trend to prevent the occurrence of leaching phenomena reported in the literature is the immobilization of the ionophore on the matrix [6]. Other authors also report this method as a means to improve the detection limit [7].

At present, in the sensor community, the use of the term "electronic tongue" is not novel. According to the recent IUPAC definition [8], an electronic tongue (ET) is "a multisensor system, which consists of a number of low-selective sensors and uses advanced mathematical procedures for signal processing based on Pattern Recognition and/or Multivariate data analysis—Artificial Neural Networks (ANNs), Principal Component Analysis (PCA), *etc*". Therefore, the electronic tongue is an analytical system devised for liquid analysis and formed by a sensor array that generates multidimensional information, plus a chemometric processing tool which extracts meaning from these complex data [9]. There are many applications found in the literature for qualitative [10-12] and quantitative analysis [13-15], the first type being the most favored if the amount of publications is concerned. Electronic tongues and electronic noses, two bioinspired sensor analysis systems—the latter is equivalent but used for gas analysis—are consolidated trends in the sensor's field, for the number of works already published, and for the number of different laboratories working with them [16,17].

One important concept in the electronic tongue is the cross-response issue. The sensor array, part of the ET, needs to use sensors with reduced selectivity and mixed sensitivity, in order to generate the multidimensionality required to develop the application. Although other types of sensors may be involved, many of the ETs described in the literature use arrays of ISEs, and in the case studied here, we selected to study the ISE-based multidetermination of perchlorate and sulfide anion mixture. This kind of quantitative applications are specially demanded for pollution monitoring [13], but similar anion determinations have been used for characterizing underground waters [18] and also for qualitative analysis of beverages [19]. In the choice of potentiometric sensors for anions, there are two clear options: to use ISEs based on quaternary ammonium ion carriers [20], which normally present a certain response preference for the lipophilic anions (Hofmeister series), or to use new families of carriers in order to deviate from that, and generate a richer cross-response in the array. The choice in

this study was to mix both; in particular, we have employed different metallophthalocyanines [21-23] to obtain an anti-Hofmeister response pattern. In order to obtain sensors with better stability and lifetime characteristics, some of the metallophthalocyanine ionophores used have been linked by covalent bond to acrylic polymers, in order to favor their permanent attachment to the sensing membrane [6]. Durable perchlorate and sulfide solid-contact ISEs, based on ionophores Cobalt-Phthalocyanine and Cerium(IV) [N'-acetyl-2-(benzothiazol-2-yl)-3-(3-chloro-5-methyl-4H-pyrazol-4-yl)acrylohydrazide] complex, respectively, have been covalently attached to polyacrylamide (PAA) and used in an electronic tongue for the simultaneous determination of sulfide and perchlorate in pollution studies.

2. Experimental Section

2.1. Reagents

All chemicals used were of reagent grade and doubly distilled water was used throughout all preparations. Plasticizers *o*-nitrophenyloctyl ether (*o*-NPOE), dioctyl phthalate (DOP), dibutyl phthalate (DBP), dibutyl sebacate (DBS), [N'-acetyl-2-(benzothiazol-2-yl)-3-(3-chloro-5-methyl-4H-pyrazol-4-yl)acrylohydrazide] (ABPAH), polyacrylamide (PAA), gallium phthalocyanine (Ga-Pc), zinc phthalocyanine (Zn-Pc), cobalt phthalocyanine (Co-Pc) and high molecular weight PVC were supplied by Aldrich. The oleic acid (OA), cetyltrimethylammonium bromide (CTMAB), tetradodecylammonium bromide (T12A) and tetrahydrofuran (THF) were obtained from Fluka. Sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS) was obtained from Carlo Erba. Sodium sulfide, sodium perchlorate, phosphoric acid, sulphuric acid, dimethylformamide (DMF), phosphorus pentoxide and cerium (IV) sulphate were purchased from Merck or Aldrich and were of the highest purity available. All the anions working solutions were freshly prepared by accurate dilution from their 0.1 M stock solutions renewed periodically.

2.2. Apparatus

The emf measurements were performed with a laboratory made data acquisition system consisting of 32 input channels made with differential instrumentation amplifiers (INA116, Burr-Brown, USA) that adapted the impedance for each sensor. Emf measurements were performed against a double junction Ag/AgCl reference electrode (Thermo Orion 90-02-00). Each channel was noise-shielded with its signal guard. The output of each amplified channel was filtered with a second order low pass active filter centered at a 2 Hz frequency and connected to an Advantech PC-Lab 813 A/D conversion card installed in a PC computer.

2.3. Preparation of the Cerium(IV)-ABPAH Complex

An amount of 0.01 mole of $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dissolved in 0.01 M H_2SO_4 was added dropwise to ethanolic solution of 0.01 mole of the ABPAH, with continuous stirring whereby pale yellow, brownish-yellow, and yellow precipitates were obtained, respectively. The precipitate was washed thoroughly with water and ethanol, and then allowed to dry in air at ambient temperature. The structure of this ionophore was confirmed by UV-VIS, IR and elemental analysis.

2.4. Synthesis of the Covalently Attached Ionophores

An appropriate amount of the ionophore (cerium complex or Co-Pc) was added to 900 mg of PAA in 50 mL of DMF in the presence of P₂O₅ and H₃PO₄ as dehydrating agent, then the mixture was purged with nitrogen gas for about 6 hours, the mixture was refluxed for about 24 hours at 140 °C, the precipitate was filtered and washed with water, ethanol, then let dry at ambient temperature to obtain the corresponding product. The product was investigated by IR analysis.

2.5. Sensor Array

The sensor array used was formed by five potentiometric sensors (all-solid-state ISEs), which were constructed as follows: the appropriate amounts of the specified ionophore, PVC, additive and the plasticizer were placed in a 10 mL vial and mixed thoroughly. Then the mixture was dissolved in 5 mL THF under magnetic stirring until the prepared membrane cocktail became clear. A clean and dry carbon rod of 5 cm length and 5 mm diameter was dipped to about 1 cm depth into the membrane cocktail for 2 s, and then lifted out of the solution to evaporate the THF, leaving the polymeric membrane layer coating the carbon rod. That operation was repeated for 12–17 times to give a proper membrane thickness. The rod was fitted into a plastic body and connected with the membrane-free end to the potentiometer using a copper wire. The constructed ISEs (see Table 1) were conditioned for 24 hours by soaking in 1.0×10^{-3} mol L⁻¹ solution of its primary ion prior to use. The Zn, Ga and Co metallophthalocyanine ionophores were prepared according to the literature [23]. Apart, a quaternary ammonium membrane was also included in the array, in order to provide a different selectivity pattern; in this case the ionophore used was the ion pair tetradodecyl ammonium dodecylbenzenesulphonate (T12A-SDBS) [24], capable of responding to the different anions involved in this study case.

Table 1. Formulation of the ion-selective membranes employed in the construction of the potentiometric sensor array.

Membrane	Primary ion	Ionophore (wt.%)	Plasticizer (wt.%)		PVC (wt.%)	Additive (wt.%)		
			<i>o</i> -NPOE	DOP		OA	CTMAB	
P1	ClO ₄ ⁻	Co-Pc-PAA	9.30	-	57.80	27.77	2.60	2.60
S1	S ²⁻	Zn-Pc	3.22	64.52	—	32.26	—	—
S2	S ²⁻	Ce-ABPAH-PAA	4.76	63.49	—	31.75	—	—
S3	S ²⁻	Ga-Pc	4.16	—	64.59	31.25	—	—
G	Generic	T12A –SDBS	12.50	62.50	—	25.00	—	—

2.6. Procedure

The performance characteristics of the used sensors: detection limit, selectivity coefficient, slope, were determined according to IUPAC methodology. The activity coefficients of ions in solution were calculated according to the Debye-Hückel formalism [25].

To build the response model, a number of the two anion mixtures were sequentially prepared from cumulative additions of standard solutions of increasing concentrations of one or two considered ions. To this end, microvolumes of the standards were added to the calibration vessel with the aid of

variable-volume micropipettes. The solutions used contained Na_2S and NaClO_4 , whether individually or in binary combinations; these standards were prepared from solutions of concentration 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} and 1 M of each ion. The more concentrated solution was prepared by direct weighing of the salts and all other by sequential dilution. All measurements were carried out without any background or buffer solution. For the simultaneous mixture determination, a two-ion response model was built, feeding the responses from the sensor array to an artificial neural network structure.

2.7. Software

The readings were acquired by using custom software developed by our group and written in Microsoft QuickBasic Version 4.5. Neural network processing was developed with MATLAB 6.0 (Mathworks, Natick, MA, USA), using its Neural Network Toolbox (v. 3.0). Sigma Plot 2000 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used in graphic representation of data.

3. Results and Discussion

3.1. ISE Responses

A preliminary characterization was made to the above prepared ISEs before being used in the electronic tongue. Measurements were carried out in order to build the response model employing ANN and to perform the multidetermination application.

Figure 1. Response of the ISEs forming the sensor array towards its primary ion: ISEs to perchlorate P1 (\circ); to sulfide S1 (\bullet), S2 (\blacktriangledown) and S3 (Δ); and generic ISE for sulfide (\diamond).

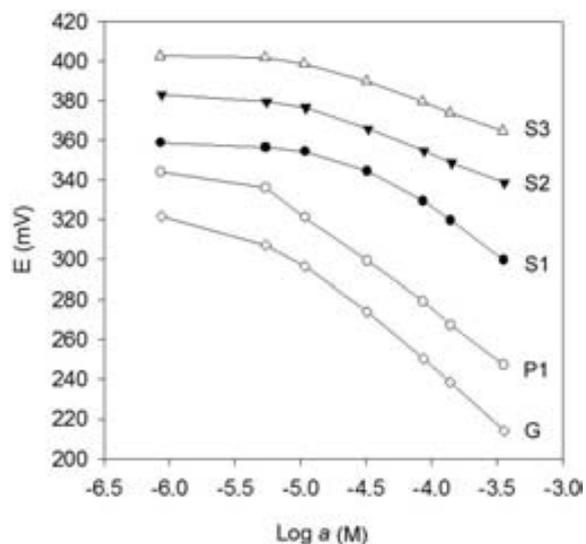


Figure 1 shows the response of each prepared sensor type to their respective primary ions; calibration curves represented in the figure were obtained by adding a background saline solution (0.05 M lithium acetate), to adjust the pH and ionic strength of solutions, reducing the effect of the change in pH by hydrolysis of sulfide ion. Table 2 shows the main performance characteristics obtained. The responses of ISEs (P1, S1, S2, S3) are close to Nernst values, while the sensitivity to S^{2-} of the generic sensor is super-Nernstian probably due to a mixed response to S^{2-} and HS^- . Apart, the

detection limits are below 10^{-5} mol L⁻¹; this concentration is taken as a lower limit on the working range. Particularly, the perchlorate ISE P1 displayed remarkable response characteristics, closely to Nernstian ideality [26]. The reproducibility of response for all proposed sensors showed to figure between 0.96 and 0.98% RSD of slope between successive calibrations of the primary ion on five consecutive days.

Table 2. Response characteristics of the ISEs forming the sensor array.

ISEs	Slope, s_i (mV/decade)	LD (mol L ⁻¹)	$\log k_{ij}^{pot}$	
			ClO ₄ ⁻ interfering ion	S ²⁻ interfering ion
P1	-57.7	$5.2 \cdot 10^{-6}$	—	-1.96
S1	-33.3	$1.3 \cdot 10^{-5}$	-2.68	—
S2	-30.9	$9.8 \cdot 10^{-6}$	-3.23	—
S3	-28.9	$9.9 \cdot 10^{-6}$	-3.75	—
G	-44.3 ^a	$8.3 \cdot 10^{-6}$	1.13	—
	-60.1 ^b	$7.5 \cdot 10^{-6}$	—	-1.25

^a Response to S²⁻ ion; ^b Response to ClO₄⁻ ion.

One of the most important premises for constructing an ET is the cross-selectivity of the sensor array [8,27]. In our case, this was verified by calibrations in presence of primary and interfering ion (Mixed Solution Method), which permitted to calculate the potentiometric selectivity coefficients according to the Nikolsky-Eisenmann Expression (1):

$$E_i = K_i + s_i \log \left[a_i + k_{ij}^{pot} (a_j)^{z_i/z_j} \right] \quad (1)$$

The results from these evaluations are summarized on Table 2. According to the obtained selectivity coefficients, k_{ij}^{pot} , we can infer that electrodes P1 based on (Co-PC-PAA) and S1 based on (Zn-PC) have clear cross-response to both ions, as it also happens with the generic ISE; similarly, ISEs S2 and S3 show marked selectivity to sulfide, as they show a difference in response of three orders of magnitude. Sensors Ce-ABPAH-PAA for S²⁻ and Co-Pc-PAA for ClO₄⁻ in which the ionophore is covalently bonded to the polymer matrix, showed marked stability in the slope and detection limit for 16 weeks of measurement. Lifetime of the remaining sensors was slightly poorer, 8–10 weeks.

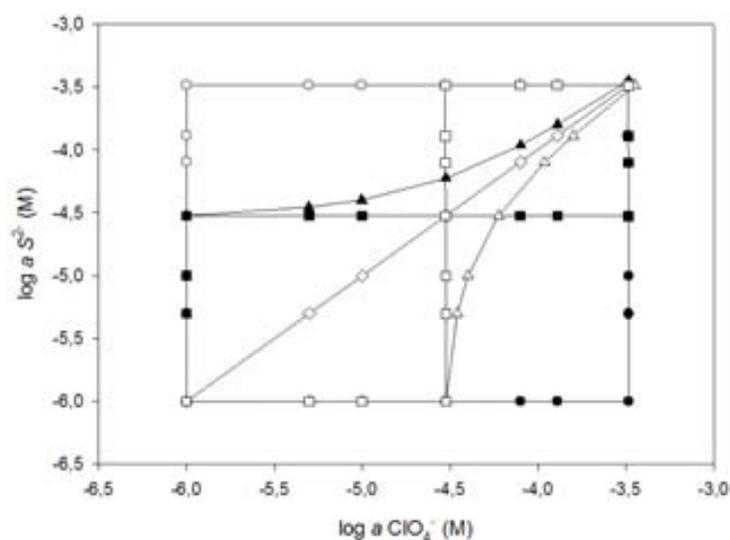
3.2. Building of the ANN Response Model

In our studies, the preferred chemometric tool for the advanced processing of data has been the Artificial Neural Network (ANN). These are known to be powerful non-linear modelers, applicable for quantitative and also qualitative applications [28]. In this sense, our approach is doubly biomimetic; firstly, the use of groups of sensors with cross-response is the sensing scheme in the taste buds of animals, and secondly, ANNs are parallel information processing tools inspired in the animal nervous system, whose maximum expression is the human brain. Consequently, ANNs were used to model the combined response of the two ions mixture from the readings of the sensor array.

For the building of the response model, specific experimentation was designed to obtain the information needed. The starting data consisted of 79 samples (mixtures of the two considered ions S²⁻ and ClO₄⁻) covering the two species concentration range, and was split into two subsets: a training

subset containing 59 samples, used for building the response model, and a test subset containing 20 samples, used for evaluating the model predictive ability. The samples were generated by seven different sequences of microvolume additions [29] of two concentration levels of ClO_4^- and S^{2-} standards, alone or combined, which allowed generating the experimental design in Figure 2. Finally, the response model corresponded to the symmetric concentration range of 5.0×10^{-6} to 3.3×10^{-4} M for the two target ions (ClO_4^- and S^{2-}). To divide the data subsets it is very important to do it randomly [30] and to avoid that samples corresponding to maxima or minima may be in the testing subset, in this way the need of any extrapolation is eliminated [31]. Each subset contains two kinds of information that interrelates: the first type is formed by the responses of the sensor array (patterns); the second is the sought information in correspondence (targets), which in a quantitative application case are the concentration values of the analytes. This training subset must be large enough, cover adequately the original space and contain sufficient variability to yield a proper modeling of the response. The random distribution of these points, plus extra precautions to avoid overfitting are key issues in order to obtain confidently valid response models [32].

Figure 2. Visualization of the standards generated for the training of the electronic tongue, following the seven sequences of additions: 1 (○), 2 (●), 3 (□), 4 (■), 5 (△), 6 (▲), 7 (■).



Selecting the topology of an ANN is the first task in developing a numeric model with ANNs because of the difficulty to predict an optimum configuration in advance. The ANN structure for the best modeling of a sensor array is obtained by a trial and error procedure. The optimization process includes verifying a combination of training strategies, their associated parameters, the dimension of the hidden layer and the transfer functions to be used in the hidden and output layers. These characteristics will define the specific configuration leading to the best modeling ability.

Certain characteristics of the ANN configuration were initially fixed. These included the number of input neurons, which was five (the five sensors from the array); the number of output neurons, which was two (the two modeled analytes); the transfer function of the output layer, which was linear (purelin) and a single hidden layer of neurons. These selections are based on previous experience with electronic tongues using potentiometric sensors [27,30,33]. The learning strategy used was Bayesian

Regularization and employed, for its internal parameters, a learning rate of 0.1 and a momentum of 0.4, selected from preliminary tests. The modeling capability of the ANN was examined in terms of the root mean squared error (RMSE) of the concentrations sought, and in the comparison graphs of predicted vs. expected concentrations for the two ions.

When compared with others, the strategy selected for the learning process (Bayesian Regularization) provided better RMSE value, greater consistency between the predicted and obtained values for the training, a higher significance for the external test set and, besides, an internal validation subset of samples was not necessary given it avoids overfitting by other means [34]. In our case, parameters such as the number of neurons in the hidden layer, and the transfer function used in the hidden layer were varied systematically in order to get the best final performance.

Figure 3. Selection of the optimal number of neurons in the hidden layer for the ANN model using tansig and purelin transfer functions for hidden and output layer respectively. (A) RMSE values, (B) correlation coefficients, (C) obtained slopes and (D) intercepts for the comparison regression between obtained vs. expected concentrations.

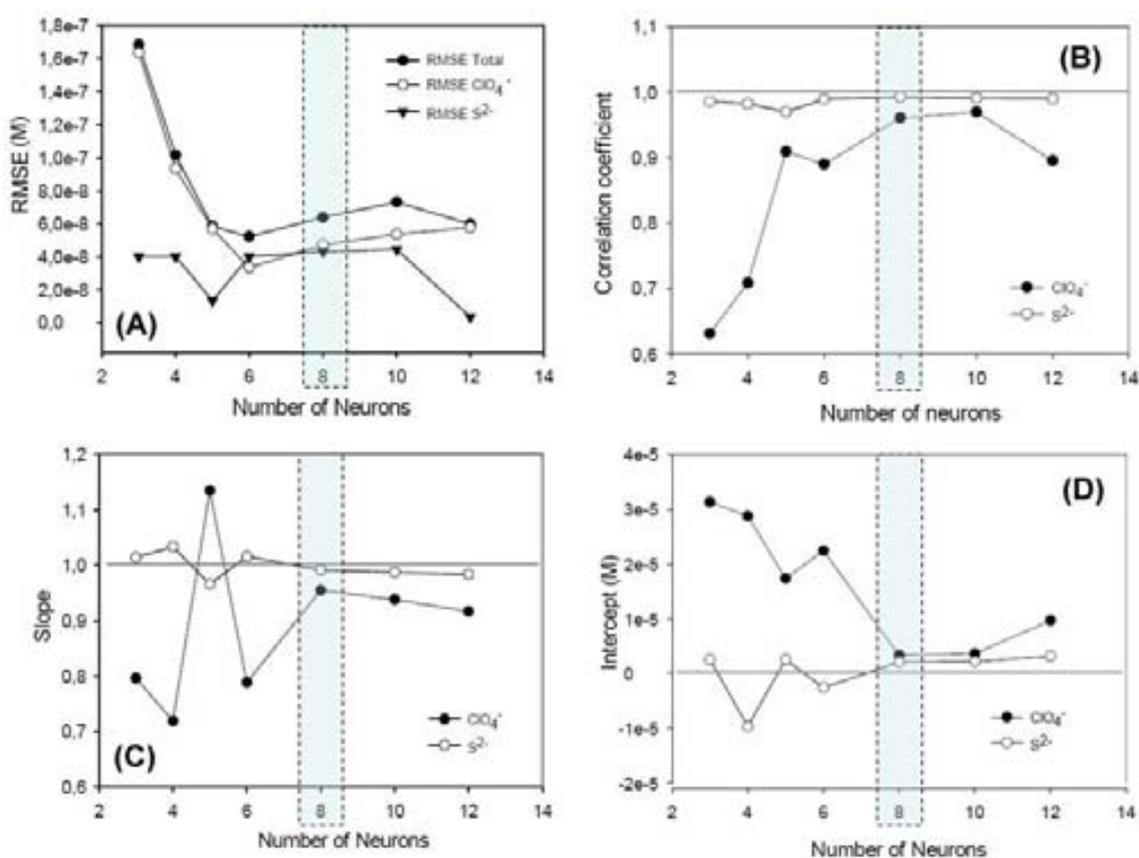


Figure 3 shows a summary of the results obtained during the optimization of ANN features, the number of neurons in the hidden layer is selected as eight and the transfer functions were tansig (hyperbolic tangent sigmoid) and purelin (linear) for hidden and output layer respectively. The factors considered for the selection were an accuracy of model fit, calculated with smaller RMSE (root mean squared error), and correct prediction abilities, as shown in the obtained vs. expected comparison

graphs for the two ions, where their slope, intercept and correlation comparison parameters should approximate 1, 0 and 1 for best performance.

Figure 4. Modeling performance achieved for the optimized ANN with samples from the training test (A,B) and the external test set: (C,D): on the left, perchlorate ion; on the right, sulfide ion. The dashed line corresponds to ideality, and the solid line is the regression of the comparison data. Uncertainty intervals calculated at the 95% confidence level.

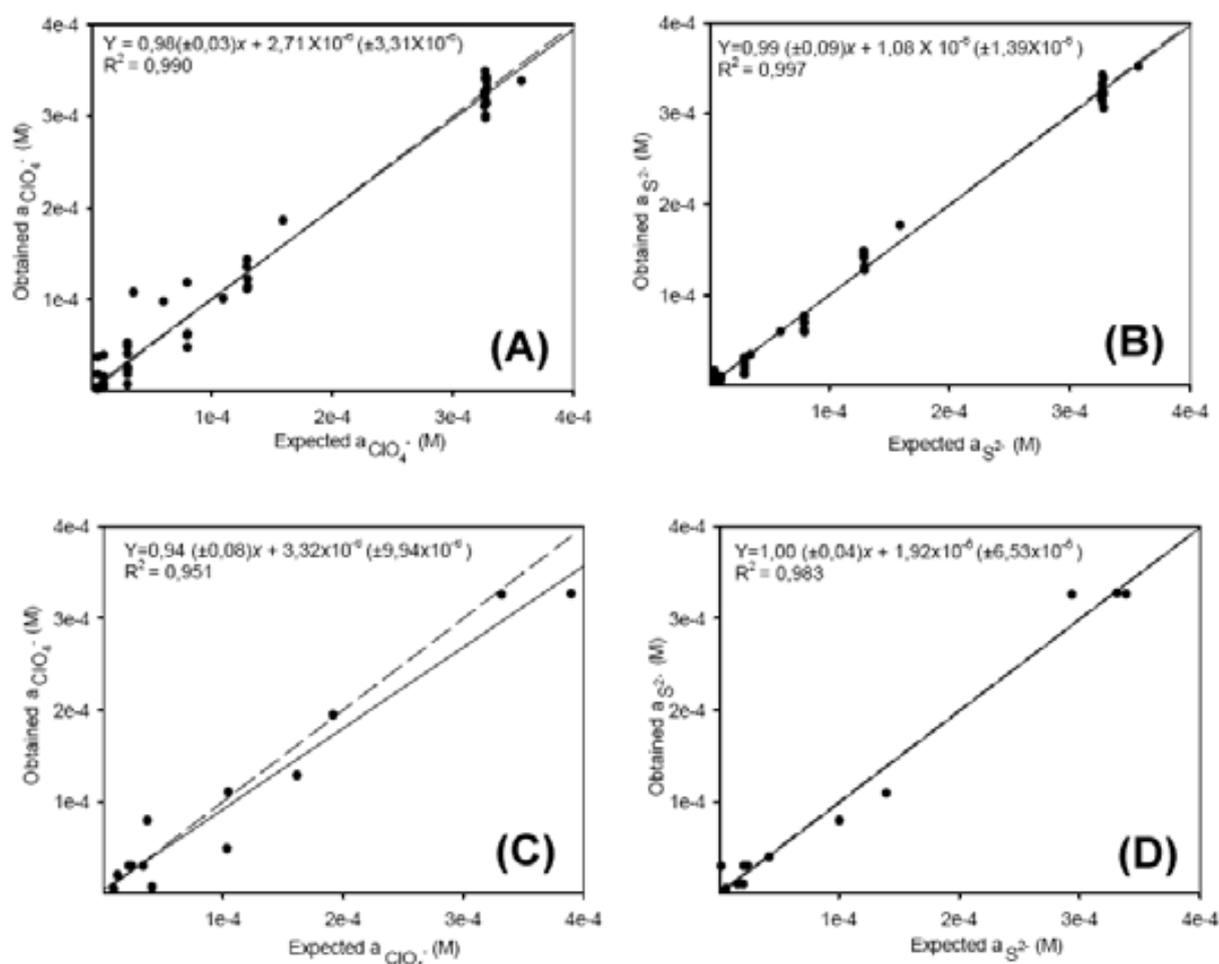
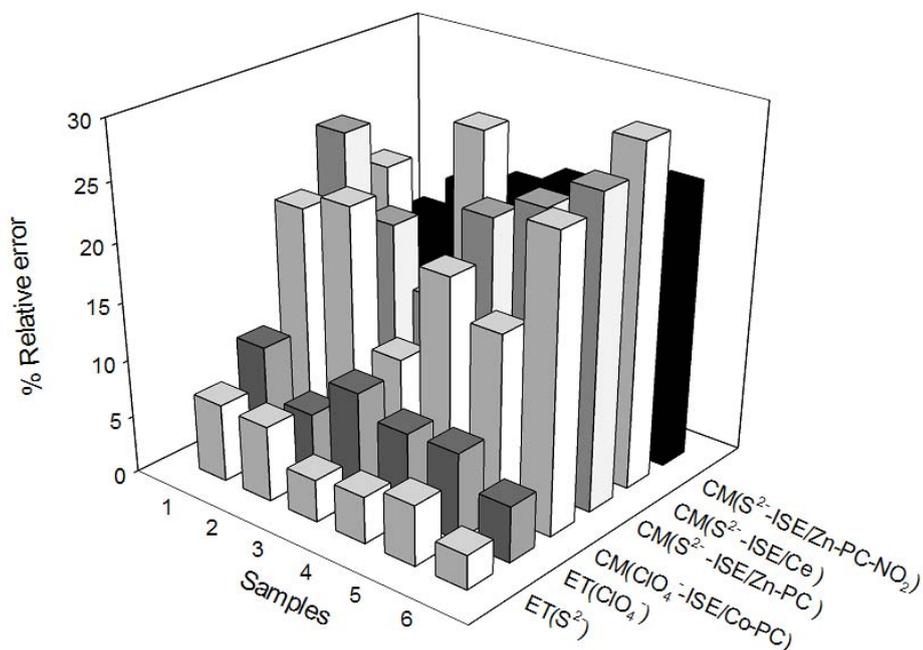


Figure 4 illustrates the behavior of the modeling system, and the correlation between the obtained (y) and expected (x) values for the training and external test subsets of the two individual ions. As can be seen the model prediction is very good for both ions, the accuracy of the obtained response is adequate, with unity slope and zero intercept (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level). In Figure 4(C) (perchlorate, external test subset) a greater dispersion is observed for this ion; the presence of a single ClO_4^- -ISE in the sensor array maybe the cause of these results. In order to check whether the results corresponded to a local area or a global minimum of the system, the ANN was trained five times, the weight values for the neurons being reset at random each time in order to estimate the precision of the model.

3.3. Application

To evaluate the performance of the sensor array, six wastewater samples with initial concentrations of 0.3×10^{-6} to 3.4×10^{-5} M of S^{2-} and ClO_4^- were spiked with standard additions of the two ions 0.01 M to obtain a maximum concentration of 5.0×10^{-4} M for both ions.. Their concentrations were predicted employing the ANN response model built previously. Figure 5 shows the relative error obtained for the wastewater samples. The two first rows ET (S^{2-}) and ET (ClO_4^-) are the results obtained by the optimized ET, the other ones are the results of the conventional method: by interpolation in the calibration curve for each individual electrode. As can be seen, the error values obtained in the determination of the two target ions with the ET are in the order of 5% and always lower than the result obtained with conventional method using the equivalent single electrode. The determination of perchlorate concentration was less precise than the sulfide determination and the reason could be the same as above: the array contained a single perchlorate ISE.

Figure 5. Absolute errors (%) obtained for the simultaneous determination of sulfide and perchlorate in synthetic samples by the proposed electronic tongue and by use of standard potentiometry with each individual ISE in the array.



In order to judge the goodness of the results obtained employing the proposed ET methodology, a Student's paired samples t-test was performed. The calculated t statistics are: $t = 0.11$ for the ClO_4^- ion and $t = 1.52$ for the S^{2-} ion. In both cases, the calculated t statistics were clearly below the tabulated critical value of $t^* = 2.57$ (5 degrees of freedom and 95% confidence level), demonstrating that there were no significant differences between results obtained with the sensor array and the nominal concentration of the synthetic samples.

4. Conclusions

An electronic tongue with potentiometric sensors for the simultaneous determination of perchlorate and sulfide in synthetic samples and wastewaters was developed. The sensor array was formed by specific ISEs formulated with metallophthalocyanines, which give diverse response patterns to the anions considered. Some of the membranes were prepared with its ionophores covalent linked to a polymeric support allowing for a long-living sensor with improved performance and selectivity. The combined response was modeled with an ANN, showing better performance characteristics than when compared with individual sensors used in standard way, which permits to recommend the electronic tongue for studying polluting episodes of this nature. The followed procedure did not require any pretreatment of the sample, in a simpler manipulative procedure.

Acknowledgements

This work was supported by Spanish Ministry of Science and Innovation through project MCINN CTQ2010-17099 and by program ICREA Academia. D. Wilson gratefully acknowledges the concession of a PhD grant by the Universitat Autònoma de Barcelona.

References

1. Patnaik, P. *A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances*, 2nd ed.; Wiley: New York, NY, USA, 1999.
2. Soleymanpour, A.; Hamidi Asl, E.; Nabavizadeh, S.M. Perchlorate selective membrane electrodes based on synthesized platinum(II) complexes for low-level concentration measurements. *Sens. Actuat. B* **2007**, *120*, 447-454.
3. Lawrence, N.S.; Davis, J.; Compton, R.G. Analytical strategies for the detection of sulfide: A review. *Talanta* **2000**, *52*, 771-784.
4. Zanjanchi, M.A.; Arvand, M.; Akbari, M.; Tabatabaeian, K.; Zaraei, G. Perchlorate-selective polymeric membrane electrode based on a cobaloxime as a suitable carrier. *Sens. Actuat. B* **2006**, *113*, 304-309.
5. Lawrence, N.S.; Deo, R.P.; Wang, J. Electrochemical determination of hydrogen sulfide at carbon nanotube modified electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *517*, 131-137.
6. Püntener, M.; Vigassy, T.; Baier, E.; Ceresa, A.; Pretsch, E. Improving the lower detection limit of potentiometric sensors by covalently binding the ionophore to a polymer backbone. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *503*, 187-194.
7. Heng, L.Y.; Hall, E.A.H. One-step synthesis of K⁺-selective methacrylic-acrylic copolymers containing grafted ionophore and requiring no plasticizer. *Electroanalysis* **2000**, *12*, 178-186.
8. Vlasov, Y.; Legin, A.; Rudnitskaya, A.; Di Natale, C.; D'Amico, A. Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1965-1983.
9. del Valle, M. Electronic tongues employing electrochemical sensors. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1539-1555.

10. Gutés, A.; Cespedes, F.; del Valle, M.; Louthander, D.; Krantz-Rülcker, C.; Winquist, F. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sens. Actuat. B* **2006**, *115*, 390-395.
11. Rudnitskaya, A.; Schmidtke, L.M.; Delgadillo, I.; Legin, A.; Scollary, G. Study of the influence of micro-oxygenation and oak chip maceration on wine composition using an electronic tongue and chemical analysis. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *642*, 235-245.
12. Gil, L.; Garcia-Breijo, E.; Ibañez, J.; Labrador, R.H.; Llobet, E.; Martinez-Mañez, R.; Soto, J.; Electronic tongue for qualitative analysis of aqueous solutions of salts using thick-film technology and metal electrodes. *Sensors* **2006**, *6*, 1128-1138.
13. Di Natale, C.; Macagnano, A.; David, F.; D'Amico, A.; Legin, A.; Vlasov, Y.; Rudnitskaya, A.; Selenev, B. Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue. *Sens. Actuat. B* **1997**, *44*, 423-428.
14. Mimendia, A.; Gutiérrez, J.M.; Leija, L.; Hernández, P.R.; Favari, L.; Muñoz, R.; del Valle, M. A review of the use of the potentiometric electronic tongue in the monitoring of environmental systems. *Environ. Modell. Softw.* **2010**, *25*, 1023-1030.
15. Chang, C.-C.; Saad, B.; Surif, M.; Ahmad, M.N.; Shakaff, A.Y.M. Disposable e-tongue for the assessment of water quality in fish tanks. *Sensors* **2008**, *8*, 3665-3677.
16. Ciosek, P.; Wroblewski, W. Sensor arrays for liquid sensing—Electronic tongue systems. *Analyst* **2007**, *132*, 963-978.
17. Riul, A., Jr.; Dantas, C.A.R.; Miyazaki, C.M.; Oliveira, O.N., Jr. Recent advances in electronic tongues. *Analyst* **2010**, *135*, 2481-2495.
18. Cortina, M.; Duran, A.; Alegret, S.; del Valle, M. A sequential injection electronic tongue employing the transient response from potentiometric sensors for anion multidetermination. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 1186-1194.
19. Ciosek, P.; Maminska, R.; Dybko, A.; Wroblewski, W. Potentiometric electronic tongue based on integrated array of microelectrodes. *Sens. Actuat. B* **2007**, *127*, 8-14.
20. Umezawa, Y.; Umezawa, K.; Bühlmann, P.; Hamada, N.; Aoki, H.; Nakanishi, J.; Sato, M.; Xiao, X.P.; Nishimura Y. Potentiometric selective coefficients of ion selective electrodes. Part II. Inorganic anions. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 923-994.
21. Xu, W.-J.; Chai, Y.-Q.; Yuan, R.; Liu, S.-L. A novel thiocyanate-selective electrode based on a zinc-phthalocyanine complex. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 926-930.
22. Hassan, S.S.M.; Kelany, A.E.; Al-Mehrezi, S.S. Novel polymeric membrane sensors based on Mn(III) porphyrin and Co(II) phthalocyanine ionophores for batch and flow injection determination of azide. *Electroanalysis* **2008**, *20*, 438 - 443.
23. Ganjali, M.R.; Pourjavid, M.R.; Shamsipur, M.; Poursaeri, T.; Rezapour, M.; Javanbakht, M.; Shargi, H. Novel membrane potentiometric sulfate ion sensor based on zinc-phthalocyanine for the quick determination of trace amounts of sulfate. *Anal. Sci.* **2003**, *19*, 995-999.
24. Baró-Romà J.; Sánchez, J.; del Valle, M.; Alonso, J.; Bartrolí J. Construction and development of ion-selective electrodes responsive to anionic surfactants. *Sens. Actuat. B.* **1993**, *15*, 179-183.
25. Schneider, A.C.; Pasel, C.; Luckas, M.; Schmidt, K.G.; Herbell, J.D. Determination of hydrogen single ion activity coefficients in aqueous HCl solutions at 25 °C, *J. Soln. Chem.* **2004**, *33*, 257-273.

26. Polshin, E.N.; Kirsanov, D.O.; Rudnitskaya, A.M.; Legin, A.V.; Vlasov, Y.G. Comparison of the analytical potential of individual sensors and a multisensor system of the electronic tongue type for the example of determination of the perchlorate ion. *Russian J. Appl. Chem.* **2010**, *83*, 1563-1569.
27. Gutierrez, M.; Moo, V.M.; Alegret, S.; Leija, L.; Hernandez, P.R.; Munoz, R.; del Valle, M. Electronic tongue for the determination of alkaline ions using a screen-printed potentiometric sensor array. *Microchim. Acta* **2007**, *163*, 81-88.
28. Richards, E.; Bessant, C.; Saini, S. Multivariate data analysis in electroanalytical chemistry. *Electroanalysis* **2002**, *14*, 1533-1541.
29. Gallardo, J.; Alegret, S.; de Roman, M.A.; Muñoz, R.; Hernández, P.R.; Leija, L.; del Valle, M. Determination of ammonium ion employing an electronic tongue based on potentiometric sensors. *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 2893-2908.
30. Cortina, M.; Ecker, C.; Calvo, D.; del Valle, M. Automated electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of a ternary anionic surfactant mixture. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *46*, 213-218.
31. Despagne, F.; Massart, D.L. Neural networks in multivariate calibration. *Analyst* **1998**, *123*, 157R-178R.
32. del Valle, M. Potentiometric electronic tongues applied in ion multidetermination. In *Electrochemical Sensor Analysis*; Alegret, S., Merkoç A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 721-753.
33. Gallardo, J.; Alegret, S.; Munoz, R.; Leija, L.; Hernandez, P.; del Valle, M. Use of an electronic tongue based on all-solid-state potentiometric sensors for the quantitation of alkaline ions. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 348-355.
34. Demuth, H.; Beale, M. *Neural Network Toolbox, for Use with MATLAB*; Mathworks Inc.: Natick, MA, USA, 1992; p. 355.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ARTÍCULO 3

Potentiometric electronic tongue-flow injection analysis system for the monitoring of heavy metal biosorption processes, **Deivy Wilson**, Manel del Valle, Salvador Alegret, Cesar Valderrama, Antonio Florido, *Talanta*, 93 (2012), 285-292.



Potentiometric electronic tongue-flow injection analysis system for the monitoring of heavy metal biosorption processes

D. Wilson^a, M. del Valle^a, S. Alegret^a, C. Valderrama^b, A. Florido^{b,*}

^a Sensors and Biosensors Group, Chemistry Dept., Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain

^b Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2011

Received in revised form 7 February 2012

Accepted 16 February 2012

Available online 22 February 2012

Keywords:

Grape stalk wastes

Copper sorption

Ion-selective electrodes

Flow-injection potentiometry

Electronic tongue

On-line monitoring

ABSTRACT

An automated flow injection potentiometric (FIP) system with electronic tongue detection (ET) is used for the monitoring of biosorption processes of heavy metals on vegetable wastes. Grape stalk wastes are used as biosorbent to remove Cu^{2+} ions in a fixed-bed column configuration. The ET is formed by a 5-sensor array with Cu^{2+} and Ca^{2+} -selective electrodes and electrodes with generic response to heavy-metals, plus an artificial neural network response model of the sensor's cross-response. The real-time monitoring of both the Cu^{2+} and the cation exchanged and released (Ca^{2+}) in the effluent solution is performed by using flow-injection potentiometric electronic tongue system. The coupling of the electronic tongue with automation features of the flow-injection system allows us to accurately characterize the Cu^{2+} ion-biosorption process, through obtaining its breakthrough curves, and the profile of the Ca^{2+} ion release. In parallel, fractions of the extract solution are analysed by spectroscopic techniques in order to validate the results obtained with the reported methodology. The sorption performance of grape stalks is also evaluated by means of well-established sorption models.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The toxic effects of heavy metals in the environment are well known and governments introduce strict regulations with regard to metal discharge, mainly from industrial processes. Toxic metals are not easily biodegraded and enter in the food-chain where they can be accumulated on living tissues causing serious diseases. For these reasons, it becomes necessary to remove them from liquid wastes at least to the limit accepted by the regulations. The elimination of heavy metals in aqueous effluents frequently requires the use of complex and expensive technologies [1,2].

Recently, the ability of biological materials to fix metal ions has received considerable attention for the development of an efficient, clean and cheap technology for wastewater heavy metal removal. These materials represent a suitable alternative as compared to conventional sorbents frequently used (ion-exchange resins, activated carbon, etc.). Specially, their low cost makes their disposal feasible in contrast with an expensive regeneration. One of these sorbents, grape stalk wastes generated in the wine production process, resulted in a good sorption system for the elimination and

recovery of metal ions as Cu^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI) and Cr^{3+} . These studies have been carried out at laboratory scale, in both batch and continuous-flow methodologies [1–4].

First results obtained in batch experiments indicated that the sorption of heavy metals on grape stalks released alkaline and alkaline earth metals (K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}), as well as protons [5], suggesting that ionic exchange is predominantly responsible for metal ion uptake.

Conventionally, analytical methods as flame atomic absorption spectroscopy (FAAS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) and flow injection analysis with potentiometric detection (FIP) have been used in the monitoring of metal biosorption processes. The advantages of these methods are well known, however there are several drawbacks to consider: the spectroscopic methods use expensive equipment, are not well suited to on-line operation, require trained personal and, in many cases, a sample treatment is needed, affecting the analysis time. On the other hand, FIP is much user-friendly, produces data ideally at real time, permits automation and has a high sampling throughput. However, FIP depends of the quality and selectivity of the ion-selective electrodes used. Moreover, methods above may present some limitations on simultaneous or multiparametric analysis, an important aspect when working with real samples.

In the last years, the sensor's field has attempted the simultaneous analysis of species with a new strategy based on the use of multiple sensors showing cross-selectivity, in the approach known

* Corresponding author at: Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, Av. Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 4010981; fax: +34 93 401 58 14.

E-mail address: antonio.florido@upc.edu (A. Florido).

as electronic tongue (ET). According to the recent IUPAC definition [6] an ET is a “multisensor system, which consists of a number of low-selective sensors and uses advanced mathematical procedures for signal processing based on pattern recognition and/or multivariate data analysis—artificial neural networks (ANNs), principal component analysis (PCA), etc”. The purpose of the processing tool differs depending on the application; it can be to identify a chemical species or to determine its concentration without having to eliminate interferences or to quantify them at all [7].

Considering the number of works already published and the number of different laboratories working with their principles, electronic tongues and electronic noses, bio-inspired sensor analysis systems for liquid and gas determination respectively, can be qualified as a consolidated trend in the sensor's field, [8,9]. The applications of ET systems found in the literature are extended, especially for qualitative analysis (recognition, identification, classification) [7,10,11], even though quantitative analysis is becoming more important in the last few years [12,13], especially the resolution of multicomponent mixtures [14]. Thanks to these range of possibilities, ETs are starting to prove useful as quality control devices in the food industry/environment along with a few other applications such as water and process monitoring and clinical analysis [7]. The application of ETs in the simultaneous multi determination of heavy metals was successfully demonstrated in mine leachates [15], as well as more recently, in environmental field by using a light addressable potentiometric sensor (LAPS), prepared in an array format and furnished with differentiated selectivity chalcogenide thin films [16].

Sensor arrays have been integrated frequently in flow systems in order to automate the sample handling and the recording of the multichannel signals [7]. A recent review inspected in detail the use of electronic tongues as detection systems in flow systems, specifically by using flow injection analysis (FIA) principles as automation aid [17]. In these terms, a FIA system employing an array of chalcogenide glass sensors was described with the aim of determining heavy metals [18].

In the present work, the removal of Cu^{2+} ions from aqueous solutions onto grape stalk wastes in a fixed bed column is evaluated. The real-time monitoring of both the Cu^{2+} and the cation exchanged and released (Ca^{2+}) in the effluent solution is performed by potentiometric sensors by combining flow-injection techniques (FIP) and electronic tongue (ET) detection. Flow-injection potentiometric electronic tongues (ET-FIP) are a novel trend in the sensor field [7] in which the implementation of sensor arrays and FIP generates complex response peaks that can be processed with chemometric tools as a procedure to solve complex mixtures from chemical process analysis as, per example, metal biosorption from polluted effluents; the ET-FIP approach is intended for improving the performance of single sensor detection.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

The ionophores, calcium bis[4-(1,1,3,3-tetramethyl-butyl)-phenyl]-phosphate (CaBTMBPP), calcium-ionophore I (ETH 1001), tetrabenzyl pyrophosphate (TBPP), [2,2']-furildioxime monohydrate (FDMH); the plasticizers, dioctylphenylphosphonate (DOPP), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), bis(1-butylpentyl)adipate (BBPA), dibutylphthalate (DBP); the additives, sodium tetratheryborate (NaTPB) and potassium tetrakis(4-chlorophenyl)borate (KTpCIPB); and the polymer chromatographic grade poly(vinyl chloride) (PVC) were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland).

Metal solutions were prepared by dissolving appropriate amounts of $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}(\text{s})$ or $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}(\text{s})$ in deionised water (Milli-Q, Millipore; Molsheim, France). These reagents, tetrahydrofuran (THF) and metal standard solutions (1000 mg L^{-1} , used for Flame Atomic Absorption Spectroscopy, FAAS) were analytical grade and purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Grape stalk wastes generated in the wine production process (supplied by a wine manufacturer of Subirats, Penedès DO region, Barcelona, Spain), were rinsed three times with deionised water, dried in an oven at 110°C until constant weight, and finally cut and sieved for a particle size of 0.8–1.0 mm. Their properties as sorbents are in Ref. [19].

2.2. Membranes and electrodes

The ion-selective electrodes (ISEs) employed in the electronic tongue were all-solid-state tubular flow-through electrodes. Heterogeneous membranes based on a composite of Ag_2S – CuS in epoxy resin were used in the preparation of the Cu^{2+} -selective sensors as is reported in the literature [19]. The Ca^{2+} -selective and the two generic sensors were prepared by using the corresponding ionophore in a PVC membrane, and constructed according to established procedures in our laboratories [20]. The composition of the sensor membranes used in the ET is listed in Table 1. All the flow-through tubular electrodes were placed inside a Perspex sandwich module, for their insertion in the flow system [26]. An Orion double-junction electrode (Model 90-02-00, Thermo Fisher Scientific, Beverly, MA, USA) was used as reference electrode.

2.3. Sorption experiments

All sorption experiments were conducted in duplicate in glass columns of 72 mm length and 10 mm internal diameter (Omnifit) and uniformly packed with 1.3 g of grape stalk waste (particle size of 0.8–1.0 mm) previously treated. During the column sorption operation, the aqueous metal solution containing approximately 35 mg L^{-1} of Cu^{2+} was pumped upwards through the column at a constant flow rate (30 mL h^{-1}). The sorption of Cu^{2+} ions from this solution involves ion-exchange processes where Ca^{2+} present in the grape stalk, are released. The influent solution in the column sorption consist in the solution of Cu^{2+} ion in deionised water, the effluent outlet of the column is composed by a variable content of calcium released from biosorbent as well as other ions (H^+ , K^+ , etc.) in lower amounts. The column effluent is pumped in fixed time intervals to the sensor array, which determines the concentration of calcium and copper in time. In order to compare with conventional analytical techniques, samples were collected from the outlet of the column by a fraction collector (Gilson FC204) at pre-set time intervals. Afterwards, metal concentrations in the influent and effluent solution were determined by flame atomic absorption spectrometry (FAAS, at a wavelength of 324.8 nm) using a Varian absorption spectrometer (Model 1275) and by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, Perkin-Elmer model Optima 4300DV) for Cu^{2+} and Ca^{2+} , respectively. All experiments were performed at room temperature.

2.4. Breakthrough sorption capacity

The capacity at exhaustion q_{column} (mmol g^{-1}) is determined by calculating the total area below the breakthrough curve. This area represents the amount of solute sorbed by mass of solid in the sorption zone that goes from the breakpoint to exhaustion [3,4].

The breakthrough point is chosen arbitrarily at some low value, C_b (mmol L^{-1}); and the sorbent is considered to be essentially

Table 1
Composition of the sensor membranes employed in the array.

Sensor	PVC (%)	Plasticizer (%)	Ionophore (%)	Additive (%)	Reference
Ca1	33.3	<i>o</i> -NPOE (65.2)	Calcium-ionophore I, ETH 1001 (1.0)	NaTPB (0.5)	[21]
Ca2	29.8	DOPP (63.2)	Bis[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl]-phosphate, CaBTMBPP (7.0)	–	[22]
Generic1	34.5	BPA (63.2)	Tetrabenzyl pyrophosphate, TBPP (2.3)	KTpCIPB (X=0.4)	[23]
Generic2	32.0	DBP (62.0)	[2,2′]-Furildioxime monohydrate, FDMH (4.0)	KTpCIPB (2.0)	[24]
Cu	CuS (30.9%), Ag ₂ S (30.9%), araldite M (27.2%) and HR hardener (10.9%)				[25]

exhausted when the effluent concentration, C_x (mmol L⁻¹), reaches the 90% of C_0 (initial concentration of sorbate, mmol L⁻¹) [27,28].

$$q_{\text{column}} = \frac{\int (C_0 - C) dV}{m} \quad (1)$$

where C is the outlet metal concentration (mmol L⁻¹) and m is the mass of sorbent (g). The column sorption process requires prediction of the concentration–time profile or breakthrough curve for the effluent. Various mathematical models can be used to describe fixed bed sorption. One of the simplest and most widely used is the Thomas model [29]; this model allows determining the maximum concentration of solute in the solid phase as well as the sorption rate constant. The linearized form of the model is expressed as:

$$\ln \left(\frac{C_0}{C} - 1 \right) = \frac{k_{Th} q_0 m}{Q} - \frac{k_{Th} C_0 V_{eff}}{Q} \quad (2)$$

where k_{Th} is the Thomas rate constant (mL min⁻¹ mmol⁻¹), q_0 is the equilibrium metal uptake per gram of the sorbent (mmol g⁻¹), Q is the volumetric flow rate (mL min⁻¹), V_{eff} is the volume of effluent (mL) and m is the mass of sorbent inside the column (g).

The bed depth service timed (BDST) model, which was formulated by Hutchins [30,31] elucidates a relation between the service time and the packed-bed depth of the column and is expressed as:

$$C_0 t = \frac{N_0 h}{u} - \frac{1}{K} \ln \left[\frac{C_0}{C} - 1 \right] \quad (3)$$

where C_0 is the influent concentration (mmol L⁻¹), C is the effluent concentration at time t (mmol L⁻¹), K is the sorption rate constant (L (mmol min)⁻¹), N_0 is the sorption capacity (mmol L⁻¹), h is the bed depth of fixed-bed sorbent (cm), u is the linear flow rate (cm min⁻¹) and t is the service time to breakthrough (min).

The Yoon–Nelson model [32] is based on the assumption that the rate of decrease in the probability of sorption for each sorbate molecule is proportional to the probability of sorbate sorption and the probability of sorbate breakthrough on the sorbent [29,32]. The linearized model for a single component system is expressed as:

$$\ln \frac{C_t}{C_0 - C} = k_{YN} t - \theta_r k_{YN} \quad (4)$$

where k_{YN} is the rate constant (per min) and θ_r is the time required for 50% sorbate breakthrough (min).

If the dynamic behaviour of a fixed-bed sorption column can be predicted by the above-described models, the Marquardt's percent standard deviation (MPSD) indicates an estimation of error between the experimental and theoretical values of C/C_0 used for plotting the breakthrough curve; the MPSD can be calculated by using the following equation [33]:

$$\text{MPSD} = 100 \cdot \sqrt{\frac{1}{N-P} \sum \left[\frac{(C/C_0)_{\text{exp}} - (C/C_0)_{\text{theo}}}{(C/C_0)_{\text{exp}}} \right]^2} \quad (5)$$

where N is the number of data points and P is the number of parameters (or the degrees of freedom of the system).

2.5. Electronic tongue-flow injection experiments (ET-FIP)

Five flow-through tubular electrodes were used in the developing of the ET-FIP system (see Table 1). Two sensors based on different ionophores were selective to Ca²⁺ ions (Ca1 and Ca2), another sensor was selective to Cu²⁺ ions (Cu), and two generic sensors were based on different ionophores (Generic 1 and Generic 2), the first a Pb²⁺ ISE with residual response to Ca²⁺ and Cu²⁺, and the second a Ca²⁺ ISE with strong interference of Cu²⁺.

In these experiments, the same manifold of the computer controlled-flow injection potentiometric system developed by Florido et al. [19] as well as the hardware, software, monitoring procedure, optimized flow parameters and other characteristics, were used.

The carrier solution used in all experiments consisted on sodium nitrate solution 0.2 mol L⁻¹, used as ionic strength adjustor, plus equimolar aqueous solution of Cu²⁺ and Ca²⁺ nitrates with total concentration of 2.0 × 10⁻⁶ mol L⁻¹, this background level of the two target ions was added in order to improve recovery of the baseline.

The nonlinear response of the sensors caused by the interference effect was modelled adequately by ANN [34]. For training purpose, the patterns used in the ET-FIP consisted on 36 different standard solutions (mixtures of Ca²⁺ and Cu²⁺ ions) prepared by dilution from a 1 mol L⁻¹ stock solution. From these, an independent subset of 10 analogue solutions was employed for evaluating modelling performance of the developed approach. The concentration levels ranged from 0 to 60 mg L⁻¹ (0–0.0015 mol L⁻¹) for Ca²⁺ and 96 to 0 mg L⁻¹ (0.0015–0 mol L⁻¹) for Cu²⁺ ions. ANN calculations were done in MATLAB 7.0 (MathWorks, Natick, MA) using its Neural Network Toolbox (v.4.0).

3. Results and discussion

The previous on-line computer controlled-flow injection potentiometric system [19] was improved by introducing as detection system an electronic tongue based on an array of chemical sensors for the monitoring of metal-biosorption processes. The array consisted in 5 different selective and non-specific tubular potentiometric sensors, based on heterogeneous and polymeric membranes. The combination of the electronic tongue and the on-line computer-controlled flow injection potentiometric system (ET-FIP) should provide an analytical methodology with important advantages in the simultaneous monitoring of metal ions during biosorption processes in grape stalk wastes.

3.1. Sensor characterization

First experiments were carried out in order to characterize the main analytical features of the prepared potentiometric sensors. The results for these evaluations are summarized in Table 2. All electrodes presented Nernstian responses for the corresponding

Table 2
Response characteristics of the ISEs used in ET-FIP.

Sensor	Sensitivity to Ca ²⁺ (mV/dec) ^a	Sensitivity to Cu ²⁺ (mV/dec) ^a	Concentration range (mol L ⁻¹)	PDL (mol L ⁻¹) ^a	Interference ^b	
					log $K_{Ca,Cu}^{pot}$	log $K_{Cu,Ca}^{pot}$
Ca1	29.8 ± 0.9	22.6 ± 0.8	7.5 × 10 ⁻⁷ –6.5 × 10 ⁻²	(4.2 ± 0.6) × 10 ⁻⁷	-3.2 ± 0.2	-
Ca2	30.1 ± 1.1	17.8 ± 0.9	5.7 × 10 ⁻⁶ –0.5 × 10 ⁻²	(1.3 ± 0.7) × 10 ⁻⁶	-2.5 ± 0.3	-
Cu	17.6 ± 1.2	30.4 ± 1.3	8.6 × 10 ⁻⁶ –1.2 × 10 ⁻²	(2.0 ± 0.5) × 10 ⁻⁶	-	-3.5 ± 0.2
Generic1	25.8 ± 1.2	28.0 ± 1.5	6.8 × 10 ⁻⁶ –1.3 × 10 ⁻²	(3.5 ± 0.8) × 10 ⁻⁶	2.2 ± 0.2	-2.5 ± 0.3
Generic2	29.8 ± 0.8	21.2 ± 1.6	8.7 × 10 ⁻⁶ –2.1 × 10 ⁻²	(4.1 ± 0.9) × 10 ⁻⁶	-2.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2

^a n = 10.

^b n = 4.

primary ion, with slopes around +29 mV/dec, as expected for divalent cations. The values of the practical detection limits (PDL) were around to 10⁻⁶ mol L⁻¹ for all ISEs except for Ca1 sensor which presented a PDL of 4.2 ± 0.6 × 10⁻⁷ mol L⁻¹. The electrodes were practically used every day during 3 months in different experiments; in this period the stability of the electrodes was studied and the values of slope and PDL for all sensors were similar to initial values, with standard deviations (for 20 determinations) lower than ±1.6 mV/dec and ±0.9 × 10⁻⁶ mol L⁻¹ for slope and PDL, respectively.

The presence of cross-response is a pre-requisite characteristic of ISEs to be considered when building an ET [6,35]. In order to estimate the cross-selectivity of the sensors used in this work, the potentiometric selectivity coefficients were determined according to the IUPAC recommended fixed interference method [36] (FIM). According to the values of the selectivity coefficients obtained, all sensors showed certain cross response to the target ions. This fact can be seen in Table 2 and Fig. 1 (fiagram obtained during calibration of the five flow-through sensors employed in the ET at different concentration levels of Cu²⁺ ions), where even the best Ca²⁺ ISE employing ionophore ETH1001 displays response to Cu²⁺ when Ca²⁺ is absent.

The concentration range of linear response was determined with the objective to establish the concentration levels for the calibration model and quantify the samples. For all electrodes, the range values were between 8.7 × 10⁻⁶ and 0.5 × 10⁻² mol L⁻¹, except for Ca1 sensor that showed values between 7.5 × 10⁻⁷ and 6.5 × 10⁻² mol L⁻¹.

3.2. Optimization of the electronic tongue-flow injection potentiometric system

The complete optimization of FIA parameters and manifold for a single sensor were performed by Florido et al. [19]. In the present study, where an array with five sensors is involved, only the influences of flow rate and injection time were verified again for all sensors of the ET. Two flow rates (1.0 and 2.0 mL min⁻¹) were studied at two concentration levels (1.0 × 10⁻⁴ and 1.0 × 10⁻³ mol L⁻¹) for all ISEs of the ET. Higher peaks heights were obtained at 2.0 mL min⁻¹ for both concentration levels, which coincides with previous work [19]; good mixing characteristics and reduced axial diffusion of injected species may be the explanation for this observation.

The sample and standards injected volume introduced in the ET-FIP system was adjusted by controlling the opening time of the solenoid valves. This time was optimized by studying the response into the system of a 10⁻⁴ mol L⁻¹ Ca²⁺ solution, at different valve opening times: 20, 40, 60, 80, 100, 140 and 180 s. Fig. 2 shows the response obtained for the Ca1 sensor. It can be seen that 60 s was the minimum injection time that gives sharp peaks and, at the same time its peak height is approximately the 95% of the steady-state potential. For these reasons, 60 s was selected as the injection time. The same value was obtained with the other four ISEs of the array. This activation time corresponds to an injected sample volume of 2000 μL.

In order to verify the correct operation of all parts of the proposed ET-FIP system, Ca²⁺ and Cu²⁺ standard solutions at same concentration (5.5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹) were prepared and introduced individually into the system from different inlets (sample or standards). Metal concentrations were determined from previous calibration curves, in flow conditions, and the precision values

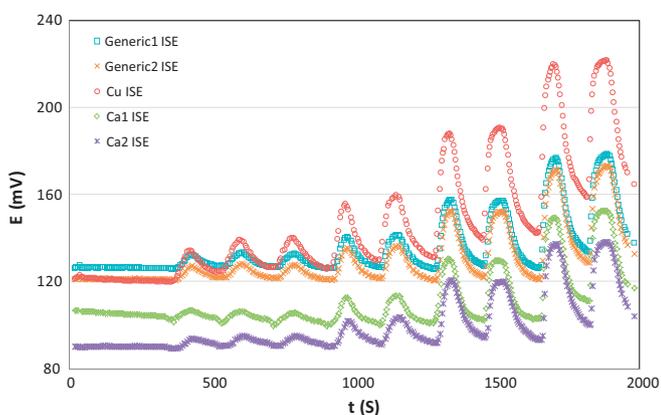


Fig. 1. Diagrams obtained during calibration of the flow-through sensors for different concentration levels of Cu²⁺ ions (10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³ and 10⁻² mol L⁻¹); two consecutive peaks for all concentration levels except for 10⁻⁵ mol L⁻¹.

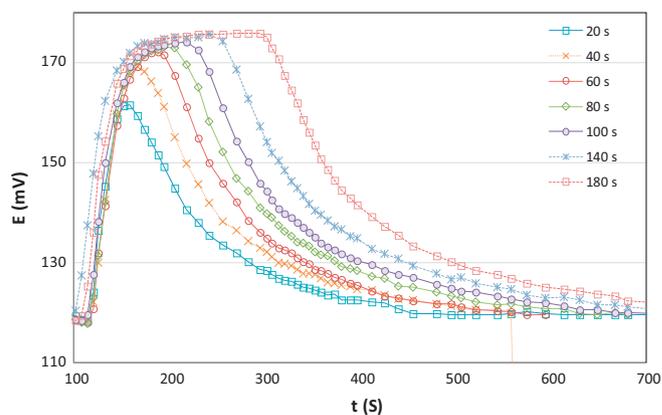


Fig. 2. Effect of the injection time (injected sample volume) on the peak responses of the Ca1 sensor. Peaks were obtained for Ca²⁺ standard solution (1.0 × 10⁻⁴ mol L⁻¹) and at a constant flow rate of 2.0 mL min⁻¹. The potential at the stationary state was 176 ± 1 mV.

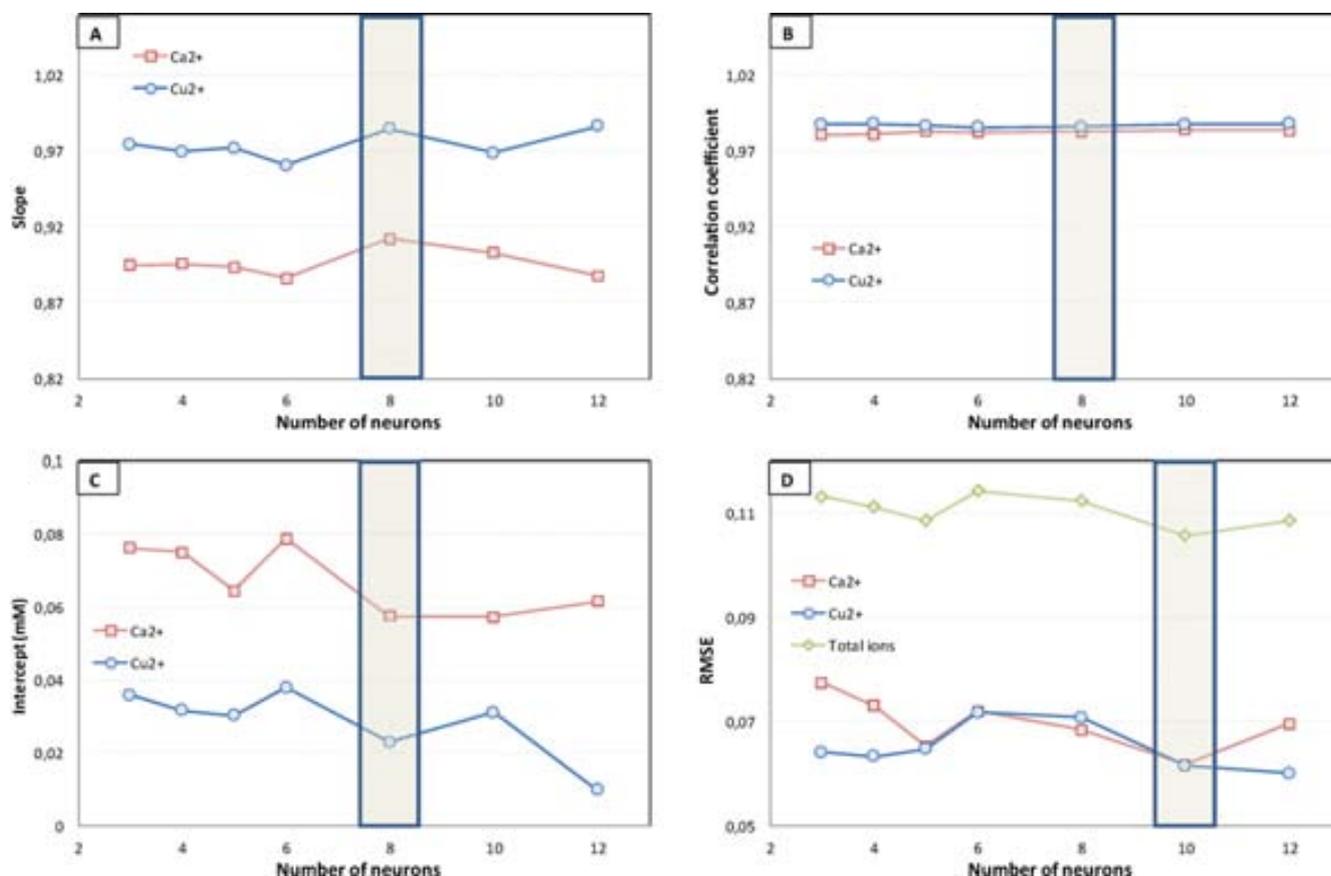


Fig. 3. Selection of the optimal number of neurons in the hidden layer for the ANN model considering: (A) slopes; (B) correlation coefficients; (C) intercepts and (D) RMSE values for the comparison regression between obtained vs. expected results.

obtained were 4.9% RSD and 4.5% RSD for Ca^{2+} and Cu^{2+} , respectively ($n = 10$, repetitivity calculations).

3.3. Building of the ANN response model

Artificial neural networks (ANNs) were used as the mathematical method of data processing to build the response model in this work. A total of 36 solutions, mixtures of Ca^{2+} and Cu^{2+} ions, were prepared according to a factorial design scheme (6 levels, 2 factors) in order to obtain the model response. The set of standard solutions were split into two subsets: a training subset containing 26 samples, used to build the response model, and a test subset containing 10 samples, used to evaluate the model predictive

ability. The selection is done randomly [37] and avoiding samples with maximums and minimums in the testing subset, in order to eliminate any extrapolation.

Before the optimization process, the following characteristics of the ANN were fixed, as accumulated experience from our laboratories [38]: the type of network (feedforward, backpropagation with multiple output), the training algorithm (Bayesian regularization), the training parameters: learning rate ($\alpha = 0.1$) and momentum ($\beta = 0.4$), the use of a single hidden layer, 5 neurons in the input layer (one per each ISE peak heights) and 2 neurons (one per each analyte concentration) in the output layer. In order to get a certain level of confidence in the final results, other configuration parameters were optimized such as the number of neurons in the hidden

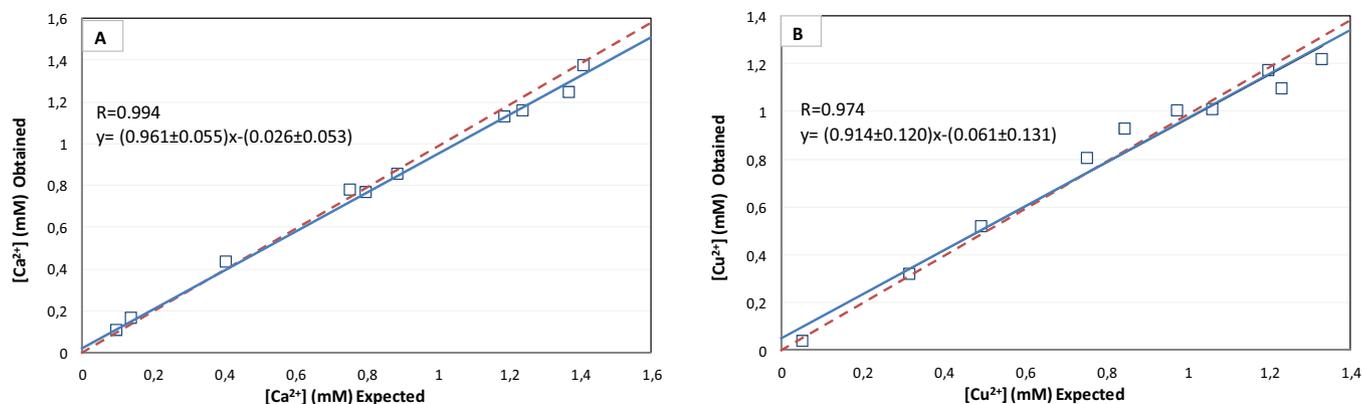


Fig. 4. Modelling performance achieved for the optimized ANN and the external test set: (A) response to Ca^{2+} , (B) response to Cu^{2+} . The dashed line corresponds to ideality, and the solid line is the regression of the comparison data.

layer, and the transfer functions in the hidden and output layers (linear or non-linear). The selection of the best combination of the ANN parameters was performed based on the root mean square error (RMSE) and prediction abilities obtained by the calculated vs. expected comparison graphs for the two metals.

Fig. 3 shows a fragment of the optimization process in order to select the optimal number of neurons for certain combination of transfer functions. After comparison of all results, the following characteristics of network were considered: 8 neurons in the hidden layer, and *tansig* (hyperbolic tangent sigmoid) and *purelin* (linear) as transfer functions in the hidden and output layers, respectively.

Fig. 4 illustrates the correlation between the obtained (y) and expected (x) concentration values of the two individual ions for the external test subsets. As can be seen, the model prediction is fairly good for both ions, with correlation coefficients, slopes and intercept values close to the theoretical ones, illustrated as the diagonal line. At the same time, the prediction values (RMSE) were in agreement with the above facts. In the correlation analysis (all confidence intervals were calculated at the 95% confidence level), the dispersion and the limit of confidence of the slope and intercept for the Cu^{2+} response were greater than for the Ca^{2+} one. This could be attributed to the fact that the sensor array in the ET is formed for two different Ca^{2+} electrodes and only one Cu^{2+} membrane, a fact giving a richer, more differentiated response for the former.

3.4. Evaluation of ET-FIP monitoring of ion-exchange processes involved in metal-biosorption

Finally, a fixed-bed column filled with grape stalk wastes was coupled to the ET-FIP system in order to study the removal of the Cu^{2+} ions from the aqueous solution. Thus, the Cu^{2+} sorption onto the biosorbent, and the subsequent release of Ca^{2+} ions were monitored by ET-FIP system. The set of responses obtained from the sensor array was processed by employing the ANN model previously optimized, obtaining in this way the two concentrations sought.

Biosorption experiments were performed at a similar way as reported in [19]. The only change in the procedure was that the training was performed immediately after the biosorption process to avoid variability caused by time. In addition and in order to counteract any possibility of sensor drift, a standard solution was introduced into the system every 4 h during the biosorption process in the column and during the training and validation process of the electronic tongue. Considering that a complete biosorption experiment and the training and validation process in our conditions took about 26 and 8 h of monitoring respectively, it is important to point out that the drift for each individual sensor was examined carefully. The maximum potential drifts obtained during the experiments are around $\pm 0.2 \text{ mV h}^{-1}$, this signal change is not considered relevant for the study.

Fig. 5 shows the breakthrough curves for the Cu^{2+} -biosorption process and the release of Ca^{2+} ions from the grape stalks, relative to volume of effluent pumped. These curves were also plot by the conventional method of calculating the ion concentration from the calibration curve of the corresponding individual ISE (without interference correction) and by using the cross-selectivity involved in the ET-FIP system. Moreover and in order to compare with established analytical procedures, Fig. 5 also shows the copper breakthrough curves obtained by FAAS and the profile of the calcium concentration values, quantified by ICP-OES.

As can be seen, there are some discrepancies between the curves when considering the conventional method (individual ISE without interference correction) and by using the ET-FIP system. The main differences between the methods were obtained in the range between 100 and 400 mL of effluent pumped in the case of copper

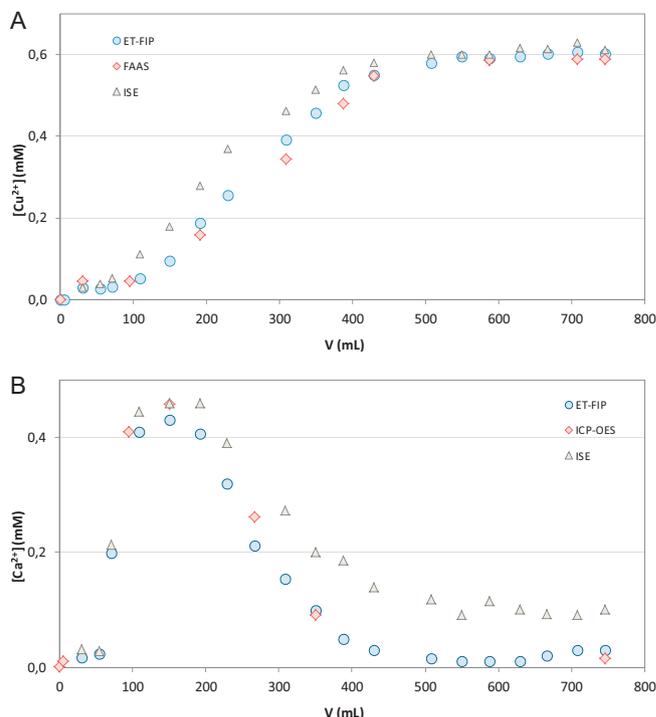


Fig. 5. The breakthrough curve for the sorption of Cu^{2+} onto grape stalks obtained by the on-line ET-FIP system, by ISE and by FAAS (A); and profile of the Ca^{2+} ion obtained by the on-line ET-FIP system, by ISE and by ICP-OES (B).

curves, and from the 220 mL to the end of experiment for calcium profiles. The results of both methods were compared statistically by the Student's paired sample t test; the calculated t statistics are: $t=8.17$ for calcium determination and $t=4.77$ for copper determination. In both cases, the t statistics are greater than the critical tabulated value of $t^*=2.10$ and 2.11 for calcium and copper with 18 and 17 degrees of freedom respectively and 95% confidence level. This statistical analysis indicates that there are significant differences between results obtained with the conventional method of calibration curve for individual ISE and those of the electronic tongue, in detriment of the direct potentiometric method. The relative error values were calculated between results from the two compared methods and corroborated the last observation. In the severe interference ranges mentioned above, relative errors reached values of 39–208% and 12–101% were obtained for calcium and copper respectively. Fig. 5 can also be employed to compare the copper breakthrough curves obtained by the ET-FIP system and by FAAS and the profile of the calcium concentration quantified by ET-FIP system and by ICP-OES. In this case, the statistical comparison yielded a calculated value for calcium determination of $t=2.27$, lower than the tabulated value for 7 degrees of freedom ($t^*=2.36$), and $t=0.65$ for copper, also lower than the tabulated value for 4 degrees of freedom ($t^*=2.78$). Correlations obtained were 0.9951 ($n=8$) and 0.9945 ($n=5$) for calcium and copper determination, respectively. As this statistical test demonstrates, the results obtained by the proposed ET-FIP system showed an excellent agreement with those determined by reference methods (the spectroscopic methods) for both ions. This better correlation could be explained by the fact that the electronic tongue takes profit of cross-sensitivity and thus it considers and compensates the effect of interferences on the electrode response. It is then demonstrated that ET based on a sensor array reports more accurate results than those obtained by using individual ISEs, when directly used without performing any chemical treatment to mask or to eliminate interfering effects of the sample or other ions in the procedure. In

Table 3Comparison of Thomas, BDST and Yoon–Nelson model and experimental parameters for Cu²⁺ sorption onto grape stalk wastes.

	Model		Experimental	
Thomas	q_0 (mmol g ⁻¹)	0.112	q_0 (mmol g ⁻¹)	0.116
	K_{Tn} (mL mmol ⁻¹ min ⁻¹)	15.63		
BDST	N_0 (mmol L ⁻¹)	27.60	N_0 (mmol L ⁻¹)	28.75
	K_{BDST} (ML mmol ⁻¹ min ⁻¹)	15.63		
Yoon–Nelson	θ_r (min)	502.6	θ_r (min)	509.7
	K_{YN} (min ⁻¹)	0.009		
r^2		0.97		
MPSD		9.67		

fact and also deduced from Fig. 5, one can observe that Cu²⁺ ions affect more the response of the Ca electrodes than Ca²⁺ ions the Cu sensor response, when considered as individual ISEs. This effect is in agreement to the values of the potentiometric selectivity coefficients presented in Table 2, where the interference of Cu²⁺ shows to be somewhat stronger.

3.5. Modelling the ion exchange mechanism

In order to characterise the performance of the grape stalk wastes in fixed bed column for Cu²⁺ sorption, the experimental data obtained by the ET-FIP technique was fitted to the Thomas, BDST and Yoon–Nelson models. The breakthrough and the exhaustion volumes observed experimentally are reached after 71 and 420 mL, respectively. The sorption parameters obtained from slopes and intercepts of linear plots of Eqs (2)–(4) [28] are summarized in Table 3 and compared to the experimental data. The sorption parameters obtained were in concordance to the experimental breakthrough data. Thus, the sorption capacity q_0 reported by the Thomas model was 0.112 mmol L⁻¹ while the experimental value was 0.116 mmol L⁻¹ representing less than 3.7% of error. In the same sense, the sorption capacity of bed volume N_0 reported by the BDST model and the time required for 50% sorbate breakthrough θ_r reported by the Yoon–Nelson model were close to the experimental values as shown in Table 3. Furthermore, the MPSD value indicates a good fit of the Thomas, BDST and Yoon–Nelson models to Cu²⁺ sorption experimental data.

Previous studies showed grape stalk wastes as potential sorbent for metal removal from aqueous solution in batch experiments [5,39]. In these works, sorption of Cu²⁺ on grape stalks showed a significant release of Ca²⁺ and alkaline metals (K⁺, Mg²⁺) as well as protons, indicating that ionic exchange is predominantly the responsible mechanism for metal ion uptake. In this study, the release of Ca²⁺ was monitored in the effluent solution in order to evaluate the sorption behaviour of the exchanged cation Cu²⁺. As can be seen in Fig. 6, the sorption of Cu²⁺ ions from the solution involves ion-exchange processes where Ca²⁺ ions present in the original grape stalk structure, are released. Thus, after the

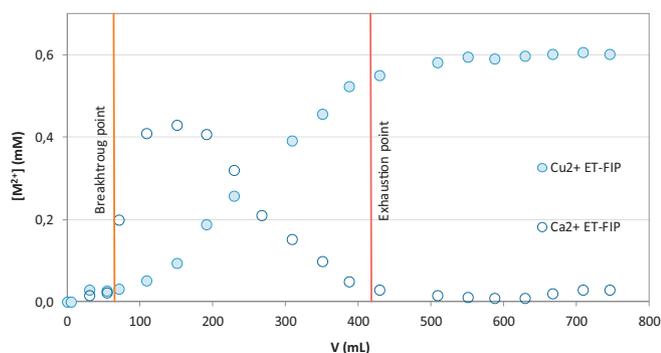


Fig. 6. The breakthrough curve for the sorption of Cu²⁺ ion onto grape stalks and profile of the Ca²⁺ ion, both obtained by the on-line ET-FIP system.

breakthrough point (around 70 mL), the concentrations of Ca²⁺ reached its maximum with a continuous increase of the Cu²⁺ concentration. The consequent decrease on the Ca²⁺ concentrations indicates the exhaustion of the exchange capacity of the sorption column (the exhaustion point is around 420 mL). The total amount of metal bound and released were 0.233 and 0.147 meq g⁻¹ for Cu²⁺ and Ca²⁺, respectively. These values were quite close to those previous obtained in batch experiments [39].

4. Conclusions

An electronic tongue flow-injection potentiometric system has been proposed for the monitoring of the ion-exchange processes involved in the sorption of Cu²⁺ onto grape stalks and release of Ca²⁺ ions. The results obtained showed an excellent agreement with those determined by reference methods for both ions. This better correlation could be explained by the fact that the electronic tongue takes profit of cross-sensitivity and thus it considers and compensates the effect of interferences on the electrode response. It demonstrates that ET based on a sensor array reports more accurate results than those obtained by directly using individual ISEs, with relative error of 86.0% and 74.0% for Ca²⁺ and Cu²⁺ respectively for conventional calibration method and 4.1% and 4.4% for Ca²⁺ and Cu²⁺, respectively, for the proposed ET. Moreover, it has been demonstrated that with the proposed ET-FIP approach, a quantitative multi-determination of a short number of chemical species is easily attainable. However, the developed system offers a wide range of possibilities and the conjunction of flow-injection potentiometry and electronic tongues has appeared as an integrated option for the automatic monitoring of laboratory or pilot-plant processes, resulting in a versatile and expandable instruments. In the illustrated case, a precise, interference compensating and completely automatic procedure was attained to characterize without any manual intervention the sorption performance of the grape stalks as a biosorbent material.

Acknowledgements

This work was supported by MICINN (Spanish Ministry of Science and Innovation) projects CTM2008-06776-C02-02/TECNO and CTQ2010-17099, and by program ICREA Academia. D. Wilson gratefully acknowledges the concession of a Ph.D. grant by the Universitat Autònoma de Barcelona.

References

- [1] N. Fiol, C. Escudero, I. Villaescusa, Bioresour. Technol. 99 (2008) 5030–5036.
- [2] C. Valderrama, J.A. Arévalo, I. Casas, M. Martínez, N. Miralles, A. Florido, J. Hazard. Mater. 174 (2010) 144–150.
- [3] A. Florido, C. Valderrama, J.A. Arévalo, I. Casas, M. Martínez, N. Miralles, Chem. Eng. J. 156 (2010) 298–304.
- [4] N. Miralles, C. Valderrama, I. Casas, M. Martínez, A. Florido, J. Chem. Eng. Data 55 (2010) 3548–3554.
- [5] M. Martínez, N. Miralles, S. Hidalgo, N. Fiol, I. Villaescusa, J. Poch, J. Hazard. Mater. 133 (2006) 203–211.

- [6] A.L.Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, C.D. Natale, A. D'Amico, *Pure Appl. Chem.* 77 (2005) 1965–1983.
- [7] M. del Valle, *Electroanalysis* 22 (2010) 1539–1555.
- [8] A. Riul Jr., C.A.R. Dantas, C.M. Miyazaki, O.N. Oliveira Jr., *Analyst* 135 (2010) 2481–2495.
- [9] P. Ciosek, W. Wroblewski, *Analyst* 132 (2007) 963–978.
- [10] A. Rudnitskaya, L.M. Schmidtke, I. Delgado, A. Legin, G. Scollary, *Anal. Chim. Acta.* 642 (2009) 235–245.
- [11] A. Bratov, N. Abramova, A. Ipatov, *Anal. Chim. Acta.* 678 (2010) 149–159.
- [12] D. Wilson, M.N. Abbas, A.L.A. Radwan, M. del Valle, *Sensors* 11 (2011) 3214–3226.
- [13] A. Mimendia, A. Legin, A. Merkoçi, M. del Valle, *Sens. Actuators B* 146 (2010) 420–426.
- [14] M. del Valle, in: S. Alegret, A. Merkoci (Eds.), *Electrochemical Sensor Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2007, pp. 721–753.
- [15] Y. Vlasov, A. Legin, *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 255–260.
- [16] W. Hu, H. Cai, J. Fu, P. Wang, G. Yang, *Sens. Actuators B* 129 (2008) 397–403.
- [17] A. Gutiérrez, F. Céspedes, M. del Valle, *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 90–96.
- [18] J. Mortensen, A. Legin, A. Ipatov, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, K. Hjulder, *Anal. Chim. Acta* 403 (2000) 273–277.
- [19] A. Florido, C. Valderrama, S. Nualart, L. Velazco-Molina, O.A. de Fuentes, M. del Valle, *Anal. Chim. Acta.* 668 (2010) 26–34.
- [20] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Sens. Actuators B* 101 (2004) 72–80.
- [21] F. Lanter, D. Erne, D. Ammann, W. Simon, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2400–2402.
- [22] A.J. Freund, G.J. Moody, J.D.R. Thomas, B.J. Birch, *Analyst* 108 (1983) 1357–1364.
- [23] D. Xu, T. Katsu, *Talanta* 51 (2000) 365–371.
- [24] A.K. Singh, S. Mehtab, *Sens. Actuators B* 123 (2007) 429–436.
- [25] S. Alegret, A. Florido, J.L.F.C. Lima, A.A.S.C. Machado, *Talanta* 36 (1989) 825–829.
- [26] J. Alonso, J. Baró, J. Bartrolí, J. Sánchez, M. del Valle, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 115–121.
- [27] V.V. Goud, K. Mohanty, M.S. Rao, N.S. Jayakumar, *Chem. Eng. Technol.* 28 (2005) 991–997.
- [28] C. Valderrama, J. Barios, A. Farran, J.L. Cortina, *Water Air Soil Pollut.* 215 (2011) 285–297.
- [29] C.Y. Yin, M.K. Aroua, W.M.A. Daud, *Chem. Eng. J.* 148 (2009) 8–14.
- [30] R.A. Hutchins, *Am. J. Chem. Eng.* 80 (1973) 133–138.
- [31] S. Kundu, A.K. Gupta, *Chem. Eng. J.* 129 (2007) 123–131.
- [32] Y.H. Yoon, J.H. Nelson, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 45 (1984) 509–516.
- [33] V.C. Srivastava, I.D. Malla, I.M. Mishra, *Chem. Eng. Process* 48 (2009) 370–379.
- [34] F. Despagne, J.L. Massart, *Analyst* 123 (1998) 157R–178R.
- [35] M. Gutiérrez, V.M. Moo, S. Alegret, L. Leija, P.R. Hernández, R. Muñoz, M. del Valle, *Microchim. Acta* 163 (2008) 81–88.
- [36] Y. Umezawa, P. Buhlmann, K. Umezawa, K. Tohda, S. Amemiya, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1851–2082.
- [37] M. Cortina, A. Duran, S. Alegret, M. del Valle, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 1186–1194.
- [38] J. Gallardo, S. Alegret, R. Munoz, L. Leija, P.R. Hernandez, M. del Valle, *Electroanalysis* 17 (2005) 348–355.
- [39] I. Villaescusa, N. Fiol, M. Martínez, N. Miralles, J. Poch, J. Serarols, *Water Res.* 38 (2004) 992–1002.