

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**SISTEMAS DE MEDIDA ALTERNATIVOS EN SENSORES ÓPTICOS  
DE UN SOLO USO**

**TESIS DOCTORAL**

**ALEJANDRO LAPRESTA FERNÁNDEZ  
GRANADA, 2007**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Alejandro Lapresta Fernández  
D.L.: Gr. 908 - 2007  
ISBN: 978-84-338-4302-9

**SISTEMAS DE MEDIDA ALTERNATIVOS EN SENSORES ÓPTICOS  
DE UN SOLO USO**

**por**

**ALEJANDRO LAPRESTA FERNÁNDEZ**

**Departamento de Química Analítica  
Universidad de Granada**

**VISADO** en Granada, a 30 de Marzo  
de 2007

**MEMORIA** presentada para aspirar  
al Grado de Doctor en Ciencias  
Químicas.  
Granada, a 30 de Marzo de 2007

Fdo.- Prof. Dr. D. **Luis Fermín Capitán  
Vallvey**, Catedrático del Departamento  
de Química Analítica de la Universidad  
de Granada.

Fdo.- **Alejandro Lapresta  
Fernández**, Licenciado en Ciencias.  
Sección Químicas.



**A MIS PADRES**



# **AGRADECIMIENTOS**



*La realización de esta Tesis Doctoral no se podría haber llevado a cabo sin la ayuda y colaboración de muchas personas. Desde aquí quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas.*

*En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento al director de esta Tesis Doctoral Dr. D. Luís Fermín Capitán Vallvey, por el esfuerzo y dedicación que le ha supuesto la supervisión de este trabajo, y por sus sabios consejos y sugerencias sin las cuales no hubiera sido posible la elaboración de esta Tesis Doctoral.*

*Al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada por su soporte técnico, por su magnífica disponibilidad y hospitalidad. A cada uno de los docentes e investigadores del Departamento de Química Analítica que de una u otra forma han puesto su granito de arena contribuyendo a la realización de este trabajo.*

*Al Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universidad de Granada por su implicación, colaboración y por la ayuda prestada durante el desarrollo de mi Tesis Doctoral.*

A mis compañeros de laboratorio, Clara, Eduardo, López, Julio, Juanfra, Joaquín, Miguel, Younes, Roberto, Isa, Olga, sin olvidarme de Pedro, y al resto de compañeros del Departamento, no me olvido de ellos, que siempre han estado ahí cuando los he necesitado y con los que he compartido tan buenos momentos durante todo este tiempo, haciendo extensible mis agradecimientos a todos los de abajo, empezando por Alfonso y David.

Esta Tesis se ha podido concluir gracias al empuje que, D. José Fernando Huertas Perez, Fefo para quien lo conocemos, ha infundido sobre mi en los momentos difíciles, brindándome un apoyo continuo sin dejarme caer en la desesperación o en la certeza de mi locura. Haciéndome ver que no estaba sólo y que la esperanza no era lo único que me quedaba.

Gracias a D. Emilio López López, que llegó al grupo con una alegría inusitada, contagiándome de ella y de su idiosincrasia. Reemplazando mi agriado espíritu por aquel que tuve cuando empecé en esta odisea, haciéndome entrar en razón, me hizo renovar mis fuerzas por terminar esta Tesis Doctoral y, lamentando su marcha, le deseo los mayores éxitos.

Estas dos personas, Fefo y Emilio, no dudaban en mandar a tomar viento sus quehaceres con tal de apoyarme en mis convicciones, tomándonos una cerveza o un café que con ellos resultaba menos amargo.

De la misma manera, hago extensibles mis agradecimientos al resto de personas que han estado conmigo de alguna forma siendo, fundamental su compañía y agradable el compartir mi tiempo libre con vosotros: Sr. Alejandro Morales Expósito, Sr. Sergio Prados Illescas, Sr. Franciso Illescas Bolivar, Sr. Miguel Ángel Ruiz Torres, Sr. Sergio Molina Castro. Fueron envidiables las tardes dejando volar nuestra fantasía, madurando o inmadurando con vosotros. Tenemos tantas experiencias juntos que de enumeraras ahora, desplazarían a esta Tesis. Y como no pueden olvidarse, esos tiempos volverán.

No me olvido de vosotros dos, Luís y Rusco. Buenos especímenes. Gracias por compartir vuestro tiempo conmigo.

También he de agradecer el interés demostrado por vosotros: Sergio y Sonia junto con Davilillo y el que está por venir, a ti D. Alejandro, a Javi y Ana, Juan Antonio, Jose y Rosa (los cuñaos), Juan Carlos y Rosa, Jose Carlos y Mari Jose, María Jesús, Pablo, Javi y Teresa, Javi Sierra. A todos vosotros que me deseasteis vuestros mejores deseos para que llegara a buen puerto y no quedarme varado a mitad de camino a merced de malas corrientes, sabe Dios dónde. A todos vosotros por vuestro interés y consejos. Gracias.

Tengo también, palabras de agradecimiento para Selu, Jose Antonio o Sergio o como te llamen, para Salva, Luís y Blas. Por los buenos ratos que hemos vivido juntos.

A mi familia, que aunque algunos no tienen ni idea de qué estoy haciendo, quizás debido a que no os lo haya podido explicar mejor, siempre os habéis interesado primero en mi bienestar y luego en mi Tesis, proporcionándome el cariño y la alegría necesarias para mirar para adelante.

A Lydia, la persona que más ha sufrido en esta Tesis mis cambios de carácter, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento en los momentos difíciles, por su comprensión, en definitiva por estar siempre ahí sin permitir que me consumiera esta Tesis Doctoral y por complementarme como persona. Gracias.

De forma especial quiero expresar mi agradecimiento a D. Fermín Capitán Vallvey, por su apoyo recibido en todo este tiempo en el que he podido trabajar junto a él, escuchando sus consejos de maestro que me han hecho aprender y reflexionar en todos los sentidos, haciéndome madurar primero como persona antes que como investigador.

Por los viejos tiempos, por los nuevos y por los buenos momentos que sin duda llegarán. Gracias.

Por todos aquellos que me apoyaron y por todos aquellos que vendrán. Gracias.

También tengo un espacio para todos aquellos momentos no tan buenos por los que he pasado y que a continuación detallo:



*Si te caes siete veces, te levantas ocho.*



La presente Tesis Doctoral se ha realizado en el grupo de investigación "Espectrometría en Fase Sólida" (FQM-118) del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada, bajo la dirección de Dr. D. Luis Fermín Capitán Vallvey.

La financiación necesaria ha corrido a cargo de los siguientes proyectos de investigación: 1) Desarrollo de sensores de un solo uso en el campo medioambiental y agroalimentario. Dirección General de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. Programa Nacional de Promoción General del Conocimiento. Proyecto: BQU2002-00353. 2002-2005; 2) Estudios espectroscópicos de moléculas y desarrollo de sensores ópticos. Convocatoria de Ayudas de Acciones Coordinadas (Orden de 20/julio/2002; BOJA 103 de 3/septiembre/2002 y Orden de 13/mayo/2003; BOJA 110 de 11/junio/2003); 3) Desarrollo de instrumentación portátil multianálisis con sensores de respuesta óptica. Dirección General de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. Programa Nacional de Promoción General del Conocimiento. Proyecto Coordinado: CTQ2005-09060-C02-01 y CTQ2005-09060-C02-02. 2006-2008.

Para la realización de esta Tesis Doctoral se ha disfrutado de una beca de Formación de Personal Investigador asociada al proyecto de investigación BQU2002-00353 del Ministerio de Educación y Ciencia (Ref: BES-2003-1142).

Queremos agradecer la ayuda prestada al Ministerio de Educación y Ciencia, a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía y al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad de Granada.



# ÍNDICE



---

<b>OBJETIVOS DE LA TESIS .....</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1. Sensores desechables basados en ionóforos .....	13
2. Sensores basados en un segundo componente.....	17
2.1. Sensores basados en un segundo componente para cationes .....	21
3. Determinación de potasio, magnesio y dureza .....	30
4. Utilización de escáneres y cámaras para análisis .....	34
5. Bibliografía.....	38
<b>CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA .....</b>	<b>49</b>
1. Características.....	51
1.1. Preparación de los sensores.....	53
2. Metodología de uso.....	55
2.1. Medida del parámetro analítico .....	57
2.1.1. Medidas de Absorbancia.....	57
2.1.2. Medidas de Fluorescencia y tiempo de vida .....	59
2.1.3. Medidas mediante escáneres y cámaras .....	60
2.1.4. Espacios de Color .....	64
2.1.5. Parámetro analítico en escáneres y cámaras .....	66
3. Bibliografía.....	74

---

## **CAPÍTULO 3: DETERMINACIÓN DE MAGNESIO MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO ..... 77**

1. Introducción .....	80
2. Experimental .....	82
2.1. Instrumentación y software .....	82
2.2. Reactivos y materiales .....	83
2.3. Preparación de la membrana sensora.....	85
2.4. Procedimiento experimental y sistema de medida .....	86
2.5. Cálculos.....	86
3. Resultados y discusión.....	87
3.1. Optimización de la respuesta del sensor desechable.....	94
3.1.1. Optimización de la composición de la membrana.....	94
3.1.2. Optimización de los parámetros de reacción .....	97
3.2. Caracterización analítica y Aplicaciones.....	100
4. Conclusiones .....	105
5. Bibliografía .....	106

## **CAPÍTULO 4: SIMPLIFICACIÓN DEL PROCESO DE MEDIDA. INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL..... 109**

1. Introducción .....	112
2. Experimental .....	116

---

2.1. Reactivos y materiales .....	116
2.2. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida.....	116
2.3. Procedimiento experimental.....	117
2.4. Condiciones de medida .....	120
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>121</b>
3.1. Procedimiento de medida .....	121
3.2. Caracterización del sistema portátil .....	128
3.3. Validación y aplicaciones.....	132
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>134</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>135</b>

## **CAPÍTULO 5: LINEALIZACIÓN DE CURVAS DE RESPUESTA EN SENSORES ÓPTICOS DESECHABLES BASADOS EN UN MECANISMO DE CAMBIO IÓNICO PARA CATIONES..... 139**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>142</b>
<b>2. Teoría.....</b>	<b>145</b>
2.1. Modelo general.....	145
2.2. Modelo para el sensor de potasio.....	151
2.3. Modelo para el sensor de dureza .....	152
2.4. Cálculo del límite de detección.....	154
2.5. Estimación de la constante global de equilibrio .....	154
<b>3. Experimental.....</b>	<b>155</b>
2.1. Reactivos.....	155
2.2. Preparación de membranas desechables y procedimiento de medida.....	156

<b>4. Resultados y discusión</b> .....	<b>157</b>
4.1. Verificación del modelo teórico: Establecimiento de la curva de calibrado lineal ....	157
4.2. Aplicaciones analíticas .....	160
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>162</b>
<b>6. Bibliografía</b> .....	<b>162</b>

## **CAPÍTULO 6: DIFERENTES MEDIDAS ESPECTRALES PARA LA DETERMINACION DE POTASIO MEDIANTE SENSORES DESECHABLES**

..... **167**

<b>1. Introducción</b> .....	<b>170</b>
<b>2. Experimental</b> .....	<b>171</b>
2.1. Instrumentación y software .....	171
2.2. Reactivos y materiales .....	173
2.3. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida .....	173
2.4. Condiciones de medida .....	173
2.5. Cálculos .....	173
2.5.1. Medidas de Absorbancia .....	173
2.5.2. Medidas de Reflectancia .....	175
2.5.3. Análisis del color .....	176
<b>3. Resultados y discusión</b> .....	<b>180</b>
3.1. Caracterización analítica del método.....	180
3.1.1. Modelo sigmoidal .....	180
3.1.1.1. Medidas espectrorradiométricas.....	180
3.1.1.2. Medidas espectrofotométricas .....	181
3.1.2. Modelo lineal.....	183
3.1.2.1. Medidas espectrorradiométricas.....	183

---

3.1.2.2. Medidas espectrofotométricas .....	184
3.2. Análisis del color.....	187
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>195</b>
<b>5. Bibliografía.....</b>	<b>196</b>

## **CAPÍTULO 7: EMPLEO DE UN ESCANER CONVENCIONAL PARA LA MEDIDA DE SENSORES DESECHABLES..... 199**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>202</b>
<b>2. Experimental.....</b>	<b>203</b>
2.1. Reactivos y materiales .....	203
2.2. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida.....	203
2.3. Instrumentación y software .....	203
2.4. Condiciones de medida.....	205
2.5. Sistema de análisis y gestión del color .....	206
2.6. Digitalización y adquisición de la imagen.....	207
<b>3. Resultados y discusión .....</b>	<b>210</b>
3.1. Influencia de la adquisición sobre el parámetro analítico utilizando el escaner en modo transfectancia. Selección del canal.....	213
3.2. Influencia del tratamiento de la imagen .....	217
3.3. Área de medida de los sensores desechables .....	220
3.4. Resolución del escaner y profundidad del color .....	223
3.4.1. Escáner en modo transfectancia. Selección del canal .....	223
3.4.2. Escaner en modo transmisión. Selección del canal.....	228
3.5. Selección de los filtros para el modo transmisión .....	229

3.6. Caracterización analítica del método.....	231
3.6.1. Modelo sigmoideal .....	232
3.6.1.1. Escáner en modo transreflectancia .....	232
3.6.1.2. Escáner en modo transmisión.....	236
3.6.2. Modelo lineal.....	239
3.6.2.1. Escáner en modo transreflectancia .....	239
3.6.2.2. Escáner en modo transmisión.....	243
3.7. Veracidad.....	245
3.8. Validación y aplicaciones.....	247
4. Conclusiones .....	249
5. Bibliografía .....	250

## **CAPÍTULO 8: EMPLEO DE UNA CÁMARA CCD PARA LA MEDIDA DE SENSORES DESECHABLES.....253**

1. Introducción .....	256
2. Experimental .....	257
2.1. Instrumentación y software .....	257
2.2. Reactivos y materiales .....	258
2.3. Preparación de la membrana sensora.....	259
2.4. Condiciones de medida .....	259
3. Teoría.....	261
3.1. Modelo general.....	261
3.2. Modelo para el sensor de magnesio .....	261
3.3. Sistema de análisis de imagen .....	264
4. Resultados y discusión.....	267

---

4.1. Parámetro analítico.....	271
4.2. Caracterización analítica .....	271
4.2.1. Modelo sigmoïdal .....	271
4.2.2. Modelo lineal .....	275
4.3. Validación y aplicaciones.....	278
<b>5. Conclusiones.....</b>	<b>280</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>281</b>

## **CAPÍTULO 9: EMPLEO DE UNA CÁMARA DE FOTOGRAFÍA DIGITAL DE COLOR PARA MEDIR MEMBRANAS DESECHABLES ..... 283**

<b>1. Introducción.....</b>	<b>286</b>
<b>2. Experimental.....</b>	<b>286</b>
2.1. Instrumentación y software .....	286
2.2. Reactivos y materiales .....	287
2.3. Preparación de la membrana sensora .....	288
2.4. Condiciones de medida.....	288
<b>3. Teoría.....</b>	<b>289</b>
3.1. Modelo general.....	289
3.2. Sistema de análisis de imagen.....	290
<b>4. Resultados y discusión .....</b>	<b>292</b>
4.1. Medida de potasio, dureza y magnesio .....	292
4.1.1. Parámetro analítico .....	296
4.1.2. Caracterización analítica.....	296

---

4.1.2.1. Modelo sigmoidal.....	296
4.1.2.1.1 Iluminación con lámpara halógena.....	296
4.1.2.1.2 Iluminación con flash.....	300
4.1.2.2. Modelo lineal.....	304
4.1.2.2.1 Iluminación con lámpara halógena.....	304
4.1.2.2.2 Iluminación con flash.....	306
4.2. Medida de pH.....	309
4.3. Validación y Aplicaciones.....	312
5. Conclusiones.....	316
6. Bibliografía.....	316
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>319</b>
<b>ANEXO 1: PUBLICACIONES.....</b>	<b>327</b>

# **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral se refiere al desarrollo de métodos rápidos de análisis químico empleando sensores ópticos desechables tipo tira reactiva para la determinación de analitos inorgánicos de utilidad en análisis de aguas. El esquema de sensado que se utiliza en este estudio se basa en el empleo de ionóforos. El objetivo fundamental de este trabajo se refiere a la exploración de diferentes formas de medida de la propiedad óptica que presentan estos sensores desechables, que es el cambio de color de la membrana sensora. El objetivo de esta exploración se refiere a la forma de conseguir una forma de medida más simple, que permita la determinación cuantitativa sin necesidad de instrumentación espectrofotométrica de sobremesa y, por último, que permita un rango de medida de estas especies en disolución que sea lo más amplio posible. En resumen, se pretende que estos ensayos lleguen a ser lo más independientes posible del laboratorio de análisis y puedan ser llevados a cabo por personal sin ningún tipo de preparación específica.

Para lograr este objetivo se han planteado una serie de objetivos particulares que van desarrollando diferentes aspectos del objetivo anterior.

1. Estudiar un sensor óptico desechable para la determinación selectiva de magnesio en agua basado en un nuevo cromoionóforo.
2. Simplificación del procedimiento de medida de los sensores basados en la química ionóforo – cromoionóforo.
3. Diseño y desarrollo de un fotómetro de tipo portátil para la medida de sensores desechables.
4. Estudio de las posibilidades de linealización de las funciones respuesta sigmoideal de los sensores basados en la química ionóforo – cromoionóforo.
5. Estudiar la posibilidad de determinar potasio de forma semicuantitativa haciendo uso de las coordenadas de color en lugar de las medidas de absorbancia.
6. Evaluación de las posibilidades de usar un escáner como dispositivo para la determinación cuantitativa de diversos analitos mediante sensores desechables a través de la información contenida en la imagen registrada.
7. Estudio del posible uso de una cámara CCD y de una cámara fotográfica digital a color como dispositivos instrumentales para la determinación cuantitativa de analitos mediante sensores desechables usando las imágenes adquiridas.
8. Caracterización analítica de los métodos que se pongan a punto y validación para su aplicación en muestras reales de diverso tipo.

# **CAPÍTULO 1**

## **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

Los ensayos rápidos combinan técnicas analíticas simples, portátiles y baratas con procedimientos de análisis sencillos para la identificación y/o determinación de sustancias. Estos ensayos rápidos son de muy diverso tipo, realmente son difíciles de clasificar, y entre ellos encontramos desde reacciones en disolución con observación visual o medida instrumental, a volumetrías con cuentagotas, medida de la longitud o radio de zonas coloreadas u otros.

Todos estos sistemas tienen de común el que se pueden llevar a cabo fuera del laboratorio de análisis. Por ello, sus resultados no tienen la misma calidad, aunque ciertamente los objetivos que buscan no son los iguales, pues razones de

rapidez, privacidad u oportunidad tienen aquí más importancia que las habituales de un análisis químico, especialmente exactitud o precisión.

Uno de estos sistemas rápidos son los sensores desechables, también llamados tiras reactivas o sensores de gota plana. Son dispositivos analíticos autocontenidos usados a veces junto con instrumentación portátil. Estas formulaciones analíticas incluyen todos los reactivos necesarios para hacer un análisis en estado sólido y en contacto con el problema inician una serie de reacciones o procesos que conducen a la determinación del analito presente<sup>1,2</sup>.

Los sensores desechables, nombre con que los denominaremos a lo largo de esta Memoria, deben de cumplir una serie de condiciones como son: ausencia de manipulación de reactivos y disolventes, sencillez de uso, robustez, facilidad de lectura de resultados, inmediatez, bajo costo y que no sea necesario para su empleo personal entrenado.

Estos dispositivos cubren necesidades de información en casa o a pie de cama por parte de usuarios no cualificados, aunque hay otras muchas, como pueden ser laboratorios de rutina de análisis clínicos o investigaciones de campo por parte de geólogos, policía científica o servicios de vigilancia ambiental con diversos objetivos. Así, determinar de forma rápida valores de parámetros clínicos en orina y sangre, la conocida como Química Seca. También se pueden usar en procedimientos de muestreo para seleccionar que muestras tomar, para monitorizar valores límite en control de procesos, para determinar componentes lábiles, por ejemplo en aguas naturales, mediante análisis *in situ*, o para estimación de niveles de analitos que permitan establecer una estrategia de análisis. Incluso para cuestiones tan aparentemente nimias como la verificación de muestras, por ejemplo, cuando se sospecha una confusión de las mismas.

Los sensores desechables se pueden clasificar en dos formatos diferentes, los basados en observación visual y los que realizan una medida instrumental. Los

primeros se basan en los papeles reactivos, el más conocido de los cuales es el papel de pH. Pretenden clasificar la muestra atendiendo a un parámetro de interés en algún subgrupo de concentraciones. De esta manera se obtiene una información semicuantitativa, basada en la capacidad de discriminación entre colores del ojo humano. Este es el caso de dureza o nitratos en agua. Alternativamente, pueden ser de tipo disyuntivo (si/no) según se supere un determinado valor de concentración, a veces un límite legal. Están diseñados para que sea perceptible por encima de ese nivel, así un test de embarazo.

Los basados en una medida instrumental utilizan una medida cuantitativa que suministra una información más fiable y precisa que la simple distribución en categorías. Las medidas más utilizadas, aunque no las únicas, son las eléctricas y las ópticas. Dentro de las eléctricas, los sensores desechables amperométricos son los de mayor uso, aunque otros, como los potenciométricos, son de interés. Dentro de los sensores desechables ópticos, los más usados son los que se basan en medidas de reflectancia difusa, aunque también en espectrofotometría, fluorescencia, tanto directa como usando campo evanescente y, más raramente, otros como en quimioluminiscencia.

En este tipo de sistemas analíticos, la dimensión comercial y económica es mayor que en otras técnicas y procedimientos, y prueba de ello es el empleo habitual de patentes y modelos de utilidad como forma de protección de resultados. Es frecuente que sean desarrollados por empresas, ya que las características que deben presentar, no solo analíticas sino de estabilidad, robustez mecánica, precio, etc., hacen que sea necesaria una tecnología media/alta para compatibilizar prestaciones y precio. No obstante, suponen una oportunidad de negocio para muchas empresas por el volumen de potenciales clientes que existen y de hecho en la actualidad es un próspero campo de actividad y negocio para muchas empresas como Merck, Macherey-Nagel, Kyoritsu, Hach, LaMotte Company, Industrial Test Systems, etc.

Las ventajas de este tipo de sistemas analíticos ya han sido señaladas. Los inconvenientes se refieren al carácter semicuantitativo de muchos de ellos, su baja exactitud, su escasa capacidad para el análisis de trazas, su carácter dedicado para un tipo de analito en una matriz dada, lo que hace que tengan escasa versatilidad, salvo que se demuestre su utilidad.

Los sensores desechables se han utilizado para la identificación o determinación de analitos a través de diversas estrategias. De una manera general, para lograr el reconocimiento el ligando o reactivo se une químicamente o se entrapa físicamente cerca de la interfase o en el interior de la membrana sensora o bien se inmoviliza directamente sobre su superficie. La señal se genera a partir de la interacción con el reactivo, quien cambia sus propiedades por reacción con el analito, bien él solo o con el concurso de reacciones acopladas.

Los procesos de reconocimiento deben estar basados en reacciones de suficiente selectividad, en conjunción con diversas operaciones analíticas para lograr obtener resultados sobre problemas reales, sin necesidad de tratamiento previo de muestra ni adición de reactivos. Por otra parte, deben estar diseñados de forma que sea fácil su manipulación, sean robustos en su uso, sean estables durante el almacenamiento y se pueda realizar la medida con seguridad, generalmente mediante el uso de instrumentos dedicados. Las reacciones que se usan van desde reacciones de complejación, a reacciones enzimáticas, reacciones antígeno-anticuerpo ó reacciones con ADN.

Los ensayos de fase sólida se pueden clasificar en dos grupos: sistemas verticales y sistemas horizontales, atendiendo a como se relaciona el problema conteniendo el analito con la tira reactiva o sensor desechable<sup>1</sup>. En los sistemas verticales el fluido atraviesa perpendicularmente la capa o capas que constituyen la zona reactiva sufriendo un conjunto de reacciones y procesos que permitirán desarrollar una propiedad analítica<sup>3,4</sup>. En los sistemas horizontales la muestra se deposita sobre una zona de recepción y se mueve por flujo fluido a través de la tira

de ensayo produciéndose como consecuencia de esa migración separaciones cromatográficas, reacciones y/o retenciones de analito o interferentes, que originaran la propiedad analítica<sup>5,6</sup>. En esta Memoria de Doctorado solo trataremos de ensayos de tipo vertical, por lo que a ellos nos atenderemos en lo que continúa.

En los sistemas verticales se pretende integrar todas las operaciones analíticas necesarias en un único conjunto sobre el que vamos a aplicar la muestra, lo que provocará, tras la disolución de los reactivos, caso de que tenga que ocurrir, diferentes reacciones y procesos que concluirán con la realización de la medida. Los tipos de operaciones a realizar dependerán del tipo de problema y de las reacciones químicas usadas para su determinación.

Los reactivos en los sistemas verticales se encuentran en fase sólida y se pueden distribuir o bien a través de toda la matriz de la zona activa del sensor o bien pueden estar compartimentalizados en dominios específicos dentro de la infraestructura de la matriz. Esta distribución de reactivos y componentes necesarios se puede lograr de dos maneras: 1) mediante una única capa, los llamados sistemas monocapa<sup>7-9</sup> ó 2) mediante un conjunto de capas diferenciadas que se encuentran apiladas, los llamados sistemas multicapa<sup>10-13</sup>. La mayor o menor complejidad del sistema dependerá del propio analito, de la complejidad de la matriz que lo contiene y de la selectividad de la reacción de reconocimiento.

### **ESQUEMAS DE SENSADO**

Para lograr el reconocimiento del analito mediante sensores desechables de tipo óptico o visual, se han utilizado diferentes esquemas dependiendo del tipo de analito y de la muestra en la que aquel se encuentre. De una manera general un ligando –portador de iones, ionóforo, indicador o agente complejante- o un reactivo o reactivos se enlazan químicamente o bien se entrapan físicamente cerca de la interfase o bien en el seno de la capa sensora o bien se inmovilizan directamente en la superficie de la zona sensora. La señal óptica se genera mediante la

interacción del reactivo, que cambia sus propiedades ópticas por reacción con el analito, bien solo o con la ayuda de compuestos adicionales –cromoionóforo, fluoroionóforo, colorante indicador, reactivos auxiliares-.

Entre ellos podemos citar: a) reacciones redox, este es el caso de la determinación de yoduro basada en su oxidación a yodo y retención en una membrana de poliestireno como complejo con polivinilpirrildona<sup>14</sup>; b) reacciones orgánicas, así la formación de azoderivados para nitrito<sup>15;16;16-18</sup> o para nitrato previa reducción<sup>15;19;20</sup>. También se puede citar dentro de este grupo la reacción con aminas aromáticas en presencia de cobre para cianuro<sup>21</sup> c) reacciones de precipitación o de disolución de precipitados, así para cloruro se han propuesto sistemas basados en cromato de plata<sup>22</sup>, en barberina<sup>23</sup> o en el complejo de Ag(I) de 2,4,6- tri(2-piridil)-1,3,5-triazina<sup>24</sup>; para sulfato se ha propuesto un sistema basado en el complejo Arsenazo III-bario<sup>25</sup> y otro basado en el complejo ácido rodizónico-bario<sup>26;27</sup>; c) reacciones enzimáticas; muy habituales en análisis clínico, así para cloruro usando la catálisis por dipeptidilpeptidasa I (catepsina C) de la hidrólisis de oligopéptidos derivados<sup>28</sup> o para hidrógenocarbonato basándose en su carácter básico débil mediante una reacción indirecta en la que interviene una  $\beta$ -galactosidasa y un criptandano<sup>28</sup>; d) reacciones de complejación convencionales, así para vanadato<sup>29</sup> o para fosfato mediante la clásica reacción con molibdato y posterior reducción<sup>30</sup> o para borato con cúrcuma<sup>30</sup>; e) reacciones de sustitución de ligandos en complejos cromogénicos como la usada para fluoruros<sup>30</sup>; e) reacciones basadas en ionóforos, así se ha utilizado para cloruro basado en cloruro de triciclohexilestaño<sup>31</sup>.

Vamos a tratar a continuación del esquema de reconocimiento usado para iones en la presente Memoria de Doctorado, a saber, el basado en ionóforos

## 1. Sensores desechables basados en ionóforos

El término ionóforo o portador de iones fue utilizado para describir la capacidad transportadora de iones a través de membranas de la valinomicina y nigericina y señalar el aspecto dinámico del mecanismo de transporte<sup>32</sup>, aunque también se usa el término general ligando para señalar la asociación y coordinación entre la molécula portadora y el ión.

Moore y Pressman observaron una liberación de protones a partir de mitocondrias en disoluciones de potasio y evidenciaron las propiedades únicas de la valinomicina para inducir el transporte activo de potasio a través de membranas y su intercambio por protones<sup>33</sup>. Este proceso de cambio iónico se da también a través de bicapas artificiales<sup>34</sup>, así como en la interfase de membranas poliméricas plastificadas de electrodos selectivos de iones<sup>35</sup>.

La limitación principal que presentan los reactivos convencionales para el desarrollo de sensores de tipo sonda, flujo y, en menor extensión, de gota plana, se debe a las altas constantes de estabilidad que originan con iones metálicos. Ello hizo que aumentará el interés por el uso de ionóforos, que se pueden considerar como moléculas orgánicas lipofílicas, no coloreadas y con capacidad para complejar iones de forma reversible y transportarlos a través de membranas orgánicas<sup>36</sup>. Este tipo de moléculas ha encontrado una amplia utilización en electrodos selectivos de iones especialmente para iones alcalinos y alcalinotérreos y aniones como cloruro<sup>37</sup>.

En este caso, el sentido se logra mediante interacciones supramoleculares, esto es interacciones no covalentes, que tienen la característica general de que son suficientemente débiles como para dar lugar a un proceso de tipo reversible<sup>38</sup>.

Aunque la química basada en receptores para cationes comenzó en 1967 con las investigaciones de Pedersen acerca de la complejación de metales alcalinos con éteres corona, los receptores para aniones no comenzaron a estudiarse hasta 1976 cuando Graf y Lehn<sup>39</sup> describen el encapsulamiento de fluoruro, cloruro y bromuro por un criptato protonado.

El reconocimiento y solubilización de un determinado analito – huésped- por parte del receptor o molécula anfitrión es el resultado de una combinación de aspectos complementarios: número y tipo de átomos/grupos enlazantes, tamaño y forma de la cavidad que originan en la molécula, organización estereoquímica y posicional exacta de los grupos enlazantes y grupos funcionales no enlazantes de la molécula, adecuada preorganización –conformación- de la molécula y reparto favorable de la combinación formada entre las fases acuosa – muestra- y orgánica –zona sensora-. Los tipos de interacciones puestas en juego no son de tipo covalente sino de baja energía, lo que justifica la reversibilidad.

El reconocimiento de aniones se puede lograr mediante receptores abióticos que emplean diferentes tipos de interacción<sup>40</sup>. Las que originan interacciones más fuertes son las interacciones electrostáticas de tipo coulombiano, esto es, la que tiene lugar entre cargas enteras. Se puede diseñar un receptor para aniones basándose exclusivamente en atracciones coulombianas si se elimina la fluctuación estocástica de cargas positivas alrededor del analito aniónico en disolución y se sustituye por un campo permanente. La idea básica de sustituir la nube de cargas fluctuantes por cargas positivas unidas covalentemente en una molécula llevó a diseñar receptores tipo amonio cuaternario<sup>38</sup>.

La eficiencia de los receptores tipo amonio cuaternario se puede incrementar de forma considerable mediante enlaces de hidrógeno complementarios. Para evitar la competencia de contraiones presentes, se pueden utilizar receptores eléctricamente neutros mediante la disposición adecuada de grupos aniónicos unidos covalentemente que originen estructuras zwitterionicas.

Otra alternativa es disponer dipolos eléctricos incorporados en la estructura del receptor de forma que su extremo positivo se oriente hacia donde debe unirse el anión. Además de los receptores basados en amonio cuaternario se han propuesto sales de guanidinio en los que la interacción ocurre por enlace de hidrógeno y apareamiento de cargas<sup>41;42</sup>

Sin embargo, los receptores más eficientes y más fácilmente practicables son los receptores aniónicos neutros basados en enlace de hidrógeno como principal interacción. Su gran ventaja es que estos enlaces son direccionales, lo que permite diseñar receptores con formas específicas capaces de diferenciar entre huéspedes aniónicos con diferente geometría y, por tanto, con diferentes requerimientos para interactuar por enlace de hidrógeno. Se han propuesto un gran número de receptores de aniones<sup>43</sup>, entre ellos se encuentran amidas<sup>44;45</sup>, sulfonamidas, ureas<sup>46</sup>, tioureas<sup>47</sup>, aunque también compuestos con simples grupos hidroxilos o heterociclos como pirrol o imidazolio.

Aunque no es necesaria la presencia de pares electrónicos libres en el anión analito para que se originen enlaces de hidrógeno, cuando existen tienen gran importancia para su reconocimiento supramolecular. Así, en el caso de que el anión posea pares electrónicos libres, lo cual es muy frecuente, estos pueden servir para originar interacciones tipo Lewis con receptores que posean grupos aceptores de electrones. Con este objetivo se han utilizado moléculas orgánicas con zonas altamente deficientes de electrones como heterociclos tipo tetrazina o complejos  $\pi$  de metales con grupos aromáticos orientados o compuestos con centros metálicos como puntos de interacción directa<sup>38</sup>. En este último caso hay diferentes formas de unir el metal a la estructura orgánica. Algunos metales como estaño, boro o mercurio forman enlaces covalentes fuertes y directos que permiten la construcción de receptores con funcionalidad ácido Lewis situada en posiciones predeterminadas con una orientación precisa dentro de la estructura<sup>43</sup>. El uso conjunto de enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas es capaz de originar receptores de

aniones muy efectivos, como es el uso de cajas macrocíclicas protonadas para haluros<sup>40</sup>.

Alternativamente, se pueden construir estructuras receptoras conteniendo un cierto número de posiciones de coordinación con heteroátomos que se usan para formar complejos tipo Werner coordinativamente insaturados con iones metálicos<sup>48</sup>. Las dos estrategias usan el solapamiento de orbitales atómicos de huésped y anfitrión a través del metal para el reconocimiento. Entre los receptores basados en complejos con metales de transición tenemos los complejos tipo polipiridilo principalmente con iones de los metales de los grupos 8 y 9, los basados en tricarbonilo de renio (III), los complejos de lantánidos (III)<sup>49</sup> y los metalodendrimeros<sup>48</sup>.

No se pueden considerar estrictamente como interacciones supramoleculares estas interacciones, pero dado que no suelen ser los enlaces formados de alta energía lo que permite que sean reversibles, es por lo que se pueden considerar como ejemplos de sistemas huésped-receptor. Un ejemplo típico de la incorporación covalente de centros metálicos son los mercuracarborandos<sup>50</sup>.

Un último tipo de interacción usada para el reconocimiento de aniones es el efecto hidrofóbico. Así se ha propuesto para el reconocimiento de naftalenosulfonatos por parte de  $\beta$ -ciclodextrinas y es debido al desplazamiento de moléculas de agua de la cavidad interna de la ciclodextrina por parte del anillo de naftaleno, mientras que el grupo sulfonato permanece fuera de la cavidad en contacto con el disolvente, lo que controla la orientación del grupo naftaleno dentro de la cavidad<sup>51</sup>.

## 2. Sensores basados en un segundo componente

En 1982 se describió un tipo de sistema de dos fases que hacía uso de una membrana en una tira reactiva óptica, del tipo antes llamado de química seca, para la determinación de iones alcalinos en fluidos biológicos<sup>52</sup>. Este tipo de sensor de química seca pertenecía al tipo, mencionado anteriormente, de los basados en segundo componente, en el cual un indicador de pH se combina con un ionóforo para transducir la información producida por la interacción aceptor-huésped en una señal de tipo óptico. A este principio se denominó inicialmente como *heterogenous pH reaction*<sup>53</sup>.

En este caso, se incorporaba en la fase orgánica el ionóforo éter 2,3-nafto-15-corona-5 y el indicador de pH 7-(n-decil)-2-metil-4-(3',5'-diclorofen-4'-ona). La extracción de  $K^+$  en fase orgánica originaba que el indicador sufriese una desprotonación, lo que originaba un cambio en el estado electrónico del indicador y el consecuente desplazamiento espectral.

Este sistema fue patentado por Miles Inc. y comercializado bajo el nombre de analizador de química seca Seralyzer<sup>54;55</sup>. Entre 1983 y 1986 tanto el instrumento como las tiras reactivas fueron evaluadas y el mecanismo en que se basan fue estudiado y discutido por el grupo del Prof. Simon en la ETH de Zurich (Suiza)<sup>56</sup>. Dicho principio fue adaptado para optodos selectivos de iones, tanto de tipo sonda como de flujo, y usado para el desarrollo de gran número de membranas principalmente para diferentes iones metálicos<sup>57;58</sup>.

Estos sensores se basan en los cambios de concentración en el seno de una fase separada o tridimensional –conocidas como *bulk membranes*- que contiene todos los componentes necesarios, disueltos en una membrana polimérica plastificada, generalmente de cloruro de polivinilo (PVC) o un polímero similar, para la extracción y reconocimiento del analito y para la transducción de la entalpía libre del proceso en una señal de tipo óptico.

Los optodos basados en películas hidrófobas no pueden responder a un solo ión, debido a que se debe cumplir el principio de electroneutralidad en el seno de la membrana y no puede haber una transferencia neta de carga hacia la misma. Por ello, se utiliza un equilibrio de transferencia de fase que involucre dos iones diferentes, -uno de ellos el analito y el otro un ión de referencia- de manera que se permita la transferencia de iones en ambos sentidos y se mantenga en todo momento la electroneutralidad en la membrana. Generalmente, la reacción de complejación de uno de los dos iones –el analito- con el ionóforo es el que conduce o desencadena la respuesta de tipo óptico debida al segundo ión o ión de referencia: cambio de absorbancia, fluorescencia, fosforescencia o índice de refracción. Esto significa que la respuesta del sensor se ha descompuesto en dos procesos diferentes: el de reconocimiento del analito por parte del ionóforo y el de transducción de la energía libre del proceso anterior mediante el reconocimiento del ión de referencia mediante un ionóforo específico denominado cromoionóforo.

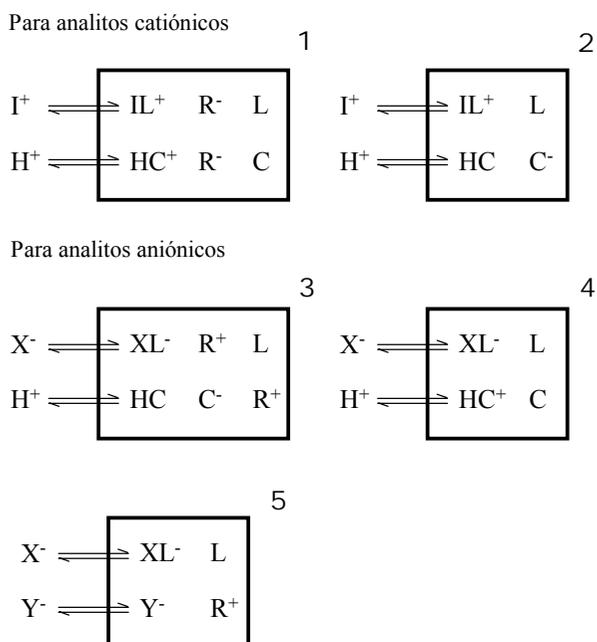


Figura 1.1. Tipos de membranas con ionóforo neutro.

El cromoióforo de transducción química debe mostrar una alta selectividad hacia el ión de referencia y debe reaccionar con él de forma reversible. Generalmente, el ión de referencia utilizado es el protón, pues se pueden usar como cromoióforos indicadores de pH que responden muy selectivamente a este ión. El emplear protones como ión de referencia tiene diversas ventajas, pues el pH de la muestra se puede variar y tamponar en un rango muy amplio de valores y se pueden usar gran número de indicadores con valores de  $pK_a$  diferentes, con la condición de que estén lipofilizados, al objeto de que puedan disolverse en la membrana lipofílica de PVC.

Se han usado una gran variedad de ionóforos y cromoióforos tanto neutros como cargados para la preparación de membranas sensoras. Por otra parte, dependiendo de la carga de los analitos se definen dos mecanismos mediante los cuales se origina la respuesta óptica: un mecanismo de cambio iónico para analitos catiónicos y un mecanismo de extracción para aniónicos.

Dejando a un lado las membranas sensoras de aniones, las membranas sensoras de cationes, basadas en equilibrio de cambio iónico, usan un ionóforo L y un cromoióforo C, ambos neutros, lo que requiere la presencia simultánea de aniones lipofílicos  $R^-$  que proporcionen a la membrana propiedades de cambio iónico (Figura 1.1.1). Si el cromoióforo selectivo de protones está de por sí cargado; esto es, está cargado negativamente cuando no está protonado y es neutro cuando está protonado, no se necesitan aniones lipofílicos en la membrana (Figura 1.1.2).

Si el ionóforo está cargado,  $L^-$ , se necesitarían posiciones iónicas  $R^+$  en la membrana, caso de que el cromoióforo esté cargado  $C^-$  (Figura 1.2.1), pero no serán necesarias con cromoióforos neutros C (Figura 1.2.2). En el caso de que un mismo compuesto actúe como ionóforo y cromoióforo, esto es, sería un cromoióforo en sentido estricto; tanto el analito como el protón serían

selectivamente complejados, pero solo uno de ellos induciría un cambio en la propiedad óptica (Figura 1.2.3).

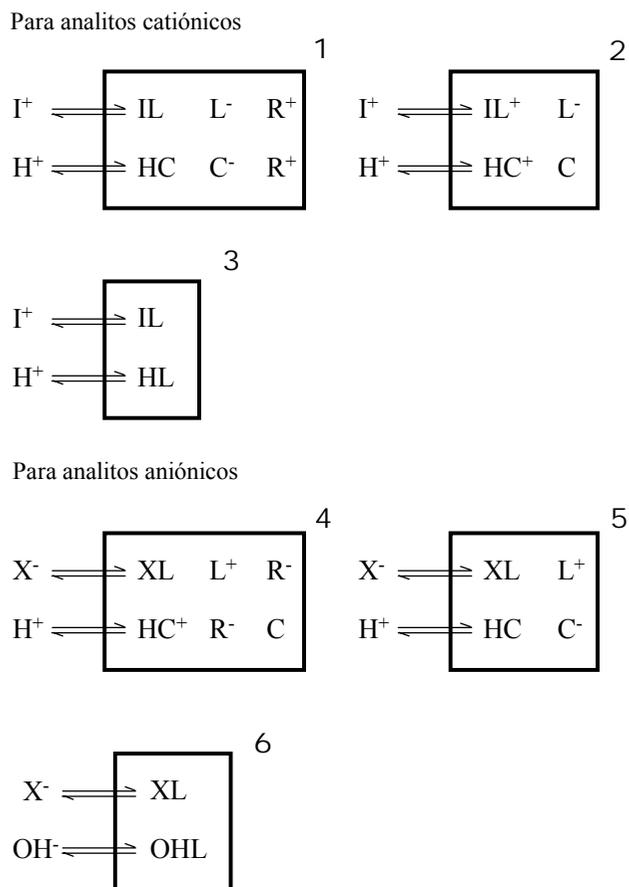


Figura 1.2. Tipos de membranas basadas en ionóforos cargados.

## 2.1. Sensores basados en un segundo componente para cationes

Vamos a indicar a continuación la teoría del mecanismo de cambio iónico que emplea ionóforos neutros, pues este tipo es el que se ha usado en esta Memoria de Doctorado. Este tipo de sensores ópticos tiene la característica de responder a la actividad del analito en contraste con otros métodos analíticos en los que se mide concentración total.

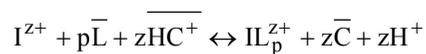
Como caso general, consideraremos que el analito es un ión  $I^{z+}$  que reacciona con un ionóforo neutro L de carácter lipofílico para originar el complejo  $IL_p^{z+}$  que se retendrá en la fase orgánica como par iónico  $IL_pR_z$  con el anión lipofílico  $R^-$ . En la Figura 1.3 se muestra el modelo de tira reactiva basada en el uso conjunto de un ionóforo y un cromoióforo básico en presencia de una sal de anión lipofílico necesaria para que se pueda dar el equilibrio de cambio iónico.

La extracción del analito desde la disolución problema a la tira reactiva se puede describir mediante un esquema de tres etapas: a) difusión del analito a través de la interfase de la muestra; b) transferencia de fase y proceso de complejación/descomplejación; y c) difusión de las especies a través de la membrana<sup>59</sup>.

Al introducir el sensor en una disolución que contiene el analito  $I^{z+}$ , y para mantener la electroneutralidad en la membrana, se produce un intercambio de cationes de forma que por cada carga positiva que entre en forma de analito para complejar con el ionóforo y originar  $IL_p^{z+}$ , debe salir otra carga positiva, y la única disponible es la ligada al cromoióforo. Así como la entrada de analito no es perceptible, la salida de cargas positivas si es susceptible de transducción óptica mediante la variación de la absorbancia del cromoióforo al desprotonarse.

Los diferentes equilibrios involucrados según el modelo antes indicado en la Figura 1.3 se rigen por las siguientes constantes: constantes de distribución entre ambas fases del ligando  $K_{DL}$ , de la sal lipofílica  $K_{DXR}$ , del complejo como par iónico  $K_{DILpRZ}$ , de la forma básica del cromoióforo  $K_{DC}$  y de la forma ácida del cromoióforo como par iónico  $K_{DHCR}$ ; constante global de formación del complejo  $K_{cILpZ^+}$ , constante de disociación de la sal lipofílica  $K_{dXR}$ , constante de asociación del par iónico complejo-anión lipofílico  $K_{AS}$ , constante de acidez del cromoióforo  $K_{aHC^+}$ , y constante de disociación del par iónico forma ácida del cromoióforo-anión lipofílico  $K_{dHCR}$ .

El equilibrio global de cambio iónico que tiene lugar entre la muestra y la tira reactiva será:



En el que no se han introducido los aniones lipofílicos ya que no intervienen en el intercambio de cargas, solo lo permiten. Ese equilibrio viene gobernado por la constante  $K_e^{ILp}$

$$K_e^{ILp} = \frac{a_{H^+}^z [C]^z [IL_p^{z+}]}{a_{I^{z+}} [HC^+] [L]^p} \quad (\text{ec.1.1})$$

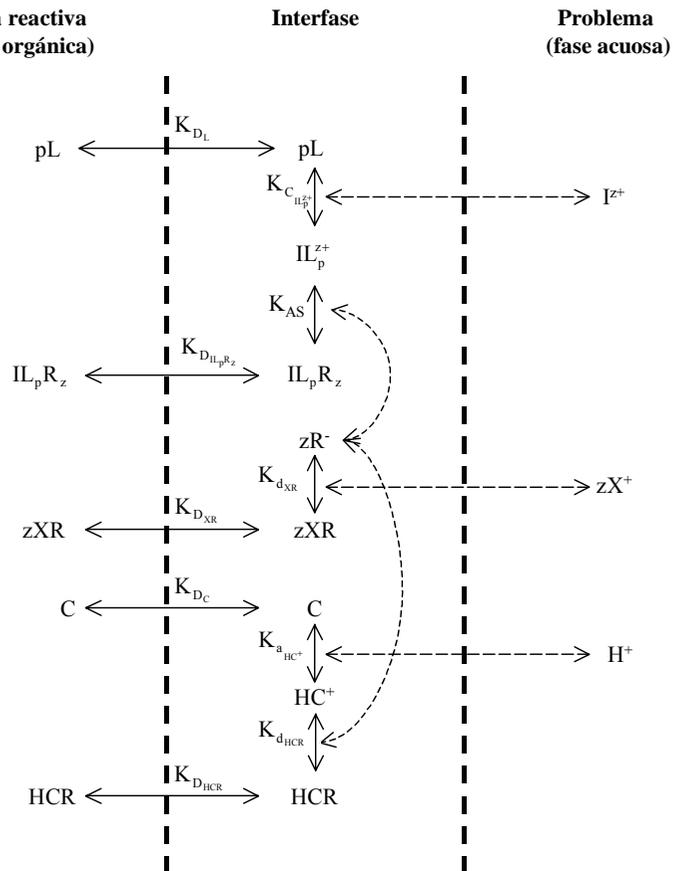
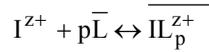


Figura 1.3. Modelo de tira reactiva basada en un ionóforo y un cromoióforo básico.

En ella las concentraciones en fase orgánica vienen dadas en molalidades (moles/kg) y sus coeficientes de actividad se denotan por  $\gamma$ . En fase acuosa las actividades se denotan por  $a$ .

Esta constante  $K_{e_{IL_p}}$  será función de la constante de estabilidad del complejo, de la constante de acidez del cromoióforo y de las lipofilicidades relativas del analito  $K_{I^{z+}}$  y del protón  $K_{H^+}$ .

La constante de complejación se refiere al equilibrio:



Y viene dada por  $\beta_{IL_p^{z+}} = \frac{a_{IL_p^{z+}}}{a_{I^{z+}} a_L^p}$ . Esta constante realmente simplifica el modelo

formal que hemos presentado en la figura 1.3, aunque se relaciona con él de acuerdo con:

$$\beta_{IL_p^{z+}} = \frac{K_{DIL_pR_z} K_{AS} K_C K_{IL_p^{z+}} K_{dXR}^z}{K_{DL}^p K_{DXR}^z} \quad (\text{ec.1.2})$$

La constante de acidez del cromoióforo, por su parte, responde al equilibrio:

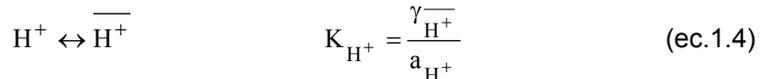


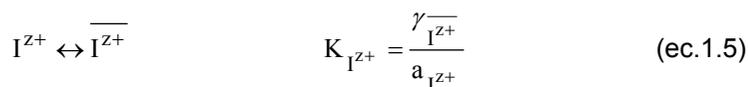
Y viene dada por  $K_a = \frac{a_{H^+} a_C}{a_{HC^+}}$ . Como en el caso anterior también se relaciona con

el modelo según:

$$K_a = \frac{K_{DC} K_{a_{HC^+}} K_{dHCR} K_{DXR}}{K_{dXR}} \quad (\text{ec.1.3})$$

Las lipofilicidades relativas del analito  $K_{I^{z+}}$  y del protón  $K_{H^+}$  se pueden describir mediante a los equilibrios:





Si sustituimos actividades por las correspondientes concentraciones y coeficientes de actividad en las cuatro constantes que acabamos de definir y, a su vez, operamos en la  $K_e^{II_p}$  (ec. 1.1) resulta que la constante de intercambio se relaciona con las constantes de formación del complejo, de acidez del cromoióforo y las lipofilidades de los iones principal y de referencia, así como con los coeficientes de actividad en fase membrana, según:

$$K_e^{II_p} = \frac{K_{I^{z+}} \beta_{II_p^{z+}} K_a^z}{K_{H^+}^z} \left( \frac{\gamma_{HC^+}}{\gamma_C} \right)^z \frac{(\gamma_L)^z}{\gamma_{II_p^{z+}}} \quad (\text{ec.1.6})$$

Como vemos las actividades de todas las especies involucradas controlan el equilibrio, pero solo la concentración del cromoióforo será accesible a través de medidas ópticas. En consecuencia, es esencial que los coeficientes de actividad permanezcan constantes en todo el rango de medida. Para una membrana dada del tipo que estamos considerando, la fuerza iónica dentro de ella se debe mantiene virtualmente constante, pues está definida por la concentración de sal lipofílica, lo que, de acuerdo con la teoría de Debye-Hückel, debe originar un coeficiente de actividad medio constante en fase membrana. En una primera aproximación, los coeficientes de actividad de las especies cargadas serán despreciables y el cambio en los coeficientes de actividad de las especies neutras se supone que será relativamente pequeño dentro del rango de calibración, si su concentración total se mantiene baja. Cuando la cantidad de alguno se incrementa, así de ionóforo por razones de selectividad, se observa un cambio en el coeficiente de actividad y, por tanto, en la constante de equilibrio  $K_e^{II_p}$ . Eso significa que las concentraciones en fase orgánica son proporcionales a las actividades. En resumen, la expresión anterior queda reducida a:

$$K_e^{IL_p} = \frac{K_{I^{z+}} \beta_{IL_p^{z+}} K_a^z}{K_{H^+}^z} \quad (\text{ec1.7})$$

Para expresar la constante de equilibrio  $K_e^{IL_p}$  en función de parámetros experimentales, realizaremos un balance de cargas en la membrana, llamando  $C_R$  a la concentración analítica de anión lipofílico:

$$C_R = [HC^+] + z [IL_p^{z+}] \quad (\text{ec1.8})$$

y los correspondientes balances de masas respecto a ionóforo ( $C_L$  concentración analítica de ionóforo) y cromoionóforo ( $C_C$  concentración analítica de cromoionóforo):

$$C_L = [L] + p [IL_p^{z+}] \quad (\text{ec1.9})$$

$$C_C = [C] + [HC^+] \quad (\text{ec1.10})$$

Así mismo definiremos la fracción de cromoionóforo  $\alpha$  como el cociente de forma no protonada a total:

$$[C] = \alpha C_o \quad (\text{ec.1.11})$$

Luego

$$[HC^+] = (1 - \alpha) C_o \quad (\text{ec.1.12})$$

Como el cromoionóforo es la única especie detectable en la membrana, si medimos a una longitud de onda característica de la especie desprotonada, podemos definir una absorbancia normalizada, que será la misma fracción  $\alpha$  anterior, como parámetro analítico, de manera que si  $\alpha = 1$  no habrá cromoionóforo

protonado y le corresponderá una absorbancia  $A_1$  y si  $\alpha = 0$  todo el cromoióforo estará protonado y su absorbancia correspondiente será  $A_0$ . La forma habitual de establecer  $A_1$  consiste en tratar la membrana con una disolución 0,1 M de NaOH lo que obliga a que todo el cromoióforo esté en forma básica. En el caso de  $A_0$  se trata con HCl 0,1 M con lo que el cromoióforo se encontrará en forma ácida.

Sustituyendo resulta:

$$\alpha = \frac{[C]}{[C_0]} = \frac{A_0 - A}{A_0 - A_1} \quad (\text{ec.1.13})$$

Si combinamos las ecuaciones 1.7, 1.8, 1.9, 1.10 y 1.13 obtendremos la función respuesta de la membrana sensora para el ión  $I^{z+}$ :

$$K_e^{IL_p} = \frac{1}{a_{I^{z+}}} \left( \frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^z \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{z \left( C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^p} \quad (\text{ec.1.14})$$

$$a_{I^{z+}} = \frac{1}{K_e^{IL_p}} \left( \frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^z \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{z \left( C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^p} \quad (\text{ec.1.15})$$

Dado que la membrana sensora está en equilibrio químico con la muestra conteniendo analito, lo que mediremos no serán concentraciones, sino el cociente de actividades entre el ión de referencia y el analito. Si se mantiene constante la actividad del ión de referencia podemos despejar la actividad del analito (ecuación 1.15).

Si tomamos logaritmos en la ecuación anterior y establecemos como variable independiente  $\log a_{I^{z+}}$  y como variable dependiente  $1 - \alpha$  y las

renombramos como X é Y, respectivamente, llegamos a la ecuación 1.16, cuya inversa  $Y=f(X)$  podemos observar en la Figura 1.4.

$$X = \log \left\{ \frac{1}{K_e^{II_p}} \left( \frac{a_{H^+}(1-Y)}{Y} \right)^z \frac{C_R - YC_C}{z \left( C_L - \frac{p}{z} (C_R - YC_C) \right)^p} \right\} \quad (\text{ec.1.16})$$

Si tenemos en cuenta en esta expresión que: 1)  $C_R$ ,  $C_C$  y  $C_L$  son conocidos; 2) que  $z$  y  $p$  toman valores discretos y conocidos en tanto se ha estudiado el sistema y el comportamiento del cromoionóforo y del ionóforo en uso; 3) que  $K_e^{II_p}$  la podemos calcular, bien teóricamente si conocemos las constantes de distribución y formación de las especies implicadas, o bien empíricamente mediante el establecimiento de un modelo sigmoideal, tal como se explicará más tarde; y 4) conociendo la actividad del catión de referencia en la disolución problema, nos queda entonces que  $a_{I^{z+}} = f(1-\alpha) \equiv f(A)$ .

Esto es, resulta una respuesta, y en consecuencia un modelo de tipo sigmoideal, ya que usualmente se suele representar en función de  $\log a_{I^{z+}}$  tal como se muestra en la Figura 1.4, pues como hemos dicho la variación de  $1-\alpha$  con la actividad del analito no ofrece información interesante por el gran número de décadas que implica. Por ello, se usa la representación frente al logaritmo decimal de la actividad. Este modelo no tiene la sencillez de un modelo lineal, pero permite, de una manera fácil, la determinación experimental de la actividad del analito.

De manera similar se han desarrollado expresiones, que resultan ser análogas, para el caso de sensores basados en un segundo componente que utilizan en vez de un cromoionóforo, un fluoroionóforo, esto es un indicador ácido-base fluorescente de tipo lipofílico<sup>60</sup>.

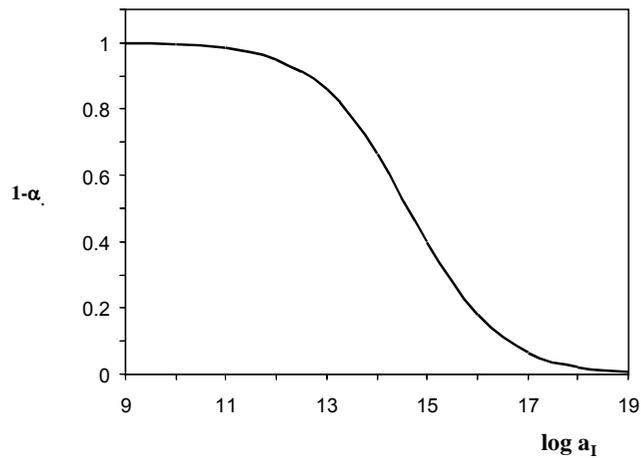


Figura 1.4. Modelo sigmoide de respuesta en sensores basados en un segundo componente.

En algunas ocasiones el cromoióforo presente no se puede protonar de forma completa, lo que se puede deber a diversas causas, así por ejemplo que la concentración de cromoióforo sea mayor que la de sal lipofílica por razones de selectividad o bien a que el pH de trabajo no lo permita. Esto hace que no se pueda determinar  $A_0$  y, por tanto, tampoco  $\alpha$  como indica la ecuación 1.13. Para resolver el problema se utiliza un valor de  $\alpha$  efectivo,  $\alpha_{ef}$ , que señalará el grado de protonación en esas concretas condiciones de concentración de sal lipofílica o de pH<sup>57</sup>. En la presente Memoria de Doctorado se usa de manera habitual  $\alpha_{ef}$  por esta segunda razón, lo que nos permite conocer el grado de protonación con respecto a disoluciones reguladoras dadas:

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_C}{A_{\text{tampón}} - A_C} \quad (\text{ec.1.17})$$

### 3. Determinación de potasio, magnesio y dureza

A continuación indicamos de forma resumida, los sistemas más habitualmente utilizados para la determinación de los analitos que son objeto de estudio en esta Memoria.

La presencia de altas concentraciones de iones de iones alcalinotérreos, especialmente calcio y magnesio, en aguas crea problemas severos tanto en el hogar y en la industria, debido entre otras cosas, a la formación de depósitos de sus carbonatos. Además, desde el punto de vista fisiológico, estos iones junto con los alcalinos, son el factor más importante en enfermedades cardiovasculares y pueden potencialmente afectar a la salud tanto de personas como de animales.

El ión potasio se mide de forma rutinaria mediante electrodos selectivos de iones<sup>61;62</sup> o mediante fotometría de llama. Se han propuesto diversos métodos para determinar potasio basados en sensores ópticos. Así, hay sensores ópticos que miden absorción de radiación, como los basados en hexaester de calixareno-6 como ionóforo y ETH 5294 como cromoióforo<sup>63</sup> o con 2,4,6,2',4',6'-hexanitrodifenilamina covalentemente unida a una lámina transparente de triacetilcelulosa. En este caso, se requiere una etapa de pretratamiento antes de la determinación<sup>64</sup>.

Otros sensores emplean fibra óptica<sup>65-67</sup> con detección fluorescente<sup>68-73</sup> También se han empleado sensores eléctricos, como membranas potenciométricas empleando rinfamicina como ionóforo<sup>74</sup> o delgadas películas electroactivas de hexacianonoferrato de níquel (II).

La forma más habitual de determinar la denominada dureza total, suma de calcio y magnesio, en agua es mediante complexometría empleando el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) como agente valorante. El procedimiento es

barato, aunque requiere alguna destreza, consume tiempo y esta sujeto a errores operacionales.

Para la determinación de estos iones alcalinotérreos, tanto individualmente como combinados en dureza total se han empleado diversas aproximaciones instrumentales como son espectrofotometría UV-Vis<sup>75</sup>, fluorescencia, fotometría de llama, espectrofotometría de absorción atómica o espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente. Especial interés ha suscitado el empleo de electrodos selectivos de iones potenciométricos. Se han publicado diversos artículos relativos al diseño de ionóforos y optimización de la composición de la membrana para diferentes aplicaciones<sup>76-78</sup>.

La determinación individual de magnesio, por otra parte, es más complicada que la de calcio, porque en la mayoría de los casos, hay interferencias de otros iones alcalinotérreos, y especialmente de calcio. Por esta razón, se han desarrollado pocos electrodos selectivos para magnesio. Entre ellos podemos citar el electrodo selectivo basado en dimetil aspartamida (ETH 2220)<sup>79</sup> que presenta una notable interferencia debida a protones. Otro sensor descrito es el electrodo basado en el par iónico tetrafenil borato de Mg-4,7-difenil-1,10-fenantrolina (1:3) en una matriz de PVC y que usa *o*-nitrooctilfeniléter como plastificante. Este electrodo es diez veces más selectivo para magnesio que para calcio. El electrodo selectivo que emplea óxido de bis(ditolil)fosfina como ionóforo<sup>80</sup> presenta un rango de aplicación entre  $6,0 \cdot 10^{-5}$  y  $1,0 \cdot 10^{-1}$  M con buena discriminación para calcio. Se han desarrollado diversos ISES usando ionóforos del tipo octametileno bis y tris (diamidas de ácidos malónicos) en PVC empleando *o*-nitrooctilfeniléter como plastificante<sup>81</sup>. Otros ionóforos usados son: 1,3,5-tris [9-(1-adamantil)-6,8-dioxo-5,9-diazadecil]benceno (ETH 5504), el 1,3,5-tris[10-(1-adamantil)-7,9-dioxo-6,10-diazaundecil]benceno (ETH 5506), 1,3,5-tris(10-metil-7,9-dioxo-6,10-diazoheptadecil)benceno (ETH 3832), N,N'-dimetil-N,N'-diadamantilmalonamida (ETH 2001), N-metil-N,N'-diamantilmalonamida (ETH 2003) o el 4,-13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13-diazaciclooctadecano (K22B5)

<sup>82;83</sup>. De todos estos ionóforos, K22B5, ETH 5506 y ETH 5504 son los que presentan mejor selectividad para magnesio, aunque al tener baja lipofilidad, no son muy útiles para la monitorización continua en muestras de plasma o suero. Por otra parte, los electrodos presentan tiempos de vida cortos. El ETH 5504 ha demostrado ser el más adecuado para la preparación de microelectrodos. El grupo de Suzuki publicó un sensor óptico para Mg basado en un ionóforo más lipofílico el K22B1B5<sup>84</sup> que no ha sido ensayado en electrodos selectivos a iones.

Se han empleado éteres corona como el éter benzo-15-corona 5<sup>85</sup> como ionóforo con un rango de aplicación de  $1,0 \cdot 10^{-5}$  hasta  $1,0 \cdot 10^{-1}$  M de magnesio. Se han preparado membranas para electrodos selectivos utilizando macrociclos del tipo 4,11-dimetil-2,4,9,11-tetraetil-1,5,8,12-tetraaza ciclotetradeca 1,8-dieno y 4, 11-dioxa-2,9-dimetil-1,5,8,12-tetraaza ciclotetradeca-1,8-dieno como material sensor<sup>86</sup>, aunque la mayoría de los electrodos desarrollados presentan rangos de trabajo estrechos, así como severas interferencias debidas a calcio.

Otra alternativa, para monitorizar el analito en tiempo real empleando sensores químicos, es el uso de sensores de tipo fluorescente, los cuales presentan las ventajas de ser muy sensibles, de bajo coste, fácil de preparar y versátiles. Para la medida de calcio se han desarrollado diversos indicadores fluorescentes<sup>87</sup>. Sin embargo, solo se han desarrollado muy pocos para determinar magnesio y estos presentan una pobre selectividad para magnesio frente a calcio, siendo solo útiles cuando las concentraciones de magnesio son mucho más altas que las de calcio. No obstante, hay un sensor que es efectivo para magnesio, basado en el diaza-18-corona-6 con dos grupos 5-cloro-8-hidroxiquinolina-7-il<sup>88</sup> y del que se ha señalado que tiene buenas posibilidades para ser usado en la determinación de magnesio en disoluciones acuosas.

La necesidad de realizar un gran número de determinaciones conjuntas de calcio y magnesio, como dureza total, en aguas, tanto en el ámbito público como privado, así en control de depuradoras municipales o privadas, ha hecho que se

hayán desarrollado diferentes estrategias analíticas para su determinación mediante sistemas automáticos y sistemas rápidos. Así, diversas técnicas se han adaptado a sistemas en flujo continuo, tales como espectrofotometría UV-Vis<sup>89-93</sup> y electrodos selectivos de iones<sup>94</sup>.

Se han propuesto diferentes métodos espectrofotométricos UV/Vis con sistema de flujo que presentan ventajas tales como simplicidad y bajo costo, aunque con el inconveniente de una baja selectividad. En algunos casos, un cambio en las condiciones químicas, por ejemplo pH o uso de agentes enmascarantes<sup>95</sup> hace posible la determinación secuencial de ambos analitos. En otros casos, el tratamiento de los datos obtenidos mediante análisis multivariante permite la determinación simultánea<sup>89-91;93;96;97</sup>.

Para la determinación de calcio y magnesio se ha propuesto un sensor de fibra óptica fluorescente basado en un antibiótico natural, el poliéster carboxílico A23187, que presenta un buen límite de detección y selectividad, pero tiene un tiempo de respuesta largo y un tiempo de vida corto<sup>98</sup>.

La dureza del agua también se puede determinar empleando directamente usando electrodos selectivos de iones divalentes basados en transportadores neutros, cuyas membranas presentan igual selectividad para calcio y magnesio y discriminan al resto de iones alcalinos<sup>94;99</sup>.

También se han empleado diferentes procedimientos de ensayos rápidos para determinar la dureza total, los cuales se pueden llevar a cabo tanto en disolución como en fase sólida. Algunos test han sido comercializados por diversas compañías entre los que se pueden citar Serim<sup>™</sup> Water Hardness Test Strips (Serim Research Co.), EM Quant<sup>®</sup> Total Hardness Test (Merck) o Aquadur<sup>®</sup> Total Hardness (Macherey-Nagel). Todas ellas se basan en una reacción entre un indicador químico depositado en la almohadilla de la tira reactiva y los iones calcio y/o magnesio de una disolución acuosa, que se pone en contacto con ella, dando

como resultado un cambio de color en la almohadilla, que se compara con una escala de color, obteniéndose un resultado semicuantitativo.

Otra variante empleada son los test basados en sistemas multicapa para la determinación de iones alcalinotérreos individuales en fluidos biológicos basados en ionóforos neutros, normalmente coronados, criptandanos o podanos y medidos mediante reflectancia difusa<sup>100</sup>, de los cuales ya hemos hablado páginas atrás.

#### **4. Utilización de escáneres y cámaras para análisis**

Los escáneres de tipo óptico se han utilizado con diferentes propósitos como alternativa a otros tipos de instrumentación más compleja, debido a su fácil uso y a la posibilidad de analizar la imagen capturada para determinar o cuantificar los datos de luminosidad correspondientes al objeto en estudio. Así, han sido utilizados en diferentes campos como mineralogía<sup>101</sup>, ciencias de la tierra<sup>102</sup>, odontología<sup>103</sup>, radiología<sup>104</sup>, procesamiento de comida<sup>105;106</sup>, biología<sup>107</sup>, arqueología<sup>108</sup>, entre otros.

En el campo del análisis químico, los escáneres han sido utilizados de dos formas distintas. La primera pretende conseguir información de procesos de separación bidimensionales, como por ejemplo en cromatografía en capa fina<sup>109</sup> o electroforesis sobre gel de poliacrilamida en inmunología<sup>110;111</sup>.

La segunda forma de uso, persigue obtener información cuantitativa o cualitativa de un análisis llevado a cabo en fase sólida. Uno de los casos más simples es aquel que determina exclusivamente un analito. Este es el caso, por ejemplo, de la determinación de proteínas sobre membrana de nitrocelulosa utilizando ponceau S como colorante y utilizando los valores de intensidad que ofrece la escala de grises de la imagen obtenida utilizando la opción de autoexposición<sup>112</sup>. Un caso similar, es la determinación semicuantitativa de mercurio

en pescado basándose en la recogida de vapores de mercurio sobre papel de carboximetil celulosa recubierto con  $\text{Cu}_2\text{I}_2$ <sup>113</sup>. Se ha determinado Fe(III) basándose en ensayos en membranas con tiocianato<sup>114</sup> o el antiséptico polividona yodada<sup>114</sup>, ambos utilizando un escáner de mano, aunque mejorando la linealización de la respuesta mediante análisis de componentes principales.

Diversos procedimientos de inmunocromatografía han sido evaluados cuantitativamente usando escáneres convencionales de sobremesa, así, el análisis de inmunoglobulina E, en el rango de los atomoles, se ha descrito utilizando partículas de carbono como marcador de los anticuerpos<sup>115</sup> o similarmente para análisis de gonadotropina corionica humana HGC en ensayos de embarazo<sup>116</sup>. Otros tipos de marcadores, como lo son las partículas de oro, han sido usadas para la determinación de HGC en inmunoensayos tipo sándwich<sup>117</sup> o de sulforadamina B marcada con biotina encapsulada en liposomas usada en inmunoensayos rápidos de una sola etapa para biotina<sup>118</sup>. La combinación de redes neuronales con sistemas de análisis de imagen han sido empleadas para cuantificar  $\alpha$ -fetoproteína en suero humano haciendo uso de tiras inmunocromatográficas<sup>119</sup>. Igualmente, la combinación de tubos detectores de gases con escáneres ópticos ha sido descrito para monitorizar malos olores en ambientes habitados<sup>120</sup>.

Otros usos se basan en tecnología de microarrays empleada en análisis de genes de alto rendimiento (*high-throughput gene analysis*) con aplicaciones en análisis cuantitativos de expresión génica, secuenciación de ADN o diagnóstico de enfermedades y que utilizan diferentes tipos de sistemas de detección incluyendo el uso de escáneres. Este es el caso de un esquema de detección basado en nanopartículas, que utiliza como sonda nanopartículas de oro unidas covalentemente a oligonucleótidos que son complementarios al objetivo de interés<sup>121</sup>. Otro caso, usa moléculas objetivo no etiquetadas y esta basado en una interacción electrostática entre nanopartículas de oro y moléculas objetivo hibridadas<sup>122</sup> o la detección colorimétrica que utiliza un etiquetado enzimático a través de la química de la biotina<sup>123</sup>. También se han utilizado microarrays de

proteínas para parametrización proteómica basadas igualmente en medidas con un escáner<sup>124</sup>. Otro tipo de arrays, macroarrays en este caso, se han propuesto para diversas finalidades; este es el caso de un array colorimétrico para determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOC) capaces de determinar unos 100 VOC mediante diferentes técnicas multicomponentes<sup>125-127</sup>.

Diferentes tipos de procedimientos analíticos en disolución se ha desarrollado en placas micropocillo siendo medidas con escáneres, así proteínas<sup>128</sup> o test de toxicidad basados en microorganismos<sup>129</sup>.

Como es obvio, los diferentes procedimientos que hacen uso de la adquisición de la imagen, presentan unas características muy diferenciadas. Algunas de ellas sólo ofrecen unas características semicuantitativas de baja calidad, otras aplicaciones, por el contrario, necesitan un tratamiento matemático muy complicado para extraer la información analítica. En esta Memoria de Doctorado estudiamos la posibilidad de emplear un escáner para determinar analitos en disolución, como por ejemplo el potasio, haciendo uso de membranas desechables. El objetivo es demostrar que el posible uso de dispositivos baratos que están al alcance de cualquiera, se pueden usar como instrumentos analíticos.

Enfocamos nuestra atención en sistemas de análisis de imagen, gestión del color y en la adquisición de la imagen, obteniendo con un escáner de sobremesa, tanto en modo reflexión como transmisión, resultados analíticos de calidad comparable con los tradicionales equipos de sobremesa.

El uso de cámaras CCD como sistemas detectores ha aumentado notablemente en los últimos tiempos, siendo las imágenes obtenidas utilizadas para diferentes propósitos. Así, se han usado las CCD para técnicas de screening<sup>130-132</sup>, en el campo de la proteómica<sup>133;134</sup>, en el diagnóstico de enfermedades<sup>135</sup> o la detección simultánea de antibióticos en leche<sup>136</sup>. De forma general, la determinación simultánea se realiza situando las zonas de reconocimiento en distintas posiciones

dentro del array<sup>137</sup>, o utilizando la tecnología de los microchips<sup>138</sup>, todo ello en conjunción con dispositivos de alto rendimiento. Se han empleado también en detección de proteínas sobre geles empleando técnicas no radiativas<sup>139</sup> y usando polímeros impresos (MIP) en técnicas enzimáticas ELISA, en lugar de anticuerpos<sup>140-142</sup>.

La adquisición de imagen juega un importante papel en el campo de la alimentación<sup>106;143</sup>, habiendo sido usada determinar de bacterias en cerveza<sup>144</sup>. Otras aplicaciones de las cámaras CCD se encuentra en la detección de niveles bajos de explosivos y explosivos gaseosos<sup>145</sup>, discriminación entre diferentes fragancias<sup>146</sup> o para la fabricación de sensores ópticos de alta densidad<sup>147;148</sup>.

Las cámaras CCD se han empleado para la detección simultánea de analitos en métodos separativos como electroforesis<sup>149-152</sup> o cromatografía<sup>153</sup>. Haciendo uso de una cámara CCD, es posible determinar Al(II) y Fe(II)<sup>154</sup> en aleaciones, aplicando redes neuronales (ANN) o incluso especiar Fe(II) y Fe(III) inmovilizando un ionóforo sobre distintos soportes como puede ser una lámina de papel o una lámina de cromatografía en capa<sup>155</sup>. En una reciente publicación se ha propuesto la determinación de la alcalinidad total del agua utilizando una cámara CCD como instrumento de medida<sup>156</sup> o el uso de sensores de afinidad paralela (PASA, *parallel affinity sensor array*) en el campo medioambiental para la detección de contaminantes en el agua<sup>157</sup>.

También se ha empleado una cámara CCD para determinar  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}_2$  y  $\text{Hg}^{2+}$  en agua mediante medidas de fluorescencia sobre microplacas<sup>158</sup>.

Las continuas mejoras en cámaras digitales de fotografía ha hecho posible el desarrollo de instrumentos potentes que pueden ser utilizados para diversas aplicaciones, además de la propia fotografía, en aplicaciones científicas y de ingeniería. Así se ha utilizado la cámara de fotografía digital KODAC DCS640c en sistemas fotográficos aéreos para la medida de vegetación. También, debido a la manejabilidad que ofrecen las cámaras digitales se han utilizado en cirugía, como por ejemplo la cámara digital Nikon Coopix 995<sup>159</sup>. Otras aplicaciones de las

cámaras de fotografía digitales se han realizado en el campo de la tecnología alimentaria<sup>106;143</sup>. En el campo de la Química Analítica se ha descrito la determinación de Al(II) y Fe(II) utilizando una cámara de fotografía digital Canon EOS-d30<sup>154</sup>. Por último cabe citar a Filippini y colaboradores, quienes han realizado propuestas interesantes de análisis usando cámaras web para medidas en el rango visible<sup>160-162</sup> e incluso medidas de fluorescencia<sup>163</sup>.

## 5. Bibliografía

1. Capitán-Vallvey, L. F. *Encyclopedia of Sensors*, Grimes, C. A.; Dickey, E. C. Pishko, M. V., Eds.; 1 ed.; The Pennsylvania State University: 2005.
2. Zolotov, Yu. *Ann.Chim.* **1997**, *87*, 285-95.
3. Lange, H., Rittersdorf, W., and Rey, H. G. Diagnostic device. [US 3,897,214]. 2001.
4. Shi, G.-Q.; Jiang, G. *Anal.Sci.* **2002**, *18*, 1215-19.
5. Niedbala, R. S.; Feindt, H.; Kardos, K.; Vail, T.; Burton, J.; Bielska, B.; Li, S.; Milunic, D.; Bourdelle, P.; Vallejo, R. *Anal.Biochem.* **2001**, *293*, 22-30.
6. Ho, J. A. A.; Wauchope, R. D. *Anal.Chem.* **2002**, *74*, 1493-96.
7. Anand, K. and Koon-Wah, L. Reflective particle-containing analysis composition and device. [EP 0141647]. 1985.
8. Charlton, S. C., Hemmes, P., and Lau, A. L. Y. Ion test means having a hydrophilic carrier matrix. [US 4,649,123]. 1987.
9. Mehta, D. V. Detecteur a reactif, son procede de preparation et son application a l'analyse chimique et biochimique. [FR 2,303,290]. 1976.
10. Curme, H. G.; Columbus, R. L.; Dappen, G. M.; Eder, T. W.; Fellows, W. D.; Figueras, J.; Glover, C. P.; Goffe, C. A.; Hill, D. E.; Lawton, W. H.; Muka, E. J.; Pinney, J. E.; Rand, R. N.; Sanford, K. J.; Wu, T. W. *Clin.Chem.* **1978**, *24*, 1335-42.

11. Clement, P. L. Integral element for analysis of liquids. [US 4,042,335]. 1977.
12. Przybylowicz, E. P. and Millikan, A. G. Integral analytical element. [US 3,992,158]. 1976.
13. Kitajima, M., Arai, F., and Kondo, A. Multi-layer chemical analytical materials. [US 4,356,149]. 1982.
14. Arena, M. P.; Porter, M. D.; Fritz, J. S. *Anal.Chem.* **2002**, *74*, 185-90.
15. Amelin, V. G.; Kolodkin, I. S. *J.Anal.Chem.* **2001**, *56*, 182-87.
16. Guardiola Vicente, J. M. *La orina y su analisis*, Quimica Farmaceutica Bayer, Ed.; Madrid, 1995.
17. Kaminagayoshi, S. Test piece for detecting nitrite. Terumo Kabushiki Kaisha. [EP 0160240]. 1985.
18. Small, P. A. and Huang, S. H. Rapid diagnostic method for distinguishing allergies and infections. [US 5,910,421]. 8-6-1999.
19. Boehringer Mannheim GmbH. Test Strips. Boehringer Mannheim GmbH. [GB1463434]. 1977.
20. Guonan, Chen, Haixia, Lu, and Zenghong, Xie. Test paper for fast testing nitrite, azotate in vegetables and its testing method. UNIV FUZHOU. [CN 1445531]. 2003. China.
21. Carhart, Homer W. Detector of hydrogen cyanide in air. [US 2534229], - 19501219. 1950. US.
22. Tobarí, Shizen and Nakano, Mariko. Test composition, method and a test stick for detection of chloride ion in cow's milk. [US 4,211,532]. 1980. US.
23. Ogita, Zen-ichi. Test paper for determining the concentration of halogen ions by filter paper chromatography, and manufacturing process for and use of the same. [US 4,744,952 ]. 1988.
24. Ruperari Lakshman, L. S. and Liese, K. Bandelette et methode d'analyse pour la detection de taux eleves de chlorures pour des piscines et stations thermales. [FR 2800166]. 2000.
25. Ostrovskaya, V. M.; Zolotov, Yu.; Shpigun, L. K; Kamilova, P. M.; Shishkin, Yu. L. *Field Anal.Chem.Tech.* **2000**, *4*, 147-53.
26. Starp, H.; Buschmann, N.; Cammann, K. *Fresenius J.Anal.Chem.* **2000**, *368*, 203-07.

27. Tess, M. E.; Cox, J. A. *J.Pharm.Biomed.Anal.* **1999**, *19*, 55-68.
28. Berry, M. N., Town, M.-H., Kresse, G.-B., and Herrmann, U. Determination of ions in fluids. [US 5,409,814]. 1995.
29. Jaunakais, I. and Jaunakais, J. K. Test device for detection of molybdate, vanadate and ferric ions. [US 5,106,581]. 1992.
30. Macherey-Nagel. Catalog Test Papers. 2004.
31. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.
32. Painter, G. R.; Pressman, B. C. *Host Guest Complex Chemistry II*, Vogel, F., Ed.; Springer: New York, 1982.
33. Moore, C.; Pressman, B. C. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **1964**, *15*, 562.
34. Mueller, P.; Rudin, D. O. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **1967**, *26*, 398.
35. Stefanac, Z.; Simon, W. *Chimia* **1966**, *20*, 436.
36. Oehme, I.; Wolfbeis, O. S. *Mikrochim.Acta* **1997**, *126*, 177-92.
37. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
38. Schmidtchen, Franz P. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 1-29.
39. Graf, E.; Lehn, J. M. *J.Am.Chem.Soc.* **1976**, *98*, 6403.
40. Beer, Paul D.; Gale, P. A. *Angew.Chem.Int.Ed.* **2001**, *40*, 486-516.
41. Best, Michael D.; Tobey, Suzanne L.; Anslyn, Eric V. *Coord.Chem.Rev.* **2003**, *240*, 3-15.
42. Houk, Ronald J. T.; Tobey, Suzanne L.; Anslyn, Eric V. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 199-229.
43. Antonisse, Martijn M. G.; Reinhoudt, David N. *Chem.Comm.* **1998**, 443-48.
44. Bisson, Adrian P.; Lynch, Vincent M.; Monahan, Mary Katherine; Anslyn, Eric V. *Angew.Chem.Int.Ed.* **1997**, *36*, 2340-42.
45. Bondy, Chantelle R.; Loeb, Stephen J. *Coord.Chem.Rev.* **2003**, *240*, 77-99.

46. Scheerder, J.; Engbersen, J. F. J.; Casnati, R. U.; Reinhoudt, D. N. *J.Org.Chem* **1995**, *60*, 6448-54.
47. Nishizawa, S.; Teramae, N. *Anal.Sci.* **1997**, *13*, 485-88.
48. Beer, P. D.; Bayly, S. R. *Topics in Current Chemistry* **2005**, *255*, 125-62.
49. Dickins, R. S.; Gunnlaugsson, D. P.; Parker, D.; Peacock, R. D. *Chem.Commun.* **1998**, 1643-44.
50. Badr, I. H. A.; Jhonson, R. D.; Díaz, M; Hawthorne, M. F.; Bachas, L. G. *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 4249-54.
51. Inoue, Yoshihisa; Hakushi, Tadao; Liu, Yu; Tong, Linhui; Shen, Baojian; Jin, Daosen *J.Am.Chem.Soc.* **1993**, *115*, 475-81.
52. Charlton, S. C.; Fleming, R. L.; Zipp, A. *Clin.Chem.* **1982**, *28*, 1857-61.
53. Rittersdorf, W., Guethlein, W., Thym, D., and Vogel, P. Method for the determination of an ion with increased sensitivity, use of substances which are suitable for this and a corresponding agent. [US 5,215,924]. 1-6-1993.
54. Gantzer, M. L., Hemmes, P., and Wong, D. Miles Laboratories Inc. US Appl. 583,127. 24-2-1984.
55. Gantzer, M. L., Hemmes, P., and Wong, D. Miles Laboratories Inc. Eur. Pat. Appl. EP 153,641. 4-9-1985.
56. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998; Chapter 6.
57. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
58. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1953-687.
59. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
60. Shortreed, M. R.; Bakker, E.; Kopelman, R. *Anal.Chem.* **1996**, *68*, 2656-62.
61. Lee, D.; Thomas, J. D. R *Talanta* **1994**, *41*, 901-07.
62. Bobacka, J.; Ivaska, A.; Lewenstam, A. *Anal.Chim.Acta* **1999**, *385*, 195-202.
63. Chan, W. H.; Lee, A. W. M.; Kwong, D. W. J.; Tam, W. L.; Wang, K. M. *Analyst* **1996**, *121*, 531-34.
64. Safavi, A.; Pakniat, M. *Anal.Chim.Acta* **1996**, *335*, 227-33.

65. Alder, J. F.; Ashworth, D. C.; Narayanaswamy, R.; Moss, R. E.; Sutherland, I. O. *Analyst* **1987**, *112*, 1191.
66. Suzuki, K.; Ohzora, H.; Tohda, K.; Miyazaki, K.; Watanabe, K.; Inoue, H.; Shirai, T. *Anal.Chim.Acta* **1990**, *237*, 155-64.
67. Roe, J. N.; Szoka, F. C.; Verkman, A. S. *Analyst* **1990**, *115*, 353-58.
68. Koronczi, I.; Reichert, J.; Heinzmann, G.; Ache, H. J. *Sens.Actuators B* **1998**, *51*, 188-95.
69. He, H.; Li, H.; Mohr, G. J.; Kovacs, B.; Werner, T.; Wolfbeis, O. S. *Anal.Chem.* **1993**, *65*, 123-27.
70. Shortreed, M. R.; Dourado, S.; Kopelman, R. *Sens.Actuators B* **1997**, *38*, 8-12.
71. Wolfbeis, O. S.; Schaffar, P. H. *Anal.Chim.Acta* **1987**, *198*, 1-12.
72. Murkovic, I.; Lobnik, A.; Mohr, G. J.; Wolfbeis, O. S. *Anal.Chim.Acta* **1996**, *334*, 125-32.
73. Krause, Christian; Werner, Tobias; Huber, Christian; Klimant, Ingo; Wolfbeis, Otto S. *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 3983-85.
74. Saad, H.; Wagiha, M.; Abdel Hameed, O. *Talanta* **1997**, *44*, 1087-94.
75. Ma, H. M. *Anal.Lett.* **1999**, *32*, 799-809.
76. Anker, P.; Wieland, E.; Ammann, D.; Dohner, R. E; Asper, R.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1981**, *53*, 1970-74.
77. Oesch, U.; Brzozka, Z.; Xu, A.; Rusterholz, B.; Suter, G.; Pham, H. V.; Welti, D.; Ammann, D.; Pretsch, E.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1986**, *58*, 2282-85.
78. Suzuki, K.; Watanabe, K.; Matsumoto, Y.; Kobayashi, M.; Sato, S.; Siswanta, D.; Hisamoto, H. *Anal.Chem.* **1995**, *67*, 324-34.
79. Rouilly, M.; Badertscher, M.; Pretsch, E.; Suter, G.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1988**, *60*, 2013-16.
80. Saad, B.; Tahir, M; Ahmad, M. N; Saleh, M. I.; Jab, S. *Anal.Chim.Acta* **1994**, *285*, 271-76.
81. Eugster, R.; Rosatzin, T.; Rusterholz, B.; Aebersold, B.; Pedrazza, U.; Rüegg, D.; Schmid, A.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1994**, *289*, 1-13.

82. Spichiger-Keller, U. E.; Fakler, A. *Electrochim.Acta* **1997**, *42*, 3137-45.
83. Zhang, W.; Jenny, L.; Spichiger-Keller, U. E. *Anal.Sci.* **2000**, *16*, 11-18.
84. Siswanta, D.; Hisamoto, H.; Sato, S.; Matsumoto, Y.; Koike, Y.; Yamamori, S.; Suzuki, K. *Anal.Sci.* **1997**, *13*, 429-35.
85. Gupta, V. K.; Chandra, S.; Mangla, R. *Sens.Actuators B* **2002**, *86*, 235-41.
86. Baniwal, S.; Chandra, S.; Panwar, A.; Singh, A. K. *Talanta* **1999**, *50*, 499-508.
87. De Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 1515-66.
88. Prodi, L.; Bolletta, F.; Montalti, M.; Zaccheroni, N. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 5451-54.
89. Gómez, E.; Tomas, C.; Cladera, A; Estela, J. M.; Cerdá, V. *Analyst* **1995**, *120*, 1181-84.
90. Gómez, E.; Estela, J. M.; Cerdá, V. *Anal.Chim.Acta* **1991**, *249*, 513-18.
91. Blanco, M.; Coello, J.; Gené, J; Iturriaga, H.; Maspoch, S. *Anal.Chim.Acta* **1989**, *224*, 23-30.
92. Hernández, O.; Jiménez, F.; Jiménez, A. I.; Arias, J. J.; Havel, J. *Anal.Chim.Acta* **1996**, *320*, 177-83.
93. Blasco, F.; Medina-Hernandez, M. J.; Sagrado, S.; Fernández, F. M. *Analyst* **1997**, *122*, 639-43.
94. Maj-Zurawska, M.; Rouilly, M.; Morf, W. E.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1989**, *218*, 47-59.
95. Horie, M.; Saito, K.; Hoshino, Y.; Nose, N.; Nakazawa, H.; Yamane, Y. *J.Chromatogr.* **1991**, *538*, 484-91.
96. Ruisanchez, I.; Rius, A.; Larrechi, M. S.; Callao, M. P.; Rius, F. X. *Chemometric and Intelligent Laboratory System* **1994**, *24*, 55-63.
97. Saurina, J.; López-Aviles, Ester; Le Moal, A.; Hernandez-Cassou, S. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *464*, 89-98.
98. Suzuki, K.; Tohda, K.; Tanda, Y.; Ohzora, H.; Nishihama, S.; Inoue, H.; Shirai, T. *Anal.Chem.* **1989**, *61*, 382-84.

99. Tóth, K.; Lindner, E.; Horváth, M.; Jeney, J.; Pungor, E.; Bitter, I.; Ágai, B.; Töke, L. *Electroanal.* **1993**, *5*, 781-90.
100. Gantzer, M. L., Hemmes, P. R., and Wong, D. Ion test having a porous carrier matrix. [US 4,670,218]. 1987.
101. Armienti, P.; Tarquini, S. *Lithos* **2002**, *65*, 273-85.
102. Aydemir, S.; Keskin, S.; Drees, L. R. *Geoderma* **2004**, *119*, 1-8.
103. Attaelmanan, A. G.; Borg, E.; Grondahl, H. G. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2001**, *91*, 611-15.
104. Schulze Ralf, Kurt Willy; Rosing Stephan, Tobias Roman; D'Hoedt, Bernd *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **2002**, *94*, 388-94.
105. Hatcher, D. W.; Symons, S. J.; Manivannan, U. *J.Food Eng.* **2004**, *61*, 109-17.
106. Yam, Kit L.; Papadakis, Spyridon E. *J.Food Eng.* **2004**, *61*, 137-42.
107. Davis, Andrew K.; Farrey, Bethany D.; Altizer, Sonia *J.Therm.Biol.* **2005**, *30*, 410-21.
108. Miriello, D.; Crisci, G. M. *J.Cult.Her.* **2006**, *7*, 186-92.
109. Blazsek, M.; Istvanfy, O.; Roman, S. *Chemicke Listy* **2004**, *98*, 989-92.
110. Velleman, Sandra G. *BioTechniques* **1995**, *18*, 1056-58.
111. Lewis, Brandon; Rathman, Sara; McMahon, Robert J. *J.Nut.Biochem.* **2003**, *14*, 196-202.
112. Bannur, Sanjay V.; Kulgod, Sunil V.; Metkar, Shalaka S.; Mahajan, Suresh K.; Sainis, Jayashree K. *Anal.Biochem.* **1999**, *267*, 382-89.
113. Yallouz, A. V. *Fresenius J.Anal.Chem.* **2000**, *366*, 461-65.
114. Kompany-Zareh, Mohsen; Mirzaei, Siavash *Anal.Chim.Acta* **2004**, *521*, 231-36.
115. Lonnerberg, Maria; Carlsson, Jan *Anal.Biochem.* **2001**, *293*, 224-31.
116. van Amerongen, Aart; van Loon, Douwe; Berendsen, Lucieenne B. J. M.; Wichers, Jan H. *Clin.Chim.Acta* **1994**, *229*, 67-75.

117. Yuhi, Teruko; Nagatani, Naoki; Endo, Tatsuro; Kerman, Kagan; Takata, Masayuki; Konaka, Hiroyuki; Namiki, Mikio; Takamura, Yuzuru; Tamiya, Eiichi *J.Immunol.Methods* **2006**, 312, 54-60.
118. Martorell, Daniel; Siebert, Sui Ti; Durst, Richard A. *Anal.Biochem.* **1999**, 271, 177-85.
119. Chuang, Louise; Hwang, Jeng Yang; Chang, Hen Chang; Chang, Fong Ming; Jong, Shiang Bin *Clin.Chim.Acta* **2004**, 348, 87-93.
120. Tanaka, Y.; Nakamoto, T.; Moriizumi, T. *Sens.Actuators B* **2006**, B119, 84-88.
121. Taton, T. Andrew; Mirkin, Chad A.; Letsinger, Robert L. *Science* **2000**, 289, 1757-60.
122. Sun, Ye; Fan, Wen Hua; McCann, Michael P.; Golovlev, Val *Anal.Biochem.* **2005**, 345, 312-19.
123. Petersen, Jesper; Stangegaard, Michael; Birgens, Henrik; Dufva, Martin *Anal.Biochem.* **2007**, 360, 169-71.
124. Nishizuka, Satoshi; Washburn, Newell R.; Munson, Peter J. *BioTechniques* **2006**, 40, 442,444,446,448.
125. Janzen, Michael C.; Ponder, Jennifer B.; Bailey, Daniel P.; Ingison, Crystal K.; Suslick, Kenneth S. *Anal.Chem.* **2006**, 78, 3591-600.
126. Zhang, Chen; Suslick, Kenneth S. *J.Am.Chem.Soc.* **2005**, 127, 11548-49.
127. Suslick, Kenneth S.; Rakow, Neal A.; Sen, Avijit *Tetrahedron* **2004**, 60, 11133-38.
128. Birch, Nathan C.; Stickle, Douglas F. *Clin.Chim.Acta* **2003**, 333, 95-96.
129. Gabrielson, Jenny; Kuhn, Inger; Colque-Navarro, Patricia; Hart, Mark; Iversen, Aina; McKenzie, Douglas; Mollby, Roland *Anal.Chim.Acta* **2003**, 485, 121-30.
130. Potyrailo, R. A.; Conrad, R. C.; Ellington, A. D.; Hieftje, G. M. *Anal.Chem.* **1998**, 70, 3419-25.
131. Boecker, Daniel; Zybin, Alexander; Horvatic, Vlasta; Grunwald, Christian; Niemax, Kay *Anal.Chem.* **2007**, 79, 702-09.
132. Matsubara, Yasutaka; Kerman, Kagan; Kobayashi, Masaaki; Yamamura, Shouhei; Morita, Yasutaka; Tamiya, Eiichi *Biosensors & Bioelectronics* **2005**, 20, 1482-90.

133. Liang, Ru Qiang; Tan, Cui Yan; Ruan, Kang Cheng *J.Immunol.Methods* **2004**, 285, 157-63.
134. Budach, Wolfgang; Neuschaefer, Dieter; Wanke, Christoph; Chibout, Salah Dine *Anal.Chem.* **2003**, 75, 2571-77.
135. Schuettpelz, Mark; Mueller, Christian; Neuweiler, Hannes; Sauer, Markus *Anal.Chem.* **2006**, 78, 663-69.
136. Knecht, Bertram G.; Strasser, Angelika; Dietrich, Richard; Maertlbauer, Erwin; Niessner, Reinhard; Weller, Michael G. *Anal.Chem.* **2004**, 76, 646-54.
137. Rowe, Chris A.; Tender, Leonard M.; Feldstein, Mark J.; Golden, Joel P.; Scruggs, Stephanie B.; MacCraith, Brian D.; Cras, John J.; Ligler, Frances S. *Anal.Chem.* **1999**, 71, 3846-52.
138. Angenendt, Philipp; Gloekler, Joern; Konthur, Zoltan; Lehrach, Hans; Cahill, Dolores J. *Anal.Chem.* **2003**, 75, 4368-72.
139. Scrivener, Elaine; Boghigian, Brett A.; Golenko, Eva; Bogdanova, Alla; Jackson, Peter; Mikulskis, Alvydas; Denoyer, Eric; Courtney, Patrick; Lopez, Mary F.; Patton, Wayne F. *Proteomics* **2005**, 5, 4354-66.
140. Surugiu, Ioana; Danielsson, Bengt; Ye, Lei; Mosbach, Klaus; Haupt, Karsten *Anal.Chem.* **2001**, 73, 487-91.
141. Surugiu, Ioana; Svitel, Juraj; Ye, Lei; Haupt, Karsten; Danielsson, Bengt *Anal.Chem.* **2001**, 73, 4388-92.
142. Alexandre, I.; Hamels, S.; Dufour, S.; Collet, J.; Zammattéo, N.; De Longueville, F.; Gala, J. L.; Remacle, J. *Anal.Biochem.* **2001**, 295, 1-8.
143. Antonelli, Andrea; Cocchi, Marina; Fava, Patrizia; Foca, Giorgia; Franchini, Gian Carlo; Manzini, Daniela; Ulrici, Alessandro *Anal.Chim.Acta* **2004**, 515, 3-13.
144. March, Carmen; Manclus, Juan J.; Abad, Antonio; Navarro, Alfonso; Montoya, Angel *J.Immunol.Methods* **2005**, 303, 92-104.
145. Albert, Keith J.; Walt, David R. *Anal.Chem.* **2000**, 72, 1947-55.
146. Albert, Keith J., Walt, David R., Gill, Daljeet S., Pearce, Tim C. *Anal. Chem.* 2001, 1 508.
147. Michael, Karri L.; Taylor, Laura C.; Schultz, Sandra L.; Walt, David R. *Anal.Chem.* **1998**, 70, 1242-48.

148. Taylor, Laura C.; Walt, David R. *Anal.Biochem.* **2000**, *278*, 132-42.
149. Sweedler, J. V.; Shear, J. B.; Fishman, H. A.; Zare, Richard N.; Scheller, R. H. *Anal.Chem.* **1991**, *63*, 496-502.
150. Timperman, Aaron T.; Oldenburg, Kurt E.; Sweedler, Jonathan V. *Anal.Chem.* **1995**, *67*, 3421-26.
151. Bergstroem, Edmund T.; Goodall, David M.; Pokric, Boris; Allinson, Nigel M. *Anal.Chem.* **1999**, *71*, 4376-84.
152. Gao, Qiufeng; Yeung, Edward S. *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 2499-506.
153. Lancaster, Michael; Goodall, David M.; Bergstroem, Edmund T.; McCrossen, Sean; Myers, Peter *Anal.Chem.* **2006**, *78*, 905-11.
154. Maleki, N.; Safavi, A.; Sedaghatpour, F. *Talanta* **2004**, *64*, 830-35.
155. Abbaspour, Abdolkarim; Mehrgardi, Masoud A.; Noori, Abolhasan; Kamyabi, Mohammad Ali; Khalafi-Nezhad, Ali; Soltani Rad, Mohammad Navid *Sens.Actuators B* **2006**, *B113*, 857-65.
156. Gaiao, Edvaldo da Nobrega, Martins, Valdomiro Lacerda, Lyra, Wellington da Silva, Farias de Almeida, Luciano, Cirino da Silva, Edvan, and Araujo, Mario Cesar Ugulino. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *570*, 283-290.
157. Weller, Michael G.; Schuetz, Andreas J.; Winklmaier, Michael; Niessner, Reinhard *Anal.Chim.Acta* **1999**, *393*, 29-41.
158. Mayr, Torsten; Liebsch, Gregor; Klimant, Ingo; Wolfbeis, Otto S. *Analyst* **2002**, *127*, 201-03.
159. Schroder, William B. *Curr Surg* **2002**, *59*, 581-87.
160. Filippini, D.; Comina, G.; Lundstrom, I. *Sens.Actuators B* **2005**, *107*, 2, 580-586
161. Filippini, D.; Tejle, K.; Lundstrom, I. *Biosensors Bioelectron.* **2005**, *21*, 2, 266-272.
162. Filippini, D.; Asberg, P.; Nilsson, P.; Inganas, O.; Lundstrom, I. *Sens.Actuators B* **2006**, *113*, 1, 410-418.,
163. Bakker, J. W. P.; Filippini, D.; Lundstrom, I. *Sens.Actuators B* **2005**, *110*,2, 190-194.



## **CAPÍTULO 2**

### **METODOLOGÍA**



# METODOLOGÍA

Se expone a continuación la metodología de trabajo que se ha empleado durante el desarrollo de esta Memoria de Doctorado, describiéndose como se preparan los sensores de un solo uso, como se utilizan y realizan las medidas y se tratan los datos generados.

## **1. Características**

Las características de los sensores de un solo uso desarrollados en esta Memoria de Doctorado son comunes para los distintos modelos propuestos, por ello en este apartado se van describir los sensores así como la metodología utilizada para el desarrollo de los mismos y su posterior uso.

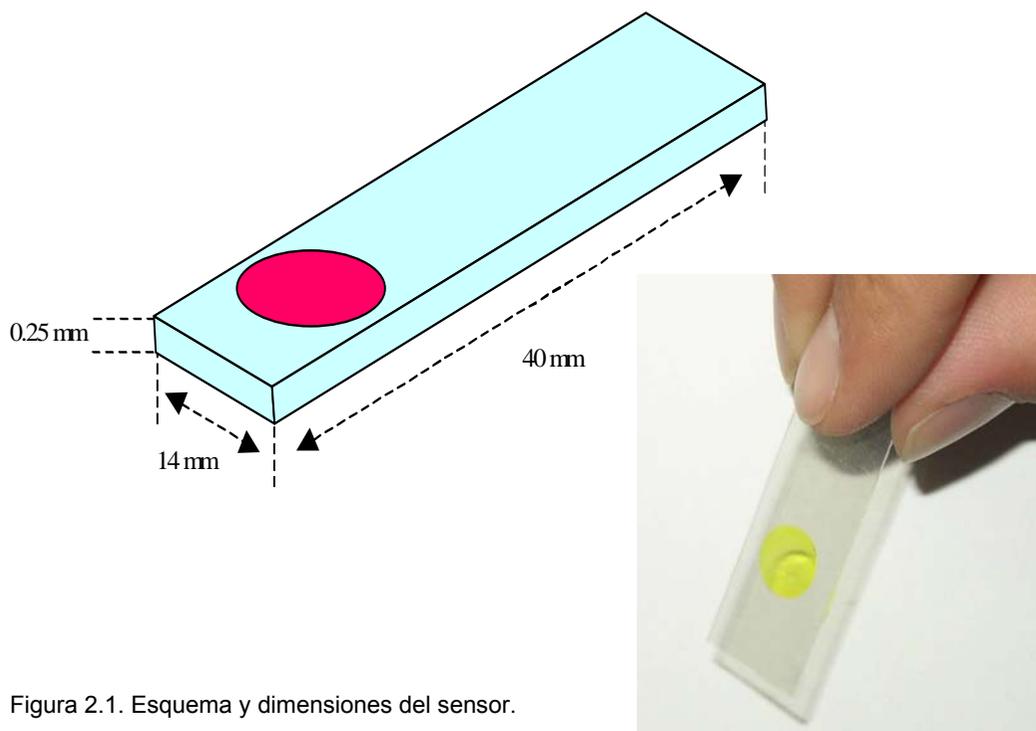


Figura 2.1. Esquema y dimensiones del sensor.

Los sensores de un solo uso propuestos, están constituidos por una lámina transparente de poliéster cuyas dimensiones son 40 mm de largo por 14 mm de ancho y 0,25 mm de espesor.

En una de las caras de la lámina (véase la Figura 2.1) se encuentra la zona activa del sensor de 12 mm de diámetro, que es la encargada de reconocer al analito y originar una respuesta analítica reproducible susceptible de ser medida y contiene todos los reactivos necesarios para la formación y fijación de la especie coloreada y permite una respuesta rápida y selectiva. De tal manera se pueden depositar más de una zona sensora sobre el soporte de mylar con el objeto de aumentar o el número de réplicas o el número de analitos a determinar simultáneamente haciendo uso de la instrumentación adecuada como escáneres o cámaras.

### 1.1. Preparación de los sensores

De las diversas metodologías descritas para la preparación de sensores en general y de tiras reactivas en particular, se ha elegido por la sencillez de preparación y los buenos resultados que proporciona, la de disolución de los componentes reactivos junto con los que originan membrana, en un disolvente que por evaporación controlada, origina una membrana con las características deseadas. Para la preparación de los sensores hay que distinguir dos etapas, como son la preparación y optimización de la disolución que contiene lo reactivos, a la habitualmente llamaremos cóctel, y la posterior preparación del sensor propiamente dicha, utilizando el cóctel anterior.

La primera de las etapas será abordada específicamente en los capítulos próximos para cada uno de los sensores desarrollados, aquí solo diremos que en todos los casos se trata de una disolución de un número determinado de componentes en un disolvente orgánico muy volátil; sin embargo, la optimización de concentraciones y proporciones del cóctel requiere estrategias muy diferentes según las características del sensor. De modo que ahora nos centraremos en la preparación del sensor a partir del cóctel.

El sistema rotatorio de velocidad de giro variable utilizado ha sido fabricado por nosotros de acuerdo con dispositivos previamente publicados <sup>1</sup>. Este dispositivo cuyo esquema podemos ver en la Figura 2.2, consta de un motor que hace girar un plato con una muesca superficial que tiene las mismas dimensiones y que es donde se encaja la lámina de poliéster. Todo este mecanismo va cerrado con una tapa superior metálica que presenta un orificio en el que encaja una pieza de teflón expresamente realizada de forma que una vez cerrada dicha tapa queda a una altura y posición adecuadas, para que con ayuda de una micropipeta se puedan depositar un cierto volumen del cóctel en la lámina de poliéster que se encuentra girando a una velocidad dada. De esta forma, el volumen de cóctel depositado se expandirá de forma homogénea sobre el poliéster debido a la acción de la fuerza centrífuga. A continuación, se deja reposar la lámina en un recipiente cerrado

conteniendo el mismo disolvente. Una vez evaporado el disolvente del cóctel, nos resulta una zona circular sobre la lámina donde se encuentran los componentes necesarios para reconocer al analito y producir la señal analítica, y es a esa zona lo que denominamos la zona activa del sensor o zona sensora.

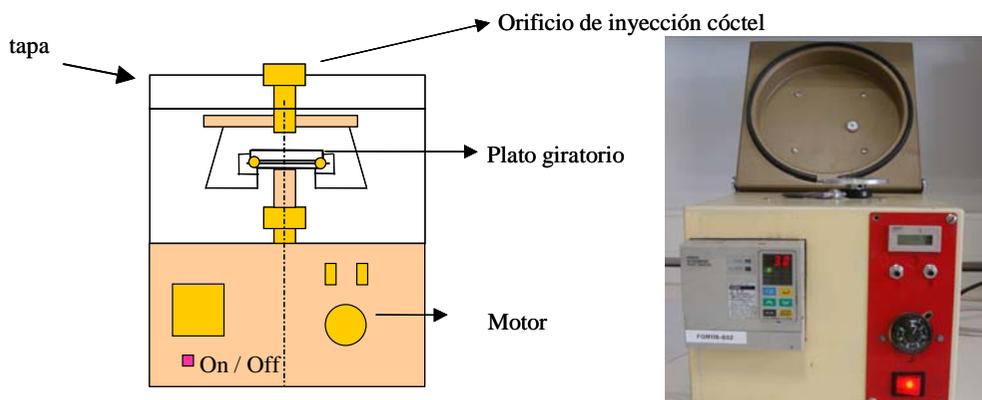


Figura 2.2. Sistema centrífugo de preparación de membranas.

Para calcular el espesor de la zona activa, se la ha considerado como un cilindro, por lo que aplicando la ecuación 2.1 podemos calcular la altura de dicho cilindro, es decir, el espesor de la membrana:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (2.1)$$

donde  $r$  es el radio de la zona sensora,  $h$  es el espesor y  $V$  es el volumen que ocupan todos los componentes de esa zona. Teniendo en cuenta que el componente mayoritario (>70%) de la zona activa es el plastificante y este es un líquido de densidad conocida se puede aproximar la densidad de la zona activa a la densidad de dicho componente. Por lo que el volumen lo podemos calcular mediante la expresión:

$$V = \sum \frac{m}{d} \quad (2.2)$$

donde  $m$  es la masa de cada uno de los componentes de la zona sensora y  $d$  es la densidad de la membrana.

## 2. Metodología de uso.

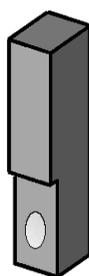


Figura 2.3. Tubo de polietileno usado para el análisis.

En este apartado se describe la metodología de trabajo usada para llevar a cabo los análisis mediante las tiras reactivas propuestas en la presente Memoria de Doctorado. Para ello, se utilizan unos pequeños tubos de polietileno (Figura 2.3) de 10 ml de volumen, donde se depositan las muestras a analizar y los patrones de referencia. En estos recipientes es donde se pone en contacto la disolución problema en presencia de una disolución reguladora del pH y el sensor durante un tiempo de 5 min. Transcurrido ese tiempo, se habrán producido las reacciones químicas pertinentes, que se traducen en un cambio en el color de la zona sensora y, por consiguiente, en la longitud de onda de absorción de

radiación.

Una vez concluida la etapa de equilibración, se extrae la tira del tubo y se eliminan por agitación los restos de disolución que mojan la zona activa; tras lo cual se sitúa con ayuda de un portamuestras adecuado en el compartimiento de medida de un espectrofotómetro, donde se mide la señal analítica que nos permite



A



B



Figura 2.4. Soporte adaptador utilizado.

cuantificar el analito presente. Para realizar la medida de absorción de radiación se ha usado un portamuestra de diseño propio que permite situar la tira reactiva y que se adaptan perfectamente al compartimento de cubetas del espectrofotómetro empleado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Dicho portamuestra está fabricado en hierro y pintado de negro (Figura 2.4). Cuando la tira reactiva es introducida en uno de ellos, el orificio que presentan coincide con la zona activa del sensor, de forma que el haz de radiación la atraviesa por la zona central. En todos los casos el diámetro del orificio del soporte es ligeramente inferior al de la zona activa de la tira reactiva, aumentándose así la reproducibilidad de las medidas. De esta manera se evita que la radiación atraviese los bordes del sensor, pues es la zona de la membrana que está sujeta a mayores variaciones en función de cómo haya tenido lugar el secado de la zona activa.

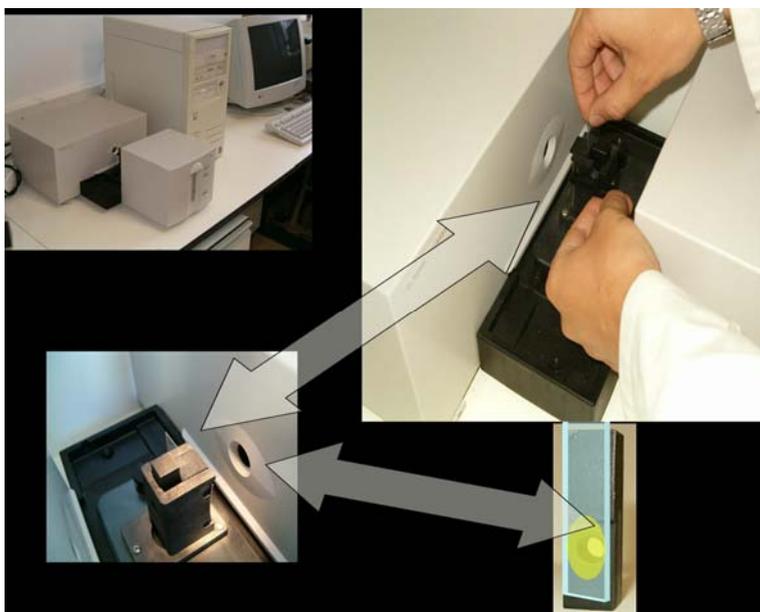


Figura 2.5. Esquema de trabajo para la medida con un sensor.

En la Figura 2.5 podemos ver de forma esquemática la secuencia de pasos seguida para el análisis de una muestra mediante el uso de membranas de gota plana.

## 2.1. Medida del parámetro analítico

### 2.1.1. Medidas de Absorbancia

Al incidir la radiación electromagnética sobre un cuerpo transparente una parte es reflejada, otra parte es absorbida y una tercera parte saldrá al exterior tras atravesarlo. En este proceso, parte de la energía de la radiación es transferida temporalmente a la molécula y, como consecuencia, disminuye la intensidad de la radiación.

Se denomina transmitancia al cociente:  $T = \frac{I}{I_0}$ , donde  $I_0$  es la intensidad incidente e  $I$  la intensidad transmitida. La absorbancia, que será la magnitud analítica utilizada, se define por la ecuación:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.3)$$

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia se relaciona linealmente con la concentración de la especie absorbente ( $c$ ) y con la longitud de la trayectoria ( $b$ ) de la radiación en el medio absorbente. Es decir:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2.4)$$

donde  $\epsilon$  es la constante de proporcionalidad denominada absorptividad molar que tiene unidades de  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La intensidad de la absorción de una transición electrónica a cualquier longitud de onda, esta determinado por la probabilidad de que ocurra dicha transición y el tamaño de la molécula o especie absorbente. La absorción máxima de una banda corresponde a la transición mas probable en la región de absorción<sup>2</sup>. La ley de Beer es una ley límite y se aplica cuando la energía radiante absorbida por la especie se pierde en forma de calor y en sistemas homogéneos y continuos como son las disoluciones verdaderas, por lo que existen un gran número de desviaciones tanto reales como aparentes que deberán ser tenidas en cuenta en el empleo de los sensores de un solo uso estudiados en esta Memoria.

En el caso de membranas basadas en un segundo componente para cationes la señal repuesta que representamos no es la absorbancia (A) sino el grado de protonación ( $1-\alpha_{ef}$ ) del cromoióforo:

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_{Base}}{A_{tampón} - A_{Base}} \quad (2.5)$$

Tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar y se mide su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro de diodos en línea Hewlett-Packard (modelo 8453; Nortwalk, CT) provisto de un soporte de cubeta para el sensor desechable fabricado en hierro y pintado de negro mate ya antes citado<sup>3</sup>. Los valores de absorbancia, correspondientes a la especie completamente protonada ( $A_{HC}$ ) y desprotonada ( $A_C$ ) del cromoióforo necesarios para calcular los valores de  $\alpha_{ef}$ , se midieron acondicionando los sensores desechables en tampón Tris  $2\cdot 10^{-2}$  M y NaOH  $10^{-2}$  M.

Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-

Hüchel<sup>4</sup>. Para corregir la absorbancia del fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar, además para las medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila, la precisión mejora una media de un 2% cuando el valor de la absorbancia de fondo, medido a 800 nm, es sustraído en todos los casos. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no necesitaron ser acondicionadas antes de su uso.

### 2.1.2. Medidas de Fluorescencia y tiempo de vida

Para medir la intensidad de luminiscencia y tiempo de vida en las membranas del capítulo 3, se han utilizado dos tipos de espectrofluorímetros. Por una parte el espectrofluorímetro Cary Eclipse de Varian para llevar a cabo las medidas de intensidad de luminiscencia y por otro lado el espectrofluorímetro OB 920 basado en la técnica “*Time Correlated Single Photon Counting*” de Edinburgh Instruments (Figura 2.7) provisto de una lámpara de nanosegundos nF 900-HP y de un fotomultiplicador de fotón único S 900 como sistema de detección, para llevar a cabo las medidas de tiempo de vida. Para poder medir las membranas de un solo

uso, estas se sitúan en un portamuestras adecuado en el compartimento de medida del espectrofluorímetro, donde se mide la señal analítica que nos permite cuantificar o caracterizar el analito presente.

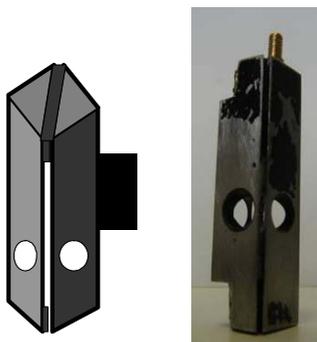


Figura 2.6. Soporte adaptador utilizado para el espectrofluorímetro Cary Eclipse y el espectrofluorímetro OB 920.

Se ha utilizado un portamuestras de diseño propio que permite situar la tira reactiva y que se

adapta al compartimento de cubetas de cada uno de los espectrofluorímetros aquí empleados. Dicho portamuestras está fabricado en hierro y pintado de negro (Figura 2.6) y presenta dos orificios ortogonales de 5 mm de diámetro y una

apertura diagonal de 1 mm de espesor donde se introduce la tira reactiva, los orificios están dispuestos de forma que los haces de excitación y emisión formen un ángulo de  $45^\circ$  con el plano del sensor.

Cuando la tira reactiva es introducida en el portamuestras, los orificios que presenta coinciden con la zona activa del sensor, de forma que el haz de excitación la atraviesa por la zona central. En todos los casos el diámetro del orificio del soporte es ligeramente inferior al de la zona activa de la tira reactiva, aumentándose así la reproducibilidad de las medidas.



Figura 2.7. Espectrofluorímetro Cary Eclipse y espectrofluorímetro OB 920.

### 2.1.3. Medidas mediante escáneres y cámaras

En primer lugar explicaremos, de forma breve, el funcionamiento de un sensor CCD (*Charge Coupled Device*, dispositivo de carga acoplada). Es el componente fundamental de escáner o cámaras, ya que de él depende en gran parte la resolución que puede alcanzar la imagen digitalizada. Para digitalizar un objeto con un escáner se debe situar el mismo (un documento, una fotografía, una ilustración, una diapositiva, un dibujo, etc.) sobre la pantalla del escáner, donde es iluminado por un haz de radiación procedente de la fuente de luz del escáner. La luz reflejada o transmitida, si se ilumina desde atrás, por el objeto pasa al sistema

óptico, que recibe la luz en el elemento fotosensor (CCD), que convierte la intensidad de la luz que reciben en una serie de señales eléctricas analógicas equivalentes. El CCD contiene células fotoeléctricas situadas muy próximas que actúan convirtiendo la señal luminosa de intensidad variable que reciben, en una señal eléctrica de voltaje proporcional. El CCD puede ser lineal o matricial. El primero se basa en una única línea de fotodiodos que se van desplazando para leer la imagen. Se utiliza en los escáneres planos y de mano. Los segundos, los sensores de superficie, que a diferencia de los lineales, capturan la información en un único momento. Se utilizan en escáneres de transparencias, cámaras digitales y cámaras de video. Las señales eléctricas analógicas proceden del fotosensor, que está controlado mediante un circuito interno. En él cada condensador puede transferir su carga eléctrica a uno o a varios de los condensadores que estén a su lado en el circuito impreso, de manera que las cargas son enviadas al ADC (convertidor analógico digital), que las convierte en señales digitales codificadas en aptas para ser leídas por el programa apropiado.

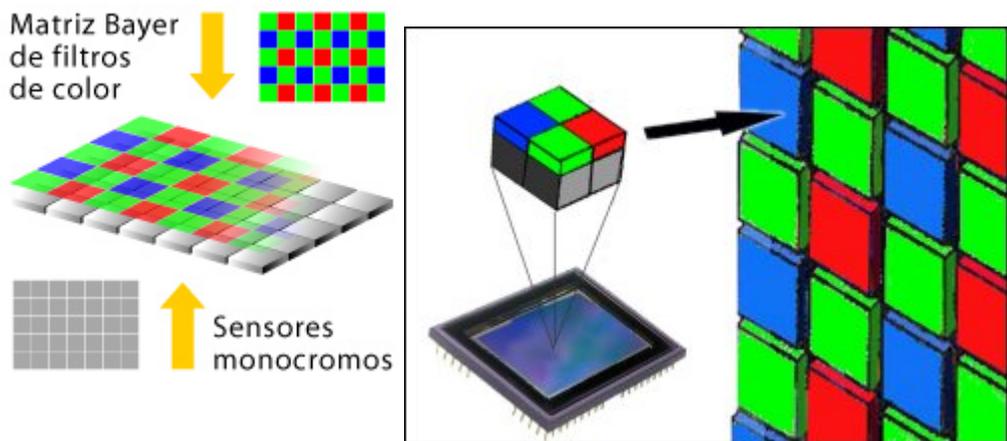


Figura 2.8. La mayoría de cámaras digitales emplean un filtro de mosaico RGB (Bayer) delante del sensor para poder captar el color.

Los escáneres pueden realizar el proceso de lectura del original en uno o más pasos. En el primer caso, el mecanismo del escáner captura en una sola

pasada la imagen con todos sus atributos de color, separándose luego los componentes de color rojo, azul y verde de la luz reflejada mediante un prisma o un filtro, siendo enviados entonces a un conjunto de CCD responsables de cada color particular. En el proceso de tres pasos, la imagen se escanea en tres veces, una para cada canal de color primario (rojo, verde y azul). La luz reflejada en cada paso es enviada a un filtro coloreado y centrada en la franja de CCD responsables de ese color.

Realmente, no existen sensores capaces de registrar diferencias de color. En todos los chips de imagen (con la excepción de uno de Foveon que usa tres capas distintas de silicio, una para cada color primario), todos los chips de imagen usan para registrar colores lo que se llama una matriz Bayer (*Bayer Matrix*) o matriz de filtros de color (*Colour filter array*) (Figura 2.8).

El mosaico de Bayer, conocido como filtro, máscara o mosaico de Bayer por su inventor Bryce Bayer de la empresa Eastman Kodak, es una malla cuadrículada de filtros rojos, verdes y azul que se sitúa sobre un sensor digital de imagen (CCD o APS) para hacer llegar a cada fotodiodo una tonalidad de los distintos colores primarios.

Está constituido por un 50% de filtros verdes, un 25% de rojos y un 25% de azules e interpolando dos muestras verdes, una roja, y una azul se obtiene un pixel de color. En la patente de Bryce Bayer<sup>5</sup>, se llama elementos sensores de luminosidad a los verdes, y elementos sensores del color a los rojos y azules. La razón de que se use mayor cantidad de puntos verdes es que el ojo humano es más sensible a ese color. La disposición de los colores suele alternar rojo y verde en una fila, y verde y azul en la siguiente fila paralela.

Usando un algoritmo muy complejo, los valores que cada píxel registrados se comparan con los vecinos y de ahí se deriva la información final sobre el color. Es lo que se llama interpolación de color. Evidentemente, se trata de una operación

muy sofisticada, donde cada píxel es capaz de procesar la información de las células vecinas mediante algoritmos y calcular así cuáles serían los dos valores que le faltan.

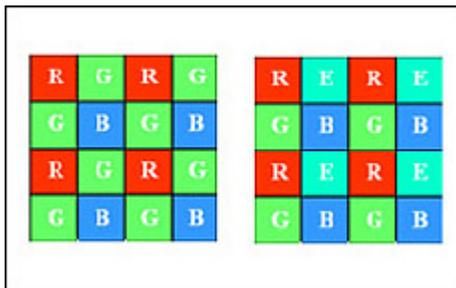


Figura 2.9. Mosaico de cuatro colores, rojo, verde, azul y esmeralda.

Además, existen dispositivos como la cámara Sony F828 que usa un esquema de matriz de cuatro colores, con un verde esmeralda como cuarto color (Figura 2.9). Sobre el mosaico Bayer de tres colores, Sony ha añadido un cuarto, el esmeralda, para conseguir imágenes que sean más parecidas a lo que el ojo humano es capaz de ver, al asegurar que nuestra vista percibe un tipo concreto de verde: el esmeralda.

La única alternativa actual a la interpolación de color es la tecnología empleada por Foveon en sus sensores (Figura 2.10). Esta ilustración de la propia marca explica la aportación de este sensor. Mientras que la película química de fotografía contiene tres capas de emulsión para capturar cada uno de los colores primarios de las imágenes, los sensores tradicionales Bayer sólo capturan un canal de color e interpolan los otros dos. Por ello, el sensor Foveon X3 tiene tres capas de píxeles para capturar el color real de las imágenes.

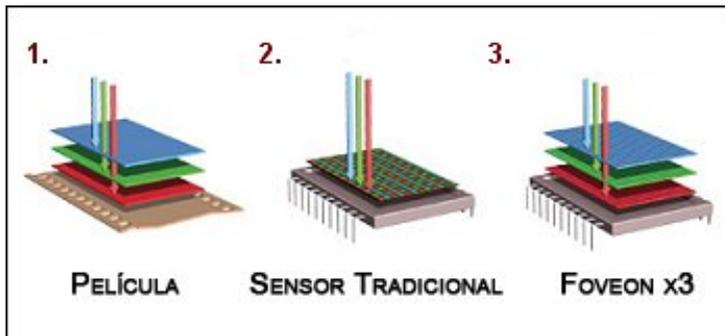
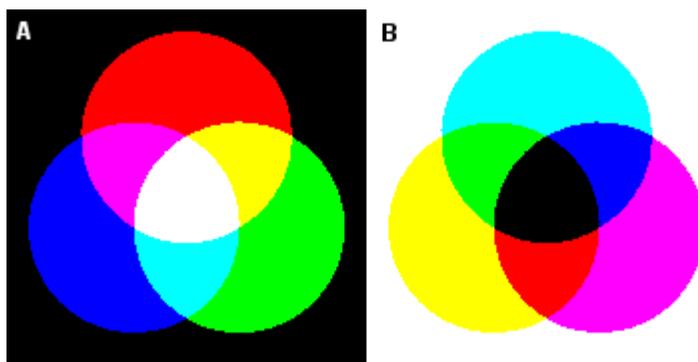


Figura 2.10. Foveon. Formas de selección del color.

#### 2.1.4. Espacios de Color

Vamos a comentar a continuación de forma breve, los dos espacios de color que se han usado en esta Memoria de Doctorado: RGB y CMYK.

**RGB:** Este modo es el que más se usa en la iluminación artificial y en la mayoría de monitores y pantallas gráficas proporcionando la mayoría de la radiación del espectro visible mezclando, para ello, las luces generadas por colores rojos, verdes y azules. Estos tres colores primarios crean el blanco cuando se combinan simultáneamente por eso se llaman también aditivos. Al mezclarse dos a dos, crean los colores secundarios. Al mezclarse luz verde con azul se obtiene el cian, con la luz roja y azul se logra el magenta y usando luz roja y verde observaremos el amarillo. Si la mezcla es en diferentes proporciones de estos colores básicos se van originando los diferentes tonos de la gama del espectro. Realmente el negro del monitor no es tal, sino más bien un verde oscuro o gris amarronado debido a que no puede evitarse cierta emisión dispersa de luz. La gama de color de cualquier monitor es más reducida que la que ofrece el mundo natural debido a la limitación de los revestimientos de fósforo de la pantalla (Figura 2.11).



**A.** Combinación aditiva. **B.** Combinación sustractiva. Sumando luz, toda mezcla es más clara que cualquiera de los colores que intervienen. Restándola, en cambio, los secundarios son más oscuros que los primarios.

Figura 2.11: Los modos RGB y CMYK son, en cierto modo, complementarios, ya que combinan la luz sumándola o filtrándola. Los colores primarios de un sistema son los secundarios en el otro.

**CMYK:** Este sistema responde a una idea totalmente opuesta al del anterior, puesto que en vez de basarse en una fuente de luz para generar las mezclas de los colores primarios, se basa en la propiedad de la tinta impresa en papel de absorber la luz que recibe. Cuando una luz blanca incide sobre tintas translúcidas, éstas absorben parte del espectro de modo que el color no absorbido se refleja. En el plano teórico, los pigmentos mezclados de cian, magenta y amarillo deberían absorber todo el espectro, produciendo, en consecuencia, negro. Por esta razón son llamados "colores sustractivos". En la práctica todas las tintas contienen impurezas y ello ocasiona que la mezcla genere un color marrón oscuro, siendo necesario perfilar con tinta negra para conseguir un color negro auténtico. Esta clasificación o *modo de color* es el estándar usado en la reproducción de imágenes impresas en cuatricromía que se fundamenta en la mezcla de diferentes proporciones de cian (C), magenta (M), amarillo (Y de *Yellow*) y negro (K de *black*) (Figura 2.11).

### 2.1.5. *Parámetro analítico en escáneres y cámaras*

En nuestro caso, los cambios calorimétricos de la zona sensora de la membrana son evaluados a partir de las imágenes de las membranas obtenidas trabajando con el escáner o con cámara. Los datos numéricos se pueden extraer de las imágenes a través de la definición de una región del interés (ROI) para cada área sensora. El promedio del color de los píxeles, usando el espacio de color RGB o de CMYK de cada ROI es utilizado para la estimación del  $\alpha$ .

De esta manera, el parámetro normalizado  $1-\alpha_{ef}$  se obtiene usando la luminosidad de cada zona sensora, definido como el cociente entre la intensidad de color promedio del canal adecuado, obtenido del histograma ( $I_x$ ), y su máximo valor ( $I_0$ ) obtenido de una lectura del soporte de estireno blanco, usualmente un valor cercano a su máximo teórico de 255. Así, usando estos valores es posible obtener una absorbancia efectiva de los diferentes canales de luminosidad.

El uso de absorbancias efectivas obtenidas del escáner, ha sido usado por diferentes autores<sup>6-11</sup>, pero este parámetro y al igual que ocurre con la imagen grabada por el escáner, depende de las características del objeto, de la composición de la luz que incide en el objeto y también de las propiedades de grabación del dispositivo.

Para conseguir la imagen digital de la membrana desechable, se ha utilizado un portamuestras de diseño propio para trabajar con el escáner en modo reflexión y con las cámaras, realizado en poliestireno blanco, que posee cinco posiciones distintas para mantener a las membranas en la misma posición cada vez, incrementando así su reproducibilidad. Este portamuestras se muestra en la Figura 2.12.

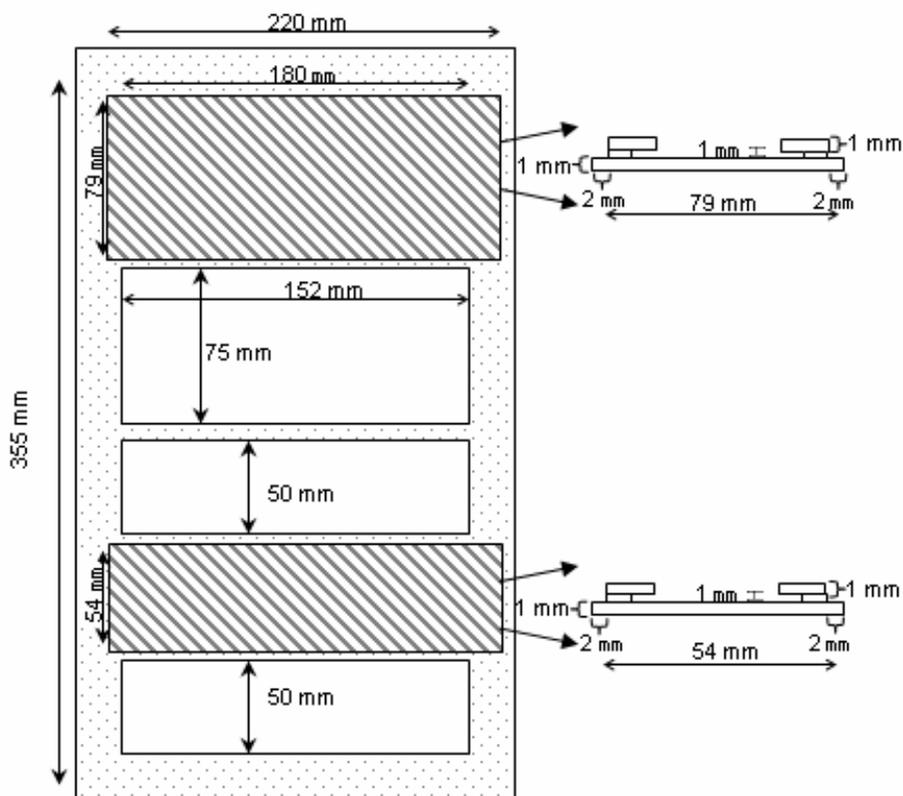


Figura 2.12. Portamuestras de fabricación propia para adquirir imágenes usando un escáner convencional.

De la manera descrita, se transforma el valor medio del color del píxel del ROI en absorbancias o densidades de reflexión estimadas. Expresiones que son similares a la expresión utilizada en la metodología espectrofotométrica, por lo tanto, hemos utilizado el mismo formalismo para obtener las concentraciones asociadas, la cual define el parámetro analítico  $\alpha$ , una absorbancia relativa, dentro de la metodología de este tipo de membranas. Por ello, hemos aplicado los modelos teóricos tanto sigmoideal como lineal para nuestro propósito.



Figura 2.13. Escáner ScanMaker i700.

Dependiendo del tipo de colorante que se use para la fabricación de los filtros que componen el mosaico de color interno del CCD, tendrán diferentes grados de solapamiento espectral, de manera que es posible, en una primera aproximación, seleccionar el canal más conveniente comparando con el espectro de absorción del cromoionóforo empleado en los sensores.

El escáner utilizado se muestra en la Figura 2.13 donde se pueden observar que se trata de un escáner óptico convencional que puede trabajar tanto en modo reflexión como en modo transmisión. En dicha figura también se observa el portamuestras empleado.

El sistema de medida empleando una cámara CCD, se presenta en la Figura 2.14. Donde se observa la colocación de la fuente de luz junto con la situación de la cámara CCD, ambas colocadas sobre una plataforma rotacional y traslacional. La fuente de luz se sitúa a 30 cm. de la zona de detección y dispuesta a 25 cm. de altura con un ángulo de  $45^\circ$  con respecto a la normal (plano con las membranas desechables). La cámara CCD se situó a 15 cm. del área de detección con un ángulo de  $8^\circ$  con respecto a la normal.

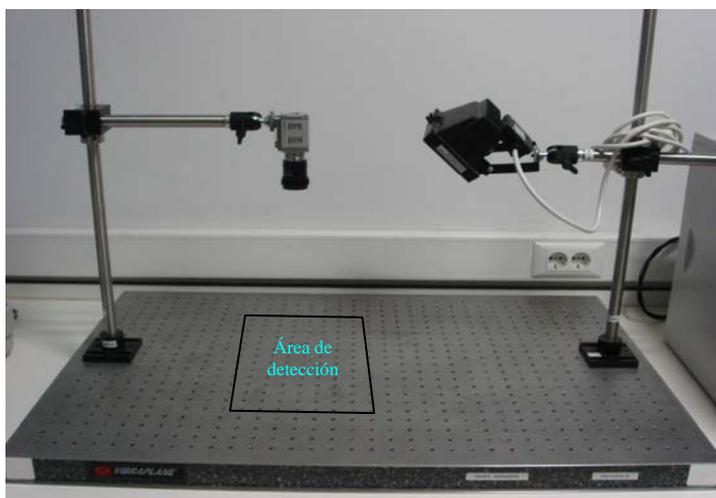


Figura 2.14. Fotografía del sistema empleado utilizando una cámara CCD.

La Figura 2.15 muestra el objetivo utilizado para enfocar las membranas desechables, acoplado a la cámara CCD empleada como sistema detector.



Figura 2.15. Cámara CCD y objetivo empleado.

La cámara convencional utilizada como sistema detector fue la cámara SONY CyberShot DCS T-9 de 6.0 megapíxeles, mostrada en la Figura 2.16. Se colocó en la misma plataforma rotacional y traslacional que se empleó en la cámara CCD. Se situó a una altura de 9cm con un ángulo de  $8^\circ$  con respecto a la normal.



Figura 2.16. Cámara fotográfica digital Sony empleada.

A continuación se presentan una serie de figuras donde se muestran ejemplos de las distintas membranas desechables adquiridas bajo los distintos equipos utilizados como sistemas de detección en esta Memoria de Tesis Doctoral. Así, en la Figura 2.17 se muestran distintas membranas desechables adquiridas sobre los distintos tipos de filtros empleados en el escáner trabajando en modo transmisión, con el objetivo de discriminar longitudes de onda y seleccionar el filtro más apropiado (ver Capítulo 5).

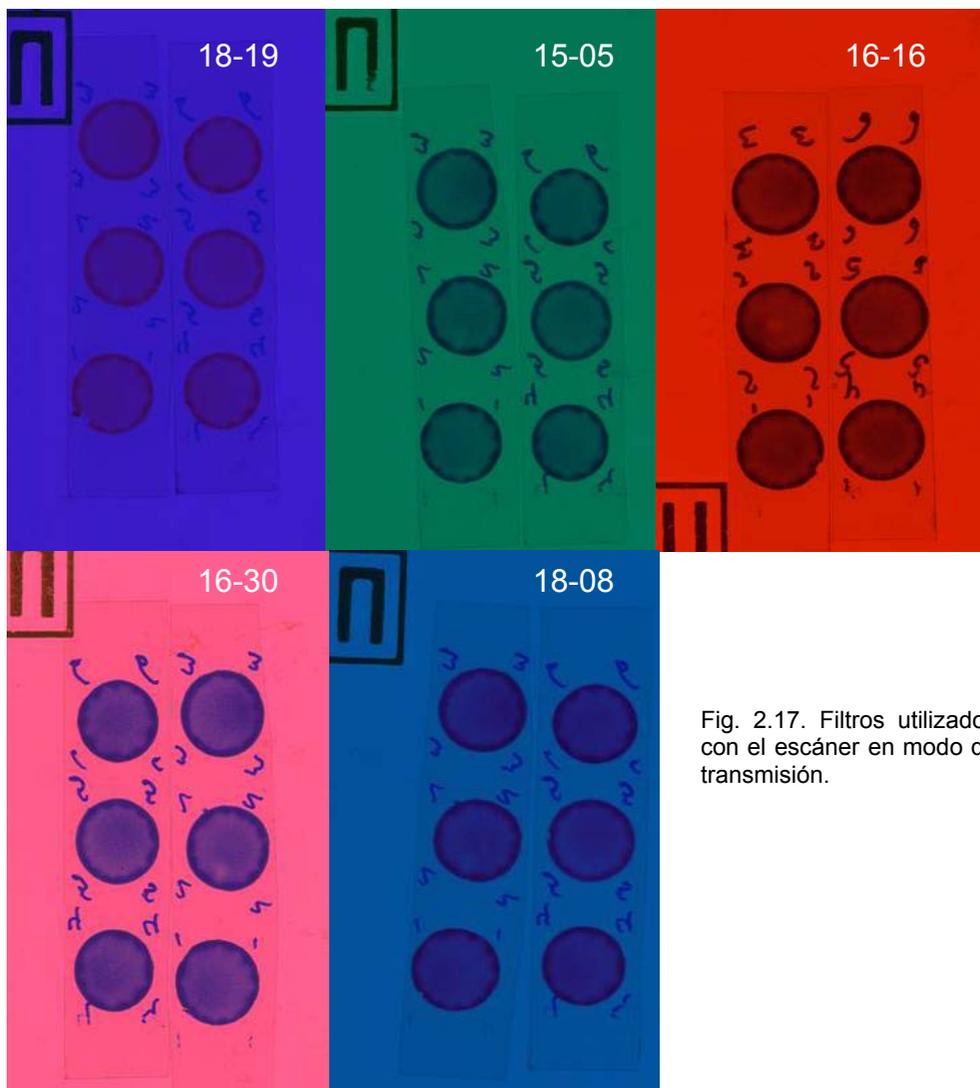


Fig. 2.17. Filtros utilizados con el escáner en modo de transmisión.

La Figura 2.18 muestra a las membranas desechables obtenidas con el escáner HP Scanjet 4100 C a 24 bits de profundidad de color y 600dpi de resolución. Las Figuras 2.19 y 2.20 muestran a las membranas desechables medidas con el escáner ScanMaker i700 a 48 bits de profundidad de color con 300 y 75 dpi de resolución respectivamente. Las figuras 2.18, 2.19 y 2.20 muestran las membranas en medio ácido y básico, que son los extremos del rango de color donde trabajamos. Finalmente en la Figura 2.21 se muestran las imágenes de las membranas desechables obtenidas mediante la cámara digital convencional empleada iluminando con luz halógena (Figura 2.21 A), iluminando con el propio flash (Figura 2.21.B) y a las membranas capturadas utilizando la cámara CCD (Figura 2.21.C).

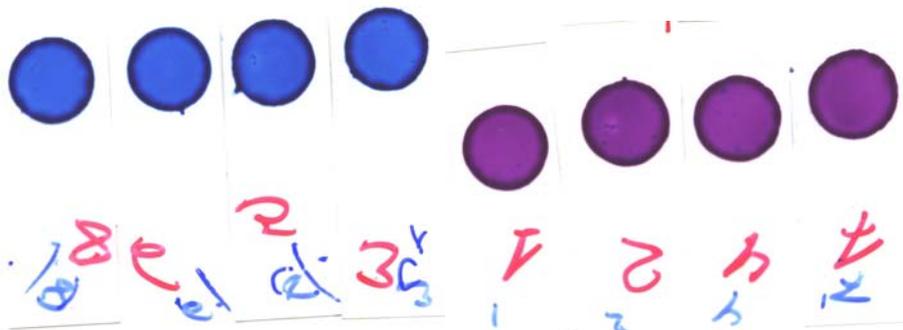


Figura 2.18. Escáner HP 4100C. Ejemplos HCl  $10^{-2}$  M (azules) y NaOH  $10^{-2}$ M (violetas).

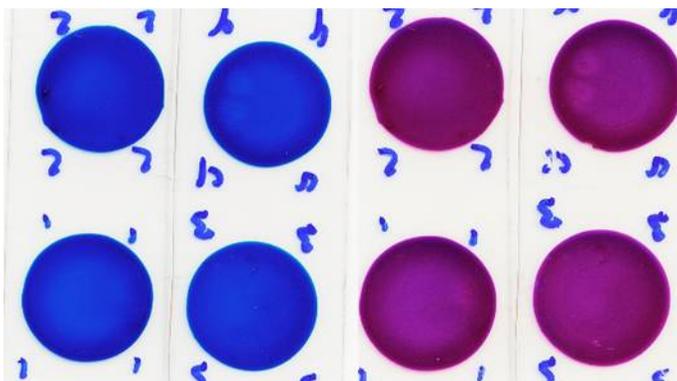


Figura 2.19. Escáner ScanMaker i700 300 dpi de resolución. Ejemplos HCl  $10^{-2}$  M (azules) y NaOH  $10^{-2}$ M (violetas).

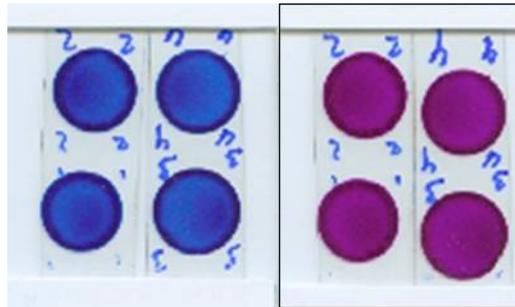


Figura 2.20. Escáner ScanMaker i700. 75 dpi de resolución. Ejemplos HCl  $10^{-2}$  M (azules) y NaOH  $10^{-2}$  M (violetas).

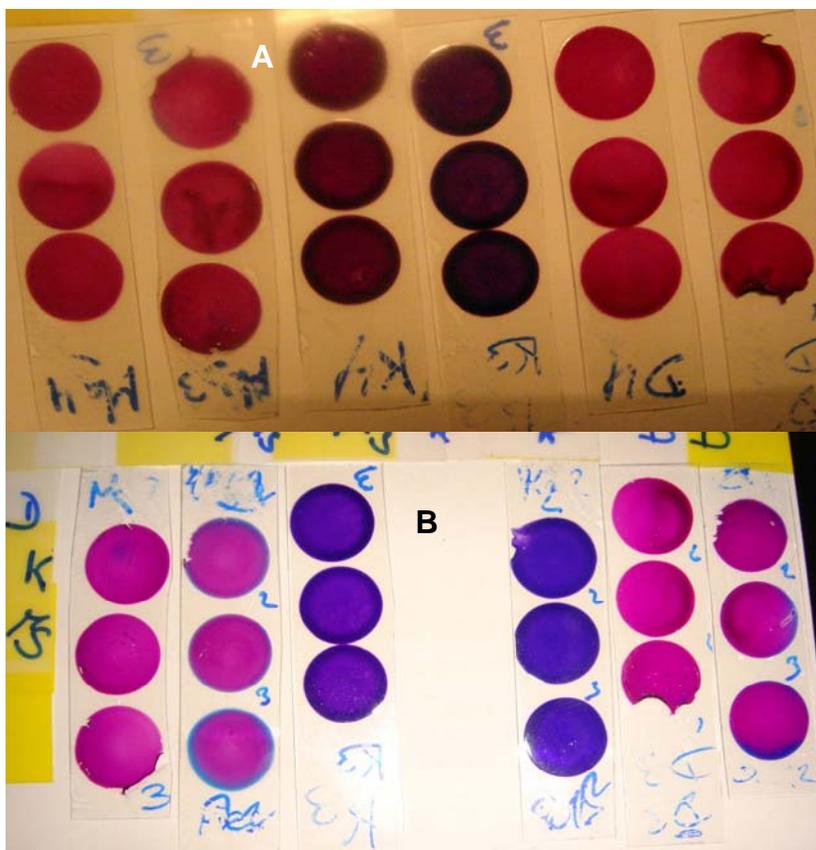


Figura 2.21. Determinación simultánea con: A: Cámara digital Sony, Iluminación Halógena.

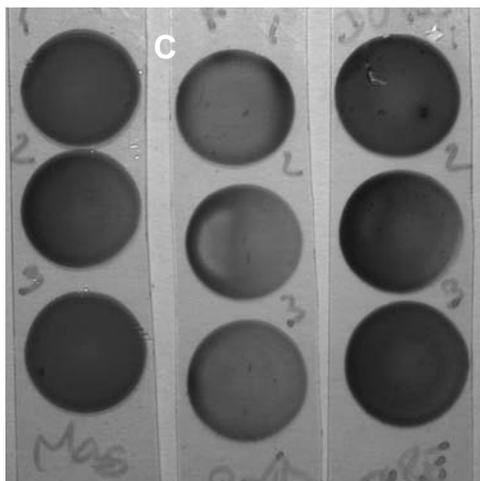


Figura 2.21.1. Determinación simultánea C:  
Cámara CCD

### 3. BIBLIOGRAFÍA

1. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* 1992, 266, 73-87.
2. Pino Perez, F.; Perez-Bendito, D. *Análisis de elementos-traza por espectrofotometría de absorción molecular ultravioleta-visible*, Publicaciones del Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba y Universidad de Sevilla: Cordoba, 1983.
3. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* 2003, 481, 139-48.
4. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* 1982, 136, 363-68.
5. Bayer, Bryce E. Color imaging array. US Patent 05/555,477[US3,971,065]. 1975.
6. Kompany-Zareh, Mohsen; Mansourian, Mahboubeh; Ravae, Fariba *Anal.Chim.Acta* 2002, 471, 97-104.
7. Kompany-Zareh, Mohsen; Mirzaei, Siavash *Anal.Chim.Acta* 2004, 521, 231-36.

8. Abbaspour, Abdolkarim; Mehrgardi, Masoud A.; Noori, Abolhasan; Kamyabi, Mohammad Ali; Khalafi-Nezhad, Ali; Soltani Rad, Mohammad Navid *Sens.Actuators B* 2006, *B113*, 857-65.
9. Birch, Nathan C.; Stickle, Douglas F. *Clin.Chim.Acta* 2003, *333*, 95-96.
10. Goodey, A. P.; Lavigne, J. J.; Savoy, S. M.; Rodriguez, M. D.; Curey, T.; Tsao, A.; Simmons, G.; Wright, J.; Yoo, S. J.; Sohn, Y.; Anslyn, E. V.; Shear, J. B.; Neikirk, D. P.; McDevitt, J. T. *J.Am.Chem.Soc.* 2001, *123*, 2559-70.
11. Lancaster, Michael; Goodall, David M.; Bergstroem, Edmund T.; McCrossen, Sean; Myers, Peter *Anal.Chem.* 2006, *78*, 905-11.



## **CAPÍTULO 3**

# DETERMINACIÓN DE MAGNESIO MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO



## DETERMINACIÓN DE MAGNESIO MEDIANTE UN SENSOR ÓPTICO DE UN SOLO USO

### Resumen

Se propone una membrana desechable para la determinación de magnesio en disoluciones acuosas que está constituida por una lámina transparente de poliéster cuyas dimensiones son 40 mm de largo por 14 mm de ancho y 0,25 mm de espesor. La disolución de los componentes reactivos junto con los que originan membrana, que denominaremos habitualmente cóctel, se consigue en un disolvente, THF, que por evaporación controlada origina una membrana con las características deseadas. Con ayuda de una micropipeta se deposita un cierto volumen del cóctel (20  $\mu$ L) sobre un soporte de poliéster, estando éste a su vez dispuesto sobre un sistema rotatorio de velocidad de giro variable y de fabricación propia. De esta forma, el volumen de cóctel depositado se expandirá de forma homogénea sobre el poliéster debido a la acción de la fuerza centrífuga, resultando una zona circular sobre la lámina. Después de ensayar diversos tipos de membranas, se concluyó con la elección de PVC como polímero formador de matriz. La selección de PVC como matriz polimérica implica la utilización de un disolvente de membrana o plastificante para asegurar la movilidad y/o permeabilidad del analito a través de dicha matriz, con éste motivo se seleccionó el tributilfosfato (TBP). Fue necesario el empleo de una sal lipofílica, agente formador de pares iónicos, cuya finalidad es la de mantener la electroneutralidad dentro de la zona sensora. Se seleccionó una sal de boro (tetrakis(4-clorofenil)borato potásico) ya que se comporta de forma adecuada en cuanto a selectividad y estabilidad se refiere. Se optimizaron los distintos parámetros relativos a la preparación de la zona sensora (concentración de reactivos, forma de preparación de la zona reactiva, etc.) y de la reacción del analito en el sensor (pH, fuerza iónica, tiempo de contacto, etc.). Asimismo se realizó un estudio detallado de cómo influye en el sistema la presencia de otros iones (interferentes) en la muestra problema y se comprobó la eficacia del sistema validándolo quimiométricamente. Finalmente, se aplica el

procedimiento a una serie de muestras de aguas y bebidas de distinto tipo y procedencia.

## 1. Introducción

De las diferentes estrategias usadas para el reconocimiento de cationes, el empleo de cromofóros es especialmente útil, por poseer estos una zona de reconocimiento del analito unida a una zona de transducción que convierte el hecho del reconocimiento en una señal óptica, tal como absorción de radiación, reflexión o luminiscencia. Una agrupación de reconocimiento muy interesante es el núcleo de cumarina debido a sus propiedades fotoquímicas y fotofísicas cuando se unen a criptandos<sup>1</sup>, éteres corona<sup>2</sup>, o calixarenos<sup>3</sup>.

Se han sintetizados diferentes monoaza- y diazacoronas unidas a núcleos de cumarinas mediante un puente metileno<sup>4,5</sup> o etileno<sup>6</sup>, demostrando que el grupo carbonilo de la agrupación cumarina participa en el proceso de complejación junto con el anillo éter corona. La sustitución del puente metileno por un grupo carbonilo dentro de un éter monoaza-15-corona-5, mejora la selectividad hacia metales alcalinos. En esta configuración el puente amida participa en el proceso de complejación dando origen al fenómeno de hipercromaticidad<sup>7</sup>.

Cuando se hace más rígida la cavidad complejante mediante la conexión de la agrupación aroil cumarina con el anillo éter corona a través de un grupo benzo<sup>8</sup> o mediante la incorporación del grupo benzo en el éter corona<sup>9</sup>, se consigue una competencia entre el grupo cromóforo 3-aroilcumarina y el éter corona por el ión metálico, originándose una mezcla de dos complejos 1:1 diferentes con los grupos carbonilo y éter corona, respectivamente<sup>8</sup>.

Esto se ha demostrado mediante la preparación de una 7-dietilamino-3-(3,4-etilendioxybenzoil)cumarina en la cual el anillo corona se ha sustituido por una agrupación 1,4-dioxano con el objeto de imitar el efecto electrónico ejercido por el

anillo corona sobre el núcleo 3-aroilcumarina<sup>8</sup>. Este compuesto reacciona exclusivamente con perclorato de magnesio en acetonitrilo, mostrando un interesante desplazamiento batocrómico de 46 nm por complejación.

Teniendo en cuenta la selectividad que muestra hacia magnesio, hemos usado esta cumarina como cromoforo para el desarrollo de un sensor óptico de un solo uso para la determinación de Mg(II) en agua.

Se han descrito diferentes sensores desechables para Mg(II) y algunos de ellos han sido incluso comercializados. En el caso del agua, la mayoría de los sensores propuestos determinan Mg(II) junto con Ca(II) –de hecho, dureza en vez de magnesio- como es el caso de la membrana desechable Serim<sup>TM</sup> para determinar dureza en agua (Serim Research Co.), el test de dureza total EM Quant<sup>®</sup> (Merk), o el test de dureza total Aquadur<sup>®</sup> (Macherey-Nagel), todas ellas basadas en la reacción entre un indicador químico dispuesto en la zona reactiva de la membrana y el Mg(II) y/o Ca(II) en agua, lo cual origina un cambio de color que puede ser comparado con una escala de color, obteniendo un resultado semicuantitativo.

Otras membranas reactivas han sido propuestas para la determinación de Mg(II) en fluidos biológicos tales como sangre u orina. Las más simples están compuestas por un indicador complexométrico tal como Calmatiga RTM<sup>10</sup> o un derivado tipo cianoformazán<sup>11</sup>, un agente enmascarante, un tampón y un estabilizador, todos ellos dispuestos sobre un material absorbente, normalmente papel de filtro y cubierto por una membrana semipermeable. Otras membranas reactivas propuestas para magnesio consisten en un elemento analítico integral multicapa que consta de un soporte impermeable en agua que permite la transmisión de luz, una capa reactiva que contiene un indicador soluble en agua, como el azul de Xilidil IR, capaz de reaccionar con el analito, un tampón de pH, un surfactante no iónico y una capa porosa de difusión conteniendo un controlador de la acción difusora<sup>12</sup>. La púrpura de ftaleína ha sido usada como reactivo en el test

Reflectoquant®, (Merk) para la determinación de magnesio en leche o queso basada en medidas de reflectancia difusa<sup>13</sup>.

Otro tipo de membranas reactivas usan la química ionóforo-cromoionóforo y constan de una soporte poroso, como por ejemplo un papel de filtro, incorporando una mezcla hidrofóbica homogénea con los siguientes reactivos: N,N-diheptil-N,N-dimetil-1,4-butanodiamida como ionóforo para Mg(II) junto con un derivado del indonaftol que actúa como cromoionóforo, un plastificante, un tampón y reactivos adicionales tales como eliminadores de interferencias o humectantes<sup>14</sup>. Membranas completas transparentes tridimensionales del mismo tipo han sido también descritas para Mg(I)<sup>15</sup>. En todos los casos, la extensión en el cambio de color es proporcional a la cantidad de magnesio en la muestra y puede ser medido mediante comparación visual con una carta de colores estándar o con fotómetros dedicados de reflectancia o transmisión. En lo que nosotros conocemos, la química cromoionóforo no ha sido utilizada en sensores desechables.

En este Capítulo se expone el trabajo realizado para el desarrollo y puesta a punto de un sensor óptico desechable, basado en una cetoaminocumarina, selectivo para la determinación de magnesio en aguas de diverso tipo mediante el empleo de un espectrofotómetro convencional.

## **2. Experimental**

### **2.1. Instrumentación y software**

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200 y para llevar a cabo las medidas de fluorescencia se utilizó un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian Australia Pty

Ltd.) conectado a un ordenador personal Pentium 4 2.40 GHz. Las medidas de tiempo de vida se llevaron a cabo utilizando un espectrofluorímetro OB 920 (Edinburgh Instruments Ltd, Livingston, UK) basado en la técnica *Time Correlated Single Photon Counting*, con una lámpara de nanosegundos 900-HP y un fotomultiplicador de fotón único S900 como sistema de detección, conectado a un ordenador personal AMD Athlon™ XP 2400+ 2.00 GHz. La recogida y tratamiento de los datos de tiempo de vida fue llevada a cabo utilizando el F900 Single Photon Fluorescence Spectrometer Software proporcionado por Edinburgh Instruments.

Las medidas de absorbancia y luminiscencia se realizaron utilizando los soportes anteriormente descritos en el Capítulo dedicado a Metodología, construidos en un bloque metálico de hierro pintado de negro y con las dimensiones adecuadas para ser utilizados en cada uno de los compartimentos de cubetas de los espectrofotómetros anteriormente citados.

Las medidas de pH se llevaron a cabo utilizando un pH-metro digital provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata (Crison, Barcelona, España) calibrado a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  con disoluciones tampón de pH 7,0 y 4,0 (Merck). Los sensores se prepararon utilizando un sistema rotatorio de velocidad de giro variable diseñado por nosotros de acuerdo con Seiler et al<sup>16</sup>.

Los programas utilizados para el tratamiento de datos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU., 1993, GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido y PhotochemCAD HD1.1 desarrollado por H. Du, R.A. Fuh y J.S. Lindsey, 1998 y Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EE.UU.) como hoja de cálculo.

## 2.2. Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados eran de grado analítico y el agua empleada

para preparar las disoluciones procedía de un equipo de ósmosis inversa Milli-Ro 12 Plus (Millipore) acoplado a un equipo de refinado Milli Q Plus 185 (Millipore Corp, Bedford, MA.). La conductividad del agua fue controlada periódicamente, no superando en ningún momento el valor de  $18\mu\text{S}$ .

Las disoluciones madre (0,5 M) se prepararon en agua a partir de los correspondientes carbonatos de calcio y magnesio desecados (Merck, Darmstadt, Germany), añadiendo disolución 1:1 de HCl hasta disolución (pH 2,2); disoluciones 0,5 M de sodio, potasio, bario, hierro (III) y cinc se prepararon a partir de los correspondientes cloruros (Merck). También se prepararon disoluciones 0,5 M de sulfato potásico, hidrogeno carbonato de sodio, nitrato potásico, nitrato de estroncio y de hipoclorito sódico (Merck). Disoluciones de menor concentración fueron preparadas mediante dilución con agua. La disolución reguladora de pH 8,0 0,5 M fue preparada a partir de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) y HCl (Merck).

Las membranas sensibles a magnesio se prepararon sobre láminas de poliéster tipo Mylar de 0,25 mm de espesor, (Goodfellow, Cambridge, Inglaterra) empleando los siguientes reactivos: cloruro de polivinilo (PVC; de alto peso molecular), tributilfosfato (TBP), 2-nitrofeniloctileter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP), tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP) y tetrahidrofurano (THF) proporcionados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid). Las siguientes de anión lipofílico fueron usadas tetrakis(3,5-bis(trifluorometil)fenil)borato de sodio (TTFBNa) y tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio (TCFBK) fueron suministradas por Fluka (Fluka, Madrid). La disolución al 5% en peso de hidrogel de poliuretano D4 se preparó en una mezcla al etanol:agua 90%, lo mismo que para D-6 (Tyndale Plains-Hunter L.D. Lawrenceville, NJ, EE.UU) y Nafión (Sigma-Aldrich). Como cromóforo se utilizó la 7-dietilamino-3-(3,4-etilendioxibenzoil)cumarina (DEC) que fue sintetizada y purificada por nosotros<sup>8</sup>, siendo caracterizada por su punto de fusión, análisis elemental,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR, HRMS (FAB+) e IR. Su estructura se puede observar en la Figura 1.1.

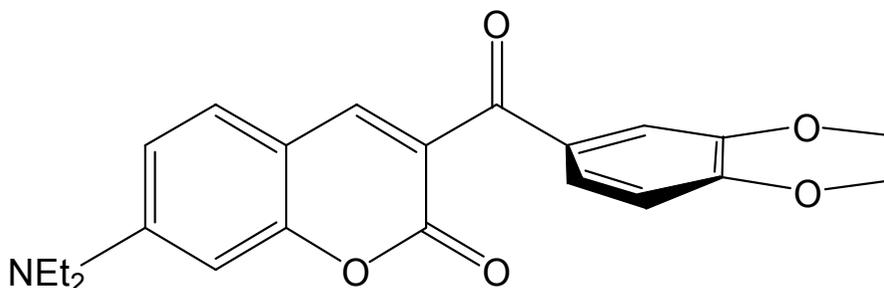


Figura 1.1. Estructura del cromoióforo empleado (DEC).

### 2.3. Preparación de la membrana sensora

La disolución a partir de la cual se preparan las membranas se obtiene pesando 25,0 mg (32,85 % p/p) de PVC, 50,0 mg (65,70% p/p) de TBP, 0,18 mg (0,24% p/p) de DEC y 0,94 mg (1,24% p/p) de tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio (TCFBK) en un vial de vidrio y disolviéndolos en 1,0 mL de tetrahidrofurano recién destilado. Se depositan 20  $\mu\text{L}$  de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 mm  $\times$  40 mm  $\times$  0,5 mm de espesor, con ayuda del sistema centrífugo de fabricación propia basado en el descrito por Seiler y Simon<sup>16</sup>, que gira a 120 rpm. Tras estar la membrana girando durante 30 segundos, se deposita en un recipiente hermético con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 3 minutos a temperatura ambiente y luego se almacena en un lugar protegido de la luz hasta su posterior uso. La zona sensora obtenida de este modo es una película circular sólida, homogénea, adherida al soporte sólido, transparente, de color amarillo, de 6 mm de diámetro y aproximadamente 7,0  $\mu\text{m}$  de espesor. Las concentraciones de cromoióforo y sal lipofílica en la membrana sensora una vez seca son 6,24  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  y 24,9  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente.

## 2.4. Procedimiento y sistema de medida

La respuesta de los diferentes sensores así preparados se evaluó disponiendo en un vaso de vidrio 50 mL de una disolución patrón conteniendo entre  $4,9 \cdot 10^{-4}$  y  $5,01 \cdot 10^{-6}$  M en actividad de Mg (II) y 1 mL de disolución reguladora Tris de pH 8,0 y concentración 0,5 M. A continuación, se equilibra la membrana durante siete minutos en un agitador magnético a 900 rpm de tal manera que se trabaje en régimen laminar, sin turbulencias. Tras la equilibración se extrae la membrana, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar y se seca con un secador de pelo situado a 10 cm encima de la membrana desechable durante 1min ( $\sim 100^\circ\text{C}$ ). La absorbancia de la zona sensora se mide, 45s después de haber sido calentada, en un espectrofotómetro a 460 nm junto con el soporte de tipo Mylar. No fue necesario preacondicionar las membranas antes de usarlas.

## 2.5. Cálculos

El parámetro analítico utilizado en este tipo de sensor es el grado de complejación definido como:

$$1 - \alpha = 1 - \left( \frac{A - A_0}{A_1 - A_0} \right) \quad (\text{ec.1.1})$$

Como puede observarse en la ecuación 1.1, para calcularlo es necesaria la medida de la absorbancia de la membrana desechable a la longitud de onda de 461 nm tras equilibración previa con la muestra problema y antes de dicha equilibración (blanco) para obtener los valores de A y  $A_1$  siendo éstos los correspondientes a los valores de absorbancia de la forma complejada y no complejada del cromoforo, obtenidos después de medir la membrana desechable recién fabricada y después de la reacción con disoluciones de Mg(II) en la zona de saturación. Después de la optimización de la composición de la membrana, las condiciones de reacción y el establecimiento del modelo, fue posible establecer un valor constante de  $A_0$  viene

dado por la media de todas las absorbancias correspondientes a los puntos experimentales que conforman la zona de saturación del modelo sigmoidal a altas actividades, cuyo valor es  $(0,74 \pm 0,050)$  obtenido como el promedio de 45 sensores desechables diferentes.

El uso de los soportes portamuestras diseñados por nosotros, mejora la repetibilidad de las medidas, al medir en una zona con un diámetro constante (5 mm) e inferior al diámetro de la zona activa del sensor. De esta manera, obviamos la variabilidad de tamaño de dicha zona entre diferentes membranas así como el grosor variable de los bordes. La Figura 1.3 muestra la evolución del espectro de una membrana antes y después de haber estado en contacto con una disolución de magnesio habiendo calentado esta última membrana después de reaccionar.

La constante de extracción  $K_e$  fue calculada en la zona de máxima pendiente de la curva experimental obtenida para magnesio, ya que proporciona más información y menor error<sup>17</sup>. Las actividades fueron calculadas de acuerdo con la ecuación de dos parámetros de Debye-Hückel<sup>18</sup>. Los programas utilizados para el tratamiento de datos y el ajuste de datos experimentales fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU, 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido.

### 3. Resultados y discusión

Un estudio previo sobre el desarrollo de sondas fotoactivas basadas en cumarinas como zona de señalización<sup>8</sup>, ha descrito la reacción de la 7-dietilamino-3-(3,4-etilendioxibenzoil)cumarina (DEC) frente a cationes del grupo IIA, especialmente con magnesio en acetonitrilo, una reacción justificada por la cooperación de los carbonilos de los grupos cromeno y aroilo ( $\log K_s = 3,91 \pm 0,01$ ).

Estábamos interesados en utilizar esta reacción en un sensor de un solo uso para la determinación de magnesio en medio acuoso. Por lo tanto, preparamos distintos tipos de membranas conteniendo el cromoforo DEC y los productos

químicos necesarios en cada caso, usando polímeros hidrofílicos, como celulosa, hidrogeles de poliuretano y polímeros hidrofóbicos tales como PVC, PVA, etilcelulosa y Nafión, comprobando que el uso de membranas hidrofóbicas son los que dieron los mejores resultados.

Observaciones preliminares llevadas a cabo en películas de PVC plastificadas conteniendo la cumarina en presencia de un tetrafenilborato alcalino  $R^-$ , mostraron que la complejación con Mg(II) causa un desplazamiento batocrómico de 40 nm en la membrana (desde 421 nm hasta 461 nm) presentando un punto isosbético a 436 nm (Figura 1.3), que es muy similar al de 46 nm (desde 418 nm hasta 464 nm) observado en una disolución de acetonitrilo<sup>8</sup>. También observamos en la membrana que la cumarina libre y complejada, emitían a 473 ( $\lambda_{exc} = 421$ ) y 491 ( $\lambda_{exc} = 461$ ) nm, respectivamente, presentando un menor desplazamiento Stokes la forma complejada (desde  $2,61 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$  a  $1,32 \times 10^{-3} \text{ cm}^{-1}$ ). En la Figura 1.4 se representa la evolución de la fluorescencia con el tiempo.

La señal de la cumarina libre disminuye mientras que hay un aumento en la de la forma complejada, compartiendo ambas variaciones una cinética de decaimiento de primer orden con una constante de  $9,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ , lo cual puede corresponder a la difusión del Mg(II) dentro del medio viscoso de la membrana. Al cabo de 6 minutos, aproximadamente, la emisión se estabiliza y el resultado global es un descenso en la fluorescencia ( $\Delta I_{nt} = 40\%$ ) como así ocurre para otros complejos de cumarina con magnesio que muestran la misma estructura<sup>9;19</sup>, aunque las diferencias pueden ser también debidas a la menor polaridad del disolvente de membrana (plastificante tributilfosfato,  $\epsilon \sim 8$ )<sup>20</sup>.

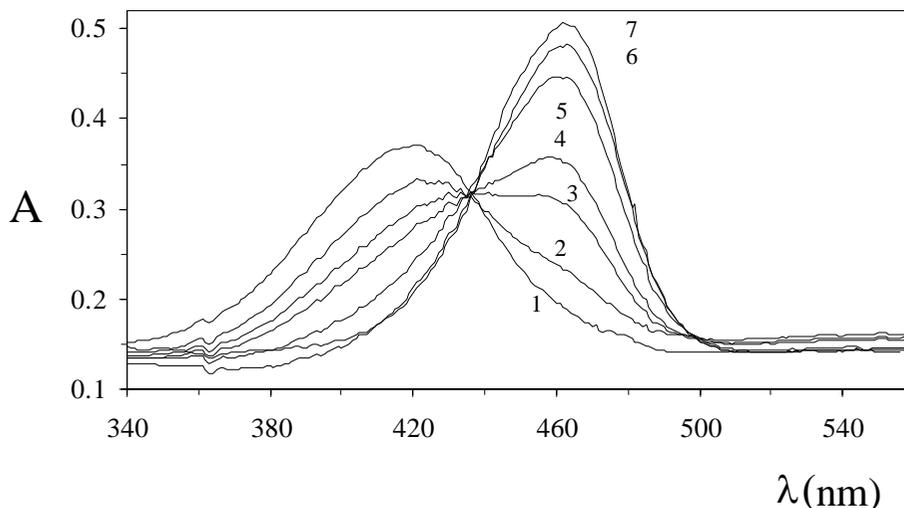


Figura 1.3. Espectro de absorción del sensor de un solo uso después de reaccionar con distintas concentraciones de  $\text{Mg(II)}$ . 1)  $1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ; 2)  $3 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ; 3)  $5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ; 4)  $7 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ; 5)  $1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ; 6)  $4 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ; 7)  $7 \cdot 10^{-4} \text{M}$ .

Los tiempos de vida de fluorescencia de la cumarina libre y complejada se ajustan a un decaimiento biexponencial (cumarina libre:  $\tau_1$  0,52 ns (18,1%),  $\tau_2$  1,91 (81,9%),  $\chi^2$  1,123; complejo:  $\tau_1$  0,91 ns (79,9%),  $\tau_2$  1,92 (20,1%),  $\chi^2$  1,084), mostrando que el proceso de desactivación debe de ser un proceso relativamente complicado debido a la heterogeneidad de la membrana y/o al comportamiento conformacional de la cumarina que se ve afectado por la complejación.

Para finalizar este estudio preliminar, encontramos, sorprendentemente, que la extensión de la reacción entre la membrana y el magnesio retenido en ella, por contacto con la disolución acuosa de  $\text{Mg(II)}$ , era limitada pues un posterior calentamiento de la membrana, cuando no está sumergida en la disolución y después de la reacción, incrementaba considerablemente el desarrollo del color, esto es, la extensión de la reacción. Este comportamiento aparentemente inusual puede ser explicado si tenemos en cuenta el comportamiento conformacional de la

cumarina representado en el Esquema 1. Cálculos semiempíricos (AM1, HyperChem) sugieren que, en ausencia del metal, la energía mínima conformacional corresponde a la conformación A, donde los grupos carbonilo forman un ángulo diedro de ca.  $120^\circ$ . Por otro lado, el gran desplazamiento batocrómico observado por complejación (40 nm) podría ser debido a la interacción de estabilización en el estado excitado del metal con la alta densidad electrónica del grupo carbonilo cromeno transferida desde el grupo donador 7-dietilamino<sup>6,19</sup>. Esta estabilización podría ser aún mas mayor en la especie D donde los grupos carbonilo fenona y cromeno quedan paralelos entre si y cooperan en la coordinación del metal.

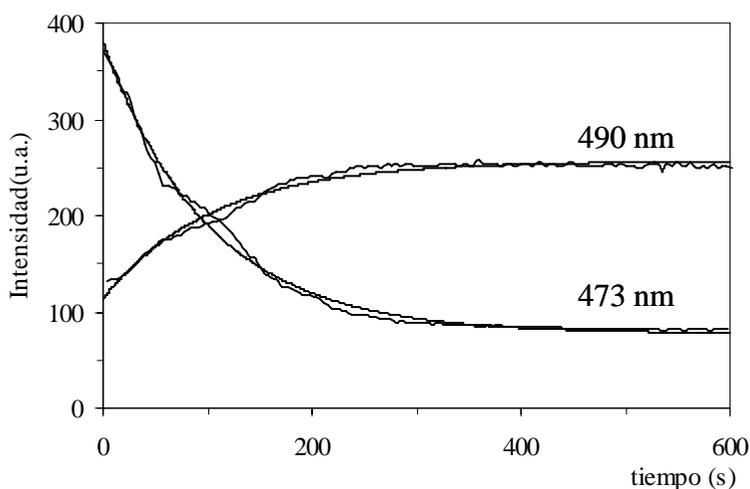
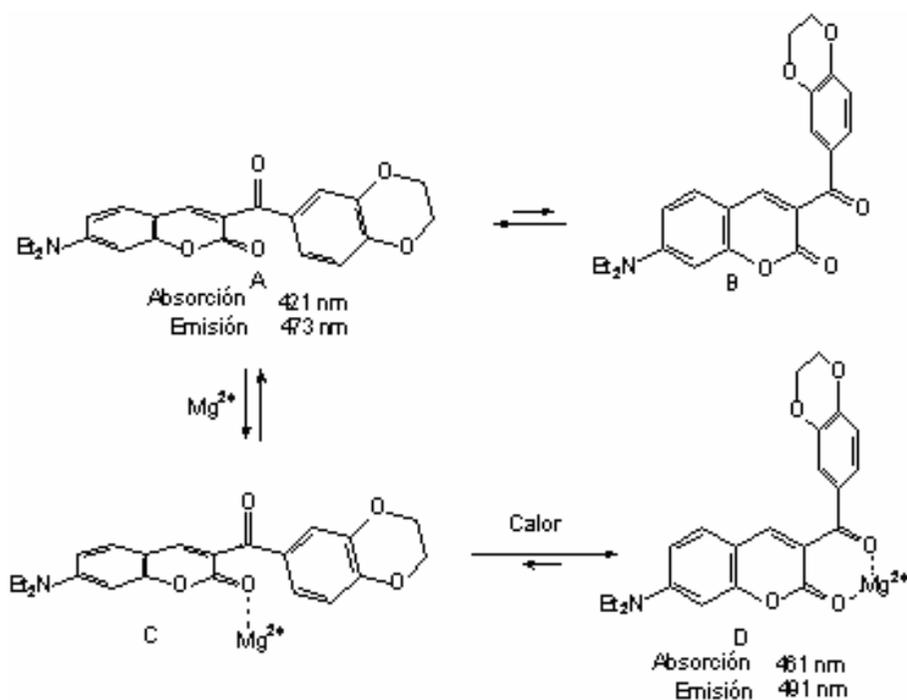


Figura 1.4. Evolución de la señal de fluorescencia de la cumarina libre (473 nm) y la complejada (491 nm) en la membrana inmediatamente después de equilibrarla con una disolución de Mg(II).



Esquema 1. Comportamiento conformacional de DEC.

Suponemos que cuando la cumarina se incorpora a la membrana, su equilibrio conformacional se bloquea y el conformómero A, el menos apropiado para la complejación, debe de ser la especie más abundante. El limitado desarrollo inicial del color, podría ser debido a la relativamente pequeña proporción del conformómero B, que es el más adecuado para la complejación. Aunque el complejo D debe de ser mucho más estable, el giro combinado de los grupos carbonilo fenona y fenilo necesarios para alcanzar la disposición paralela apropiada (B) de los grupos carbonilos para la coordinación con  $Mg(II)$ , debe de ser mucho más difícil en el medio viscoso de la membrana.

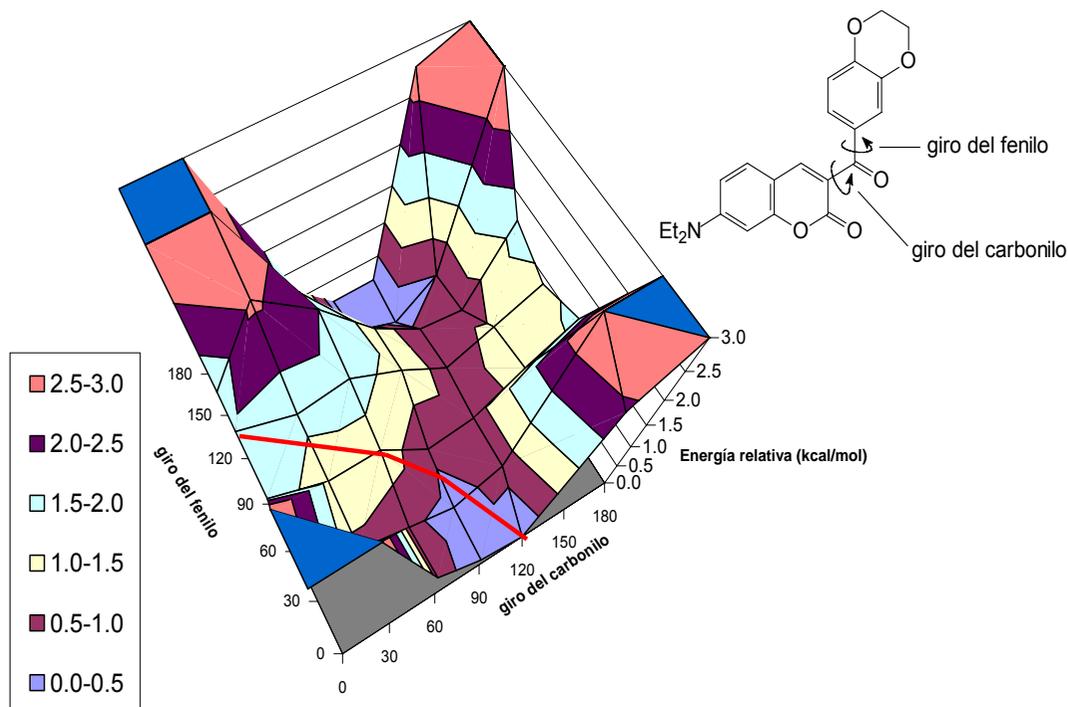


Figura 1.5. Análisis conformacional de la cumarina. Cálculos AM1 semiempíricos.

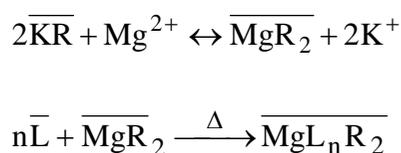
En la trayectoria indicada en la Figura 1.5 hay que sobrepasar una energía de activación de 1,5-2,0 kcal/mol (zonas granate, amarilla y azul claro) (Energía predicha por los cálculos AM1 para la molécula sola). Esa energía es la que debe superarse con el calentamiento. Una vez formado el complejo, la situación es excepcionalmente estable y, por tanto, irreversible. Esta situación, en presencia del metal, no puede simularse, al menos con los programas de cálculo que se han usado. Una vez que el complejo se ha formado, la situación es bastante estable, y por tanto, irreversible. La Figura 1.5 representa el perfil de energía 3D al girar de forma combinada los grupos carbonilo y fenilo indicados.

Los mínimos de energía se predicen en el punto en que los planos de los dos grupos carbonilo están a 120° aproximadamente (zonas de color azul-malva),

muy lejos de la posición paralela adecuada para la coordinación del  $Mg^{2+}$ . En esa disposición el fenilo permanece coplanar ( $0^\circ$  ó  $180^\circ$ ) con el grupo carbonilo. Para conseguir la disposición paralela de los carbonilos, en la molécula debe producirse un giro combinado del carbonilo y del fenilo, según la trayectoria (línea roja) indicada en el gráfico 3D. A medida que los carbonilos se hacen coplanares, el grupo fenilo abandona la coplanaridad para minimizar interacciones estéricas.

El mecanismo de sensado de este sensor de un solo uso implica un proceso en dos pasos: 1) captura de  $Mg(II)$  de la disolución por cambio iónico con el intercambiador iónico dentro de la membrana de PVC plastificado, estando la reacción limitada por la cantidad de cromoióforo L y 2) reacción de  $Mg(II)$  con la cumarina concomitante al calentamiento la membrana, siendo irreversible el proceso completo. Para dotar a la membrana de propiedades de cambio iónico se incorpora en la membrana una sal alcalina de un anión altamente lipófilico  $R^-$ .

Si asumimos que el cromoióforo forma un complejo con magnesio de estequiometría 1:p (M:L), se cumple el equilibrio siguiente dando como resultado una transferencia de masa del  $Mg(II)$  al interior de la fase orgánica de la membrana:



En dicho equilibrio las especies barradas indican que se encuentran en la fase membrana, mientras que el  $Mg(II)$  se encuentra en disolución. El parámetro de respuesta de este sensor de un solo uso es el grado de protonación  $\alpha$ , definido como  $[C]/C_L$ , medido por la absorbancia de la forma protonada del cromoióforo, el cual es la especie ópticamente medible de la membrana, como una absorbancia normalizada<sup>21</sup>. Este valor  $\alpha$  se relaciona con la constante de

coextracción  $K_e$ , con la concentración analítica del cromoionóforo  $C_L$  y la actividad del magnesio a través de la función de respuesta:

$$a_{Mg^{2+}} = \frac{1}{K_e} \frac{(1-\alpha)C_L}{(C_L - p(1-\alpha)C_L)^p} \quad (\text{ec.1.2})$$

### 3.1. Optimización de la respuesta del sensor desechable

Los factores que controlan la respuesta de este sensor desechable se pueden agrupar en dos bloques: a) aquellos relacionados con el diseño y composición de la membrana, tales como componentes de membrana y las condiciones empleadas para la preparación de la misma; y b) aquellos parámetros relacionados en la reacción con el analito, tales como, pH, tiempo de contacto, tiempo de calentamiento y la actividad del Mg(II).

#### 3.1.1. Optimización de la composición de la membrana

El plastificante presente influye considerablemente en la respuesta de la membrana para magnesio, la velocidad de respuesta y la selectividad. Para seleccionar el plastificante, se estudió la reacción con calcio y magnesio. Fueron ensayados cinco plastificantes diferentes, provenientes de diferentes grupos como son éteres, ésteres fosfato y ésteres de ácidos carboxílicos, en concreto: tributilfosfato (TBP), o-nitrooctilfeniléter (NPOE), bis(2-etilhexil)sebacato (DOS), dioctilftalato (DOP) y tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP). Para seleccionar el plastificante, se prepararon membranas conteniendo cada uno de los plastificantes y manteniendo una composición fija del resto de los reactivos. Todos ellos contenían 33% de PVC, 65% en peso del plastificante correspondiente, 0,10 mg de cromoionóforo y una cantidad de sal lipofílica en relación molar 1:4 con el cromoionóforo, todo ello disuelto en 1,0 mL de THF recién destilado. Las

proporciones de partida seleccionadas fueron las habituales en estudios de este tipo<sup>22</sup>. Con 20  $\mu\text{L}$  de cada cóctel se prepararon diferentes membranas, según se indica anteriormente. A continuación, se puso cada una de las membranas en contacto con disoluciones  $1 \cdot 10^{-3}$  M de magnesio, estudiando además la reacción con ión calcio a la misma concentración, a pH 8 con Tris, registrando la variación de absorbancia a 460nm.

Encontramos como resultado que tanto NPOE como DOP, ocasionaron mayor respuesta para Ca(II) que para Mg(II). DOS respondía de forma similar para ambos cationes sin discriminar entre ellos. TEHP exhibía una respuesta extremadamente lenta para ambos iones alcalinos y finalmente con TBP, fue posible una buena discriminación entre ambos iones. Por tanto se eligió TBP como plastificante para siguientes experiencias.

La proporción óptima de TBP se estableció considerando: 1) su influencia sobre la selectividad con respecto a calcio, concomitante por estar presente en aguas naturales, 2) su influencia sobre la velocidad de respuesta y 3) sobre las propiedades físicas del sensor. Se observa que el porcentaje de TBP en la membrana tiene poca influencia en su selectividad con respecto a calcio (Figura 1.6.3). La velocidad de respuesta disminuye hasta un porcentaje del 66%, para a continuación aumentar debido al empeoramiento de las propiedades físicas de la membrana (adherencia, homogeneidad y tiempo de secado).

De las diferentes sales lipofílicas ensayadas, el tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio (TCFBK), fue la que mostró mejores resultados. La concentración de dicha sal y de cromoióforo fue optimizada usando un diseño de experimentos tipo Doehlert<sup>23</sup> asignando tres niveles a la sal lipofílica y cinco niveles al cromoióforo. La superficie de respuesta obtenida (Figura 1.7) no indica la presencia de ningún máximo, de acuerdo con el criterio de Lagrange, sino más bien un aumento de la señal con el aumento en la concentración de ambos reactivos en membrana. No obstante, la interferencia de Ca(II) aumenta con la concentración de reactivo, lo que

impone una restricción a la cantidad de reactivo en la membrana. Así, la optimización de las concentraciones de sal lipofílica y del cromoionóforo fue estudiada de forma univariante, estudiando la interferencia de Ca(II) en cada caso. La Figura 1.6.1 muestra la dependencia de la señal con la concentración de cumarina en la membrana para Mg(II) y Ca(II), ilustrando el incremento de interferencia de Ca(II) con el aumento en la concentración de cumarina.

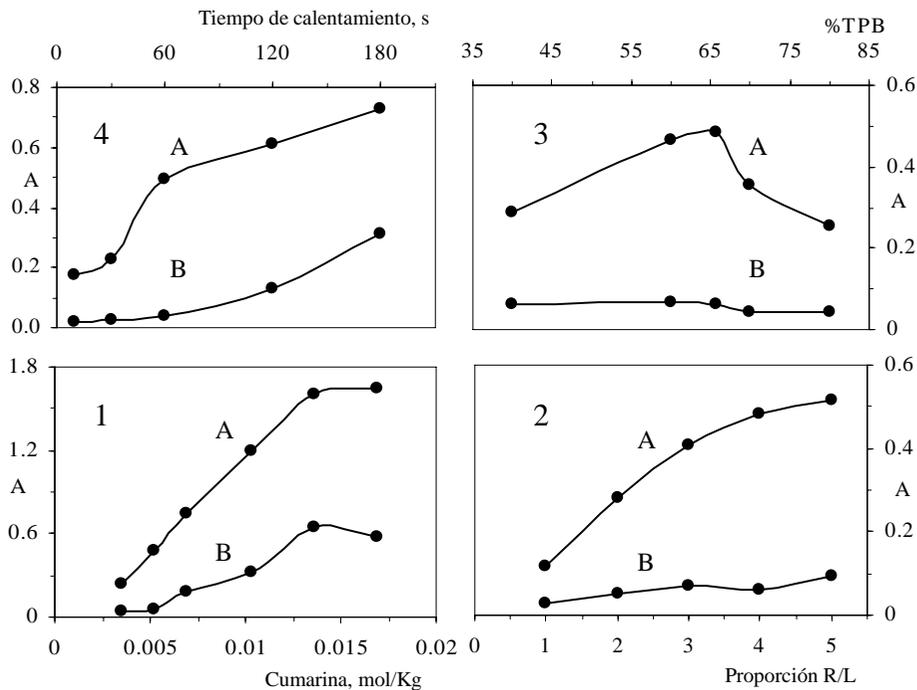


Figura 1.6. Influencia de las distintas variables en la respuesta del sensor de un solo uso: 1: Concentración de cromoionóforo; 2: Relación cromoionóforo/sal lipofílica; 3: porcentaje de plastificante; 4: Tiempo de calentamiento. A: reacción con Mg(II) ( $1 \cdot 10^{-3}$  M); B: reacción con Ca(II) ( $1 \cdot 10^{-3}$  M).

Se seleccionó como óptima, una concentración de  $6,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{Kg}^{-1}$ , con el propósito de minimizar la interferencia de calcio a expensas de producir un empeoramiento en la señal. La cantidad de sal lipofílica usada fue una relación molar de 1:4 con cromoionóforo/sal lipofílica debido a que se observa un incremento

en la señal analítica para magnesio y un descenso en la señal para calcio, como se muestra en la Figura 1.6.2.

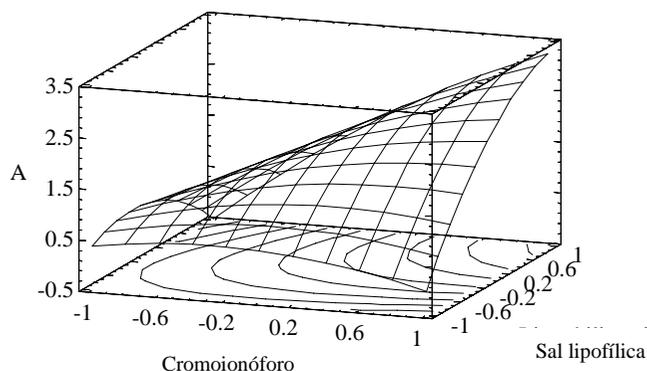


Figura 1.7. Superficie de respuesta obtenida de un diseño Doehlert para sal lipofílica y cromoniónóforo.

### 3.1.2. Optimización de los parámetros de reacción

Los parámetros estudiados relacionados con la fijación del analito en la membrana sensora son el pH, y el tiempo de contacto entre el sensor desechable y la disolución, tiempo de calentamiento, fuerza iónica y la actividad del Mg(II).

Se observó que la reacción tanto de Mg(II) como Ca(II) con la membrana de cumarina es prácticamente independiente del pH en un intervalo comprendido entre 6,5 y 9,0, lo que se podría haber supuesto considerando la estructura del cromoniónóforo, pero a partir de pH 8 la diferencia entre las señales de Ca(II) y Mg(II) aumentan un 15% (Tabla 1.1). Se ha seleccionado 8,0 como pH de trabajo y una disolución  $1 \cdot 10^{-2}$  M de Tris como tampón.

Como era de esperar, la fuerza iónica de la muestra influye sobre la respuesta del sensor. No obstante, los resultados experimentales muestran que la señal es independiente de la fuerza iónica, ajustada con NaCl, hasta  $10^{-2}$  M, para

decrecer exponencialmente a altas concentraciones de NaCl (un 5% de la señal a 0,1M y un 0,5% a 0,5M), probablemente debido a la competencia de sodio con el magnesio por los sitios iónicos de la membrana. El comportamiento para el ión calcio fue idéntico.

Tabla 1.1. Valores de los pH.

pH	A Mg(II)	A Ca(II)
6,5	0,597	0,073
7,0	0,585	0,061
7,5	0,618	0,083
8,0	0,677	0,081
8,5	0,644	0,070
9,0	0,683	0,094

A: Absorbancia

Para establecer el tiempo de respuesta se prepararon tres sensores con la composición óptima del cóctel y se pusieron en contacto con disoluciones de Ca(II) y Mg(II)  $10^{-3}$  M. Las condiciones operatorias fueron pH 8, 700 r.p.m. 1min de calentamiento después del equilibrado, estudiando distintos tiempos de reacción, siendo de 1, 3, 5, 7 y 10 min. Se estableció como tiempo de contacto óptimo 7 minutos. Los datos de dicha experimento se reflejan en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Valores obtenidos para los tiempos de agitación.

Tiempo Agitación (min)	A Mg(II)	A Ca(II)
1	0,307	
3	0,383	
5	0,411	
7	0,486	0,044
10	0,456	0,092

A: Absorbancia

Una vez seleccionado el tiempo de reacción, el siguiente paso de la optimización fue seleccionar la velocidad de agitación del agitador magnético. Para ello se prepararon tres membranas sensoras para cada una de las distintas

velocidades ensayadas, siendo éstas: 300, 500, 700, 900 y 1100 rpm. Se ensayaron con distintas disoluciones de Mg(II) y Ca(II)  $10^{-3}$  M a pH 8 ajustado con Tris  $10^{-2}$  M. El tiempo de agitación fue de 7 min y el tiempo de calentamiento 1 minuto. Como velocidad adecuada se escogió 900 rpm. Se observa un descenso en la señal a 1100 rpm debido a que se producía una pérdida de régimen laminar apareciendo por consiguiente un régimen turbulento. Los datos obtenidos para este experimento se muestran en la Tabla 1.3.

Tabla 1.3. Valores obtenidos para la velocidad de agitación.

rpm	A Mg(II)	A Ca(II)
300	0,311	
500	0,372	
700	0,394	0,049
900	0,483	0,072
1100	0,428	

A: Absorbancia

Estudios preliminares indican que el calentamiento de la membrana después del contacto con la disolución problema, incrementa considerablemente la extensión de la reacción. Considerando diferentes sistemas de calentamiento (horno, placa calefactora, aire caliente), los mejores resultados fueron obtenidos con aire caliente proveniente de un secador de pelo convencional de 1800 W, dispuesto a 10 cm por encima de la membrana y mantenido durante 1 minuto. De esta manera se incrementa la absorbancia en dos órdenes de magnitud (Figura 1.6.4). Desde el instante en que se deja de calentar el sensor, la absorbancia decrece hasta alcanzar un valor estable a los 45 segundos. Este proceso fue observado con cada nuevo ciclo de calentamiento.

La respuesta de las membranas desechables a la actividad del magnesio, se estableció a 20 diferentes niveles de actividades entre  $5 \cdot 10^{-2}$  y  $8,7 \cdot 10^{-8}$  (0.1 M y  $10^{-7}$  M en concentraciones) a pH 8,0 con 9 réplicas de cada una. La Figura 1.8 muestra la media de los valores experimentales sobre el modelo teórico sigmoideal (ec 1.2)

con una estequiometría  $p=1$ . Por otra parte, si ajustamos mediante mínimos cuadrados los puntos experimentales obtenidos en la zona de máxima pendiente entre  $2 \cdot 10^{-5}$  y  $4 \cdot 10^{-4}$  M (seis concentraciones diferentes con nueve réplicas para cada una) se obtiene un valor de  $\log K_e^{Mg^{2+}}$  de  $4,28 \pm 0,04$ .

### 3.2. Caracterización analítica y aplicaciones

Para establecer la influencia de la actividad del magnesio sobre la membrana desechable, se prepararon membranas con la composición antes señalada como óptima. Se fabricaron tres series de disoluciones patrón a pH 8,0, una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal (cinco patrones, nueve réplicas de cada uno) en un rango de actividades comprendido entre  $1,74 \cdot 10^{-5}$  y  $1,72 \cdot 10^{-4}$  en ( $2 \cdot 10^{-5}$  y  $2 \cdot 10^{-4}$  M en concentraciones); otra serie de disoluciones patrón en la zona de mínima pendiente del sigmoide con baja actividad (cinco patrones, nueve réplicas de cada uno) entre  $8,7 \cdot 10^{-8}$  y  $2,17 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $10^{-7}$  y  $2,5 \cdot 10^{-6}$  M en concentraciones); y finalmente otra en la zona de mínima pendiente con alta actividad (seis patrones con nueve réplicas de cada uno), en un rango de actividades comprendido entre  $8,4 \cdot 10^{-4}$  y  $5,3 \cdot 10^{-2}$  ( $10^{-3}$  y 0.1 M en concentraciones). La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste<sup>17</sup>.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, respectivamente:

$$1-\alpha = 0,4857 - 2,5869 \log a_{Mg^{2+}} \quad \text{Máxima pendiente} \quad (\text{ec.1.2})$$

$$1-\alpha = 0,0195 - 1,0303 \log a_{Mg^{2+}} \quad \text{Mínima actividad} \quad (\text{ec.1.3})$$

$$1-\alpha = 0,0165 - 0,1069 \log a_{Mg^{2+}} \quad \text{Máxima actividad} \quad (\text{ec.1.4})$$

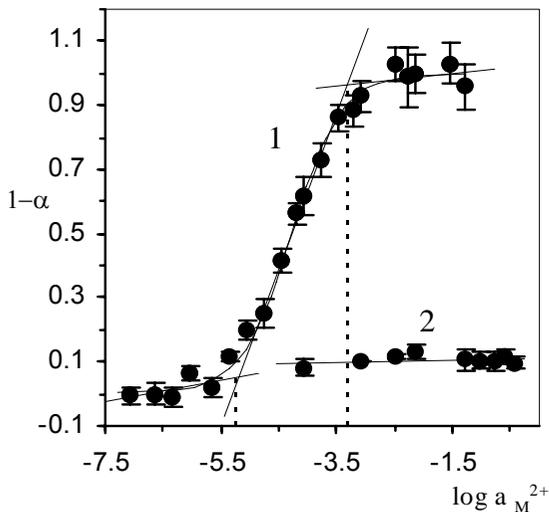


Figura1.8. Influencia de la actividad en magnesio sobre el parámetro analítico  $1-\alpha$ . 1: Actividad en Mg(II). 2: Actividad en Ca(II).

Para evaluar la precisión del procedimiento propuesto (expresada como desviación estándar relativa, DER) se realizó un estudio usando disoluciones de Mg(II) a tres niveles de actividad:  $8,69 \cdot 10^{-6}$ ,  $6,07 \cdot 10^{-5}$ ,  $0,34 \cdot 10^{-3}$  M ( $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $7 \cdot 10^{-5}$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$ , M en concentración) que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado diez veces. Para cada una de estas concentraciones sólo fue posible el estudio de precisión intermembrana, pues se trata de membranas irreversibles, por tanto de un solo uso. En la Tabla 1.4 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 1.4. Repetibilidad de las membranas reactivas para magnesio.

Actividad	Log $a_{Mg}$	DER (%)
Baja	-5,143 -5,057 -5,082 -5,065 -5,041 -4,994 -4,984 -5,141 -4,995 -5,024	1,13
Media	-4,176 -4,251 -4,163 -4,157 -4,158 -4,168 -4,217 -4,273 -4,307 Anómalo	1,34
Alta	-3,634 -3,657 -3,656 -3,455 -3,541 -3,435 -3,573 -3,483 -3,559 -3,556	2,24

Para conocer la selectividad del sensor desarrollado para magnesio frente a iones habitualmente presentes en aguas naturales o tratadas, se estudió de forma sistemática la respuesta frente a disoluciones de magnesio  $1,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  que contenían los iones más frecuentes en aguas. Para realizar dicho estudio se ensayaron diferentes concentraciones de especies potencialmente interferentes. Cuando se observó interferencia, se redujo la concentración de interferente hasta que el error en la determinación fue inferior al nivel de tolerancia calculado como intervalo de confianza para una concentración dada de  $1,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de magnesio, siendo este establecido como el intervalo de confianza definido como: respuesta predicha  $\pm t \cdot S_{R(1,7)}$ . Donde  $S_{R(1,7)}$  es la desviación estándar de 10 réplicas al nivel de concentración de magnesio de 1,7 ppm, siendo este valor igual a 0,02747 y  $t$ , es la  $t$  de student, siendo su valor de igual a 1,860 para  $n-2$  grados de libertad y un grado de libertad  $\alpha=0,05$ . Así pues y como la respuesta predicha fue de 0,538, resultó un intervalo de confianza entre 0,488 y 0,590.

Tabla 1.5. Efecto de Interferentes en la determinación de  $1,7 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de magnesio

Ión Interferente	Tolerancia ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
Na(I)	162,5
K(I)	289,3
Ca(II)	5,1
Sr(II)	10,0
Ba(II)	>100
Fe(III)	>10
Zn(II)	>50
$\text{NO}_3^-$	>100
$\text{SO}_4^{2-}$	>100
$\text{ClO}^-$	54,4
$\text{HCO}_3^-$	>100

Hemos usado este intervalo de confianza como referencia, de manera que la máxima concentración de especies interferentes que producen un valor más alto o más bajo a este intervalo fue tomado como el nivel de tolerancia. En la Tabla 1.5 podemos ver los valores de tolerancia encontrados para los diferentes iones

estudiados, siendo estos niveles de tolerancia suficientes para el análisis de magnesio en diferentes tipos de aguas.

Cabe reseñar que la interferencia de Ca(II) ( $5,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) es mayor que la que cabría esperar considerando por separado la respuesta de ambos iones alcalinotérreos (ver la función de calibrado para calcio en la Figura 1.8). Este efecto sinérgico se puede explicar considerando que la extracción de calcio por cambio iónico a la membrana podría ser más favorable que la de magnesio. Consecuentemente, aunque el magnesio es complejado más favorablemente que el calcio, a alta concentración de este último se induce un descenso en la reacción con magnesio. A pesar del incremento en la interferencia de calcio cuando esta mezclado con el analito, el nivel de tolerancia fue suficiente para las diferentes aplicaciones.

El rango dinámico lineal viene dado por la zona central de la curva de calibrado, la cual ha sido ajustada a una recta mediante un ajuste por medio de mínimos cuadrados, verificando su correcto ajuste al modelo lineal mediante la aplicación de un test de fallo de ajuste. El rango dinámico lineal está acotado por sendos límites inferior y superior y está comprendido entre  $0,14$  y  $14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  expresado en concentraciones ( $5.18\cdot 10^{-6}$  y  $4.58\cdot 10^{-4}$  en actividades).

El tiempo de vida de la membrana sensora desarrollada se ha establecida ensayando de forma periódica su capacidad de respuesta. Para ello, se preparó un conjunto de membranas reactivas con las que se procedió de la forma siguiente: se conservaron las membranas asiladas de la luz y evitando posible humedad. Con periodicidad se hicieron reaccionar en la zona media del rango lineal, concluyendo con un tiempo de vida de 3 semanas.

Tabla 1.6. Parámetros analíticos.

Parámetro	Valor; S	
Ordenada en el origen	2,5869; 0,0764	
Pendiente	0,4857; 0,0178	
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	0,9538	
Rango Lineal <sup>b</sup>	$5,18 \cdot 10^{-6} - 4,58 \cdot 10^{-4}$	
Límite de detección <sup>b</sup>	$5,18 \cdot 10^{-6}$	
DER (%) <sup>a</sup>	$8,69 \cdot 10^{-6a}$	1,1
	$6,07 \cdot 10^{-5a}$	1,3
	$0,34 \cdot 10^{-3a}$	2,2
Tiempo de vida (semanas)	3	

a: DER en  $\log a_{Mg^{2+}}$ ; b: actividades

Con el objetivo de comprobar la utilidad y validez del procedimiento propuesto se aplicó éste a muestras de agua de diversa procedencia (mineral, manantial, de pozo y aguas de abastecimiento urbano), a horchata y a una bebida isotónica comercial. En la Tabla 1.7 observamos los valores obtenidos por el procedimiento propuesto y el de referencia, que es el de Espectrometría de Absorción Atómica. Los valores reflejados en dicha Tabla corresponden a la media de tres réplicas de cada muestra para cada uno de los métodos. También está incluida la desviación estándar de estas réplicas así como el valor P del test de comparación de medias, quien nos indica que, en todos los casos no existen diferencia significativa entre los resultados obtenidos mediante la membrana desechable caracterizada y los obtenidos mediante el método de referencia, pues en todos los casos el valor  $P_{value} > 5\%$ .

Tabla 1.7. Determinación de magnesio en diferentes tipos de agua usando AAS como método de referencia.

<i>Muestra</i>	<i>Membrana desechable (mM Mg)</i>	<i>S</i>	<i>EAA (mM Mg)</i>	<i>S</i>	<i>Pval (%)</i>
Agua mineral (Solán de Cabras)	0,84	0,09	0,953	0,021	10,7
Agua mineral (Sierras de Jaén)	0,65	0,26	0,652	0,009	98,7
Agua mineral (Bonaqua)	0,85	0,11	0,997	0,032	8,5
Agua mineral (Lanjarón)	0,30	0,02	0,293	0,004	76,2
Horchata (Che, Puleva)	2,04	0,03	2,118	0,085	19,1
Bebida isotónica (Isostar)	5,64	0,22	5,867	0,071	16,3
Agua urbana (Granada)	0,28	0,08	0,288	0,002	89,8
Agua urbana (La Línea, Cádiz)	0,11	0,05	0,178	0,001	5,3
Agua urbana (Ogíjares)	0,86	0,05	0,871	0,012	60,9
Agua urbana (Viznar)	0,71	0,04	0,775	0,005	5,4
Agua urbana (Monachil)	0,92	0,09	0,993	0,005	20,8
Agua urbana (Huetor Santillán)	0,78	0,10	0,854	0,005	30,2
Agua urbana (Carchuna)	1,58	0,17	1,588	0,014	95,3
Agua urbana (Armillá)	0,27	0,02	0,290	0,007	12,7
Agua de fuente (LaPeza)	0,99	0,09	1,102	0,005	8,2
Agua de fuente (Morollón)	1,12	0,22	1,205	0,014	54,8
Agua de pozo (Otura)	2,57	0,06	2,668	0,029	6,3

#### 4. Conclusiones

Se ha desarrollado un sensor desechable óptico para la determinación de magnesio basado en una cumarina como cromoforo, preparada en una membrana transparente que funciona por un mecanismo de cambio iónico, utilizando la absorbancia como señal analítica de fácil medida. El sensor de un solo uso descrito permite determinar magnesio en aguas y puede ser aplicado satisfactoriamente a la determinación de este ión en aguas de diferente procedencia. El tiempo de vida de este sensor desechable es de tres semanas en condiciones normales cuando esta protegido de la luz. Una desventaja de este sensor desechable es el relativamente largo tiempo de respuesta que es de 6 minutos, siendo una clara ventaja su bajo coste (alrededor de 25€/g de cumarina).

## 5. Bibliografía

1. Masilamani, Divakaran, Lucas, Mariann Elizabeth, and Hammond, George Simms. Ionophores comprising an ion-recognizing system fused to a signal moiety as reagents for detecting ions. Allied-Signal, Inc. WO Patent 8 900 997, 1988.
2. Bentsen, James G., Chou, Shih hung, Cross, Elisa M., Halverson, Kurt J., Trend, John E., Kipke, Cary A., Yafuso, Masao, and Patil, Sanjay L. Cation-sensing composite structure and compounds for use therein. Minnesota Mining and Manufacturing Co., US Patent. US 5,958,782. 1997.
3. Chawla, H. Mohindra; Srinivas, K. *J.Indian Inst.Sci.* 1994, *74*, 515-18.
4. Badaoui, Fatima Zohra; Bourson, Jean *Anal.Chim.Acta* 1995, *302*, 341-54.
5. Bourson, J.; Badaoui, F.; Valeur, B. *J.Fluor.* 1994, *4*, 275.
6. Brunet, E.; Garcia-Losada, P.; Rodriguez-Ubis, J. C.; Juanes, O. *Can.J.Chem.* 2002, *80*, 169-74.
7. Habib Jiwan, J. L.; Branger, C.; Soumillion, J.-P.; Valeur, B. *J.Photochem.Photobiol.A* 1998, *116*, 127-33.
8. Brunet, E.; Alonso, Maria T.; Juanes, Olga; Sedano, Rosa; Rodriguez-Ubis, Juan C. *Tetrahedron Letters* 1997, *38*, 4459-62.
9. Taziaux, D.; Soumillion, J. Ph; Habib Jiwan, J. L. *J.Photochem.Photobiol.A* 2004, *162*, 599-607.
10. Steinman, G. D. Process for measuring magnesium in biological fluids. [US 5,397,710]. 1995.
11. Smith-Lewis, M. J., Mauck, J. C., and Toner, J. L. Analytical element and method for determination of magnesium ions. Eastman Kodak Company. [US 4,753,890]. 2004.
12. Tanaka, M., Arai, F., Terashima, K., and Yaginuma, N. Method of preparing integral multilayer analytical element. [US 4,966,784]. 1990.
13. Merck. Reflectoquant. Magnesium in milk. 2004.
14. Gantzer, M. L., Hemmes, P. R., and Wong, D. Ion test having a porous carrier matrix. [US 4,670,218]. 1987.

15. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
16. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* 1992, 266, 73-87.
17. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* 2002, 451, 231-41.
18. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* 1982, 136, 363-68.
19. Alonso, Maria Teresa; Brunet, Ernesto; Juanes, Olga; Rodriguez-Ubis, Juan Carlos *J.Photochem.Photobiol.A* 2002, 147, 113-25.
20. Negishi, Takayuki; Nakatani, Kiyoharu *Phys.Chem.Chem.Phys.* 2003, 5, 594-98.
21. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* 1997, 97, 3083-132.
22. Tan, S. S. S.; Hauser, P. C.; Wang, K.; Fluri, K.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Suter, G.; Krüttli, M.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* 1991, 255, 35-44.
23. Hu, Y.; Massart, D. L. *J.Chromatogr.* 1989, 458, 311.



## **CAPÍTULO 4**

# **SIMPLIFICACIÓN DEL PROCESO DE MEDIDA. INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL**



## **SIMPLIFICACIÓN DEL PROCESO DE MEDIDA. INSTRUMENTACIÓN PORTÁTIL.**

### **Resumen**

Se presenta un fotómetro portátil para la determinación de potasio mediante sensores de un solo uso. Dicho equipo puede ser aplicado de forma rutinaria al análisis de aguas y bebidas. El sensor de un solo uso se basa en una química ionóforo-cromóforo. El cambio de color de la zona sensora es detectado mediante la medida de la intensidad transmitida con un fotodetector de estado sólido. La excitación óptica a 660 nm se realiza con un LED (*Light Emitting Diode*) o diodo emisor de luz. Para mejorar la estabilidad del sistema se ha incluido realimentación negativa para la polarización del LED y corrección térmica. Además, se presenta una simplificación del procedimiento de medida para poder utilizar el fotómetro portátil *in situ*, obteniendo resultados en tiempo real, siendo caracterizado y validado dicho procedimiento. Esta simplificación se basa en la preparación previa del sensor de un solo uso en su forma ácida, usando una relación de absorbancias como parámetro analítico. Sólo hay un requerimiento para el análisis consistente en la equilibración previa del sensor con la disolución de la muestra tamponada con un pH apropiado durante tres minutos y midiendo la absorbancia de la zona sensora después de este tiempo.

Se ha conseguido buena sensibilidad en el rango de concentración comprendido entre 5  $\mu\text{M}$  y 100 mM junto con una buena repetitividad y estabilidad, comparable con los resultados obtenidos utilizando instrumentación analítica de sobremesa. El resultado es un equipo portátil, compacto, de bajo peso, de respuesta rápida y bajo consumo de energía. Siendo este un sistema de medida conveniente para la determinación de potasio *in situ*.

## 1. Introducción.

La instrumentación analítica dedicada ha llegado a ser cada vez más útil en una amplia variedad de situaciones relacionadas con la monitorización del medio ambiente y de procesos, en el diagnóstico médico, en la detección de explosivos, en emergencias químicas, etc. Hoy día una propiedad muy deseable que este tipo de instrumentación es la posibilidad de obtener resultados *in situ* y en tiempo real. Por esta razón, el desarrollo de instrumentación analítica portátil es una de las principales tendencias tecnológicas en esta área. Además del desarrollo del equipamiento, los investigadores deben desarrollar métodos y procedimientos para su uso en el campo, lo que Overton ha denominado en inglés *fieldable*<sup>1</sup>, junto con los apropiados métodos de muestreo.

Este trabajo se centra en el análisis por medida de absorción de radiación con sensores de un solo uso procesados con instrumentación optoelectrónica. Presentamos un fotómetro de campo que lleva a cabo el análisis en tiempo real y es portátil. Esta instrumentación presenta ventajas en tres aspectos instrumentales complementarios e interrelacionados: 1) el elemento de reconocimiento, 2) diseño electrónico del procesamiento de la señal y 3) aplicación del proceso de medida.

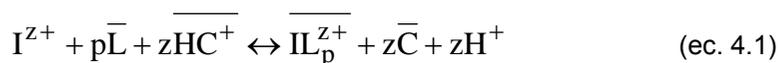
El uso de LEDs ha sido ampliamente estudiado y aplicado en estos tipos de instrumentos<sup>2,3</sup> como fuentes de luz cuasimonocromáticas para la excitación del sensor junto con fotodetectores de estado sólido (PD) para medidas de absorbancia. Con una adecuada polarización y circuitos de soporte, bajo consumo de energía, un diseño robusto y compacto, la estabilidad y sensibilidad de estos dispositivos optoelectrónicos han mostrado ser adecuados para alcanzar la deseada exactitud analítica. Al mismo tiempo, se han incluido microcontroladores potentes aunque de bajo costo como unidad de control de procesos en una instrumentación portátil y de mano<sup>3-9</sup>. Estos circuitos electrónicos pueden ser programados con los algoritmos de medida y funciones de calibración necesarias para la completa operación del instrumento, dando el resultado numérico en una

pantalla de cristal líquido al final del proceso de medida. Para muchas aplicaciones, el procesado de datos mediante computador personal se puede eliminar mediante esta solución compacta. Su memoria interna, versatilidad de programación, posibilidad de múltiples interfaces y funcionamiento con bajo consumo energético hace posible el diseño de instrumentación de bolsillo con unos bajos requerimientos de energía que se cubren satisfactoriamente con baterías pequeñas. En resumen, elementos voluminosos tradicionalmente incluidos en instrumentación analítica de laboratorio, tales como lámparas incandescentes, tubos fotomultiplicadores y computadores, pueden ser sustituidos por LEDs, PDs y microcontroladores en algunas aplicaciones con rangos de resolución y exactitud intermedios.

Los procedimientos de medida han progresado en estrecha relación con el desarrollo de la electrónica. Estos progresos incluyen técnicas de doble haz para interferencias ópticas, fuentes de luz moduladas con detección *lock-in* para mejorar la relación señal ruido<sup>10;11</sup> e incluso procesado de señal por transformada de Fourier rápida<sup>12</sup>. Han sido también usados métodos de calibración multivariada para instrumentos con multisensores<sup>13;14</sup>. También son importantes dentro de éste contexto, los parámetros analíticos del sensor y las condiciones de medida en el instrumento.

Los sensores desechables se pueden considerar como una clase de métodos de ensayo en análisis químico para obtener información química de forma rápida, simple y barata. Existen muchas y diferentes aproximaciones para este tipo de dispositivo que provienen de diferentes campos, sin embargo todas ellas comparten la necesidad de sistemas analíticos rápidos que sean independientes de los usuales requerimientos para un análisis. Entre las ventajas deseables de los sensores desechables se encuentran su corto tiempo de análisis, facilidad de manejo, bajo precio y costos de mantenimiento, ausencia de reactivos líquidos, sin necesidad de personal cualificado, ni necesidad de transportar las muestras al laboratorio o almacenar grandes volúmenes de muestras, ausencia de desechos con lo que se es respetuoso con el medio ambiente<sup>15</sup>.

Con respecto al fundamento de la respuesta del detector, se han desarrollado diferentes estrategias de reconocimiento para iones, de los cuales son notables los basados en interacciones huésped-anfitrión, tales como las usadas en sensores completos basados en portadores. Los sensores basados en un segundo componente funcionan en base a un intercambio iónico o coextracción entre un fase orgánica completa, constituida por una membrana de PVC plastificado y una fase acuosa, que responden a la actividad del ión objetivo<sup>16;17</sup>. En el caso de analitos catiónicos tales como  $I^{z+}$ , el principio de operación es el cambio iónico y la membrana de PVC plastificado contiene el ionóforo selectivo L, un cromoióforo selectivo a protones C, y, habitualmente, una sal alcalina de un anión muy lipofílico  $R^-$  incorporado por razones de electroneutralidad.



La relación de actividades de los iones  $a_{I^{z+}} / a_{H^+}^z$  en fase acuosa está relacionada con la constante global de equilibrio  $K_e^{IL_p}$  y al grado de protonación del cromoióforo  $1-\alpha$  a través de una función de respuesta sigmoideal implícita:

$$a_{I^{z+}} = \frac{1}{K_e^{IL_p}} \left( \frac{a_{H^+} \alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{C_R - (1-\alpha)C_C}{z \left( C_L - \frac{p}{z} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \quad (\text{ec. 4.2})$$

donde  $C_L$ ,  $C_C$  y  $C_R$  son las concentraciones analíticas del ionóforo, cromoióforo y de la sal lipofílica, respectivamente.

El parámetro analítico, proveniente del cambio en la propiedad óptica de los sensores completos es el grado de protonación  $1-\alpha$ , definido como el cociente de la concentración de cromoióforo protonado a su concentración analítica  $C_C$ ,

obtenida de las medidas de absorbancia<sup>18;19</sup> o fluorescencia<sup>20</sup>. Así, en el caso de medidas de absorbancia, donde  $A$  es la absorbancia del cromoióforo en la membrana para un equilibrio dado, y  $A_{\text{HC}^+}$  y  $A_{\text{C}}$  son los valores de absorbancia del cromoióforo completamente protonado y desprotonado, respectivamente:

$$1 - \alpha = \frac{[\text{HC}]}{[\text{C}]_0} = \frac{A - A_{\text{C}}}{A_{\text{HC}^+} - A_{\text{C}}} \quad (\text{ec.4.3})$$

Alternativamente, se han utilizado otros parámetros analíticos para la calibración en lugar del valor normalizado  $1-\alpha$ , como tal es el valor directo de absorbancia<sup>21</sup>, reflectancia<sup>22</sup> o intensidad de fluorescencia<sup>23</sup>.

El uso de señales normalizadas o relativas es más conveniente para la medida y calibración de sensores, aunque implica la medida de señales ópticas relacionadas con las especies completamente protonadas y desprotonadas, además de la señal proveniente de la muestra o del patrón. En el caso del formato desechable para este tipo de sensores, el uso de señales normalizadas es engorroso y requiere la obtención de diferentes medidas con el mismo sensor previa equilibración con diferentes disoluciones: i) HCl; ii) NaOH para la señal óptica del cromoióforo completamente protonado y desprotonado y iii) el problema o el patrón en tampón para la correspondiente señal intermedia. Sería conveniente una forma de medida más sencilla.

En este estudio, hemos desarrollado un fotómetro de campo portátil donde todos sus componentes, desde el sensor desechable hasta la electrónica de procesamiento de la señal, ha sido diseñada con el propósito de aplicarlo a un nuevo procedimiento de medida para determinar potasio en aguas naturales y bebidas de forma simple y con la suficiente sensibilidad y repetitividad para usarlo en medidas *in situ* de bajo coste. Hemos utilizado un sensor desechable para la determinación de potasio previamente desarrollado y caracterizado por nosotros<sup>24</sup>.

Este instrumento junto con la técnica aquí desarrollada se puede extender directamente a la determinación de otras especies químicas.

## 2. Experimental

### 2.1. Reactivos y materiales

La disolución madre de KCl (1,000 M) se preparó en agua por pesada exacta de KCl de grado analítico (Aldrich, Steinheim, Alemania). Disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución adecuada con agua. Otros reactivos y materiales usados fueron: láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK). Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua utilizada procedía de un equipo de ósmosis inversa (Milli-Ro 12 acoplado a un equipo Milli Q de Millipore Co. (Bedford, MA, EE.UU.). Como disolución reguladora se empleó tris(hidroximetil)aminometano 0,1 M, preparado a partir de Tris y de HCl suministrados por Sigma (Sigma-Aldrich Química S. A., Madrid).

Para preparar las membranas sensoras se ha utilizado PVC de alto peso molecular, nitrofeniloctileter (NPOE), éter dibenzo 18-corona-6 y tetrahidrofurano (THF), todos ellos proporcionados por Sigma y tetrakis(4-clorofenil)borato de potasio (TCFBK) suministrado por Fluka (Fluka, Madrid, España). El cromoióforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina fue sintetizado, purificado y caracterizado por nosotros<sup>25</sup>.

### 2.2. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida

Las membranas se fabricaron sobre un soporte de poliéster empleando la técnica de recubrimiento giratorio<sup>18</sup>. Las mezclas para la preparación de las membranas sensibles a potasio se hicieron a partir de una disolución que contenía

26 mg de PVC (28% p/p), 1,1 mg de TCFB (1,18% p/p), 1,3 mg de ionóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina (1,46% p/p), 0,8 mg de éter dibenzo-18-coro-6 (0,86% p/p) y 63,5 mg NPOE (68,5% p/p) que se disuelven en 1,0 mL de tetrahidrofurano recientemente destilado en un vial de vidrio.

Los sensores desechables fueron preparados depositando 20  $\mu\text{L}$  de esta mezcla sobre una lámina de poliéster de 14 mm  $\times$  40 mm  $\times$  0,25 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas rotando a 180 rpm<sup>18</sup>. Tras dejar girando durante 30 segundos, se extrajo la membrana del sistema centrífugo de preparación de membranas y se dejaron secar en un desecador con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 1 minuto a temperatura ambiente. La zona sensora del sensor desechable es una película circular de 6 mm de diámetro, transparente, de color rojo, con un espesor calculado de 4,7  $\mu\text{m}$ . La concentración de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico en el sensor seco es de 24,2 mmol $\cdot\text{kg}^{-1}$ , 24,2 mmol $\cdot\text{kg}^{-1}$  y 24,2 mmol $\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente.

Además preparamos una serie de membranas con un tratamiento adicional que consistía en sumergirlas por 5 minutos en una disolución 10<sup>-2</sup> M HCl, para conseguir el cambio de color a su forma ácida. Dichos sensores así preparados, fueron almacenados protegidos de la luz y en una atmósfera inerte de nitrógeno, presentando así un tiempo de vida de por lo menos 2 meses.

### 2.3. Procedimiento experimental

Nuestro propósito para el diseño del instrumento de medida fue obtener: 1) alta inmunidad ante el ruido óptico y eléctrico, 2) electrónica simple, 3) baja potencia de operación y 4) un instrumento compacto y fiable la determinación del analito en el campo, fuera del laboratorio.

Para realizar esto, la membrana transparente desechable, descrita en los apartados anteriores, se insertó en la ranura de la instrumentación electrónica

portátil. Nuestro diseño se basa en un microcontrolador de bajo consumo como unidad de control. Este microcontrolador es el que controla la señal de excitación y la detección de las señales ópticas, incluyendo el algoritmo para el procesamiento de la señal y control de todas las interfaces del instrumento, tales como la pantalla de visualización, teclado y puerto serie para la comunicación con un computador al objeto de facilitar el diseño y el proceso de calibración. Además, se ha habilitado su función en modo de bajo consumo para ahorro de energía. El instrumento desarrollado es portátil y la concentración del analito se puede leer directamente en la pantalla. El instrumento tiene la circuitería necesaria para la gestión de la energía con una batería PP3 de 9 V o de un adaptador AC/DC estándar.

Las dimensiones y el peso son 134x135x45 mm y 440 g (sin la batería), respectivamente. En la Figura 2.1 se muestra el diagrama de bloque funcional del sistema electrónico, mostrando sus diferentes módulos: módulo del sensor incluyendo los circuitos de acondicionamiento, el sistema de reloj, el microcontrolador, los circuitos de gestión de energía y las interfaces. En el módulo del sensor, basado en un canal de medida de haz único, la membrana desechable se ilumina mediante un diodo emisor de luz roja LED ultrabrillante con máxima emisión a 660 nm. La Figura 2.2 muestra, para mejorar la estabilidad en la intensidad de la luz, que el LED se polarizó con un circuito para realimentación negativa<sup>26</sup>. La luz incidente del LED es dividida en dos haces mediante un divisor de haz. Con un 10% de la intensidad total, uno de los haces es directamente recogido por un fotodetector y un convertidor intensidad-voltaje controla el circuito de polarización LED. El otro 90% de la intensidad de la luz incidente es la encargada de iluminar el sensor desechable. La intensidad de luz transmitida por la membrana desechable, es recogida mediante otro fotodiodo y procesada por otro convertidor intensidad-voltaje. El voltaje que resulta, es convertido en una palabra digital mediante el convertidor analógico-digital de 10 bits incluido en el microcontrolador y es procesada digitalmente.

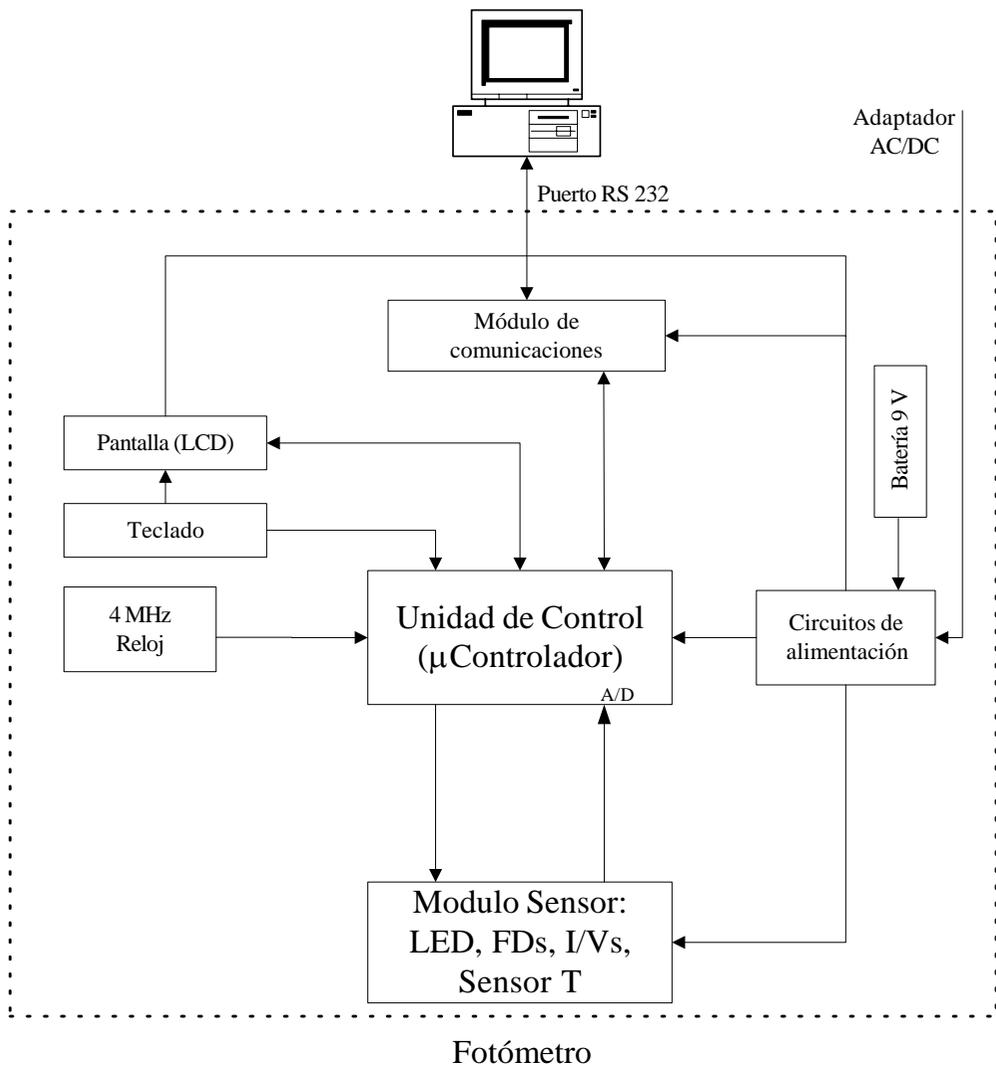


Figura 2.1. Diagrama de bloques del fotómetro portátil.

Se prestó especial atención a la deriva térmica y a la estabilidad del fotómetro. Por esta razón, una referencia de voltaje con un coeficiente térmico muy bajo, fue incluida en el circuito de polarización del LED, para reducir al mínimo la deriva térmica del instrumento. En todo caso, se ha incluido un sensor de temperatura con salida digital, para monitorización térmica y subsiguiente

corrección de la influencia de la temperatura sobre la respuesta del instrumento. Además, la temperatura es mostrada en la pantalla de visualización del prototipo. Este punto se analizará de forma exhaustiva más adelante en la sección de *Resultados y Discusión*. Además, para evitar efectos transitorios iniciales cuando se enciende el LED, dicha fuente de luz se activa 10 ms antes del proceso de adquisición. Además, cada transmitancia final resultante se calcula haciendo un promedio de 1024 medidas para una mejor relación señal-ruido, por lo que finalmente resulta un tiempo total de adquisición de 1 segundo.

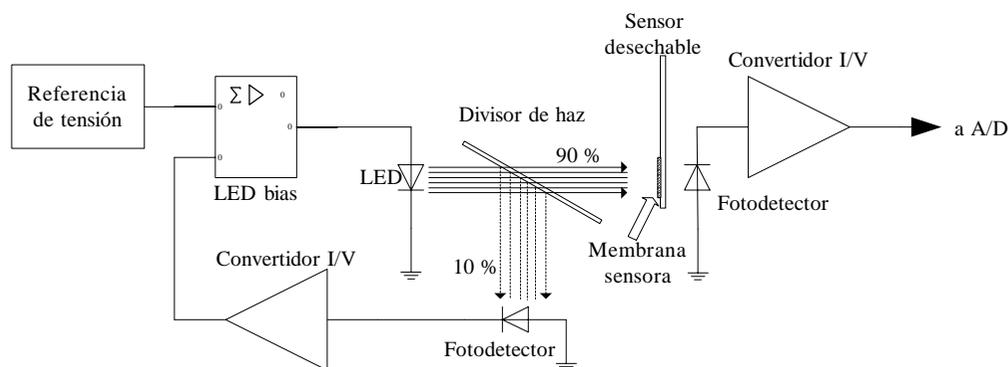


Figura 2.2. Esquema del módulo sensor, mostrando el proceso análogo completo.

## 2.4. Condiciones de medida

La respuesta del sensor desechable se evaluó, añadiendo 8 mL de la disolución problema en un tubo de polietileno de 10x1,5 cm. conteniendo 2 mL de disolución tampón 0,1M de Tris de pH 9,0. El sensor desechable fue introducido durante 5 minutos en este tubo de plástico sin agitación. Después de la equilibración, la membrana se saca de la disolución y se limpia para evitar cualquier gota de disolución. Finalmente se inserta dentro de la ranura del fotómetro portátil.

Para obtener el valor de la absorbancia  $A$  ( $\log I_0/I$ ) en el fotómetro portátil, se aplicó el siguiente método a cada membrana individual. La intensidad incidente  $I_0$ , se obtuvo midiendo la lámina de Mylar, mientras que la intensidad transmitida  $I$  fue medida con el sensor desechable ya preparado. Todas las medidas fueron corregidas térmicamente monitorizando la temperatura ambiente con el sensor de temperatura incluido en el fotómetro.

Para validar el procedimiento de medida y evaluar la eficiencia del instrumento portátil, las membranas desechables de potasio también fueron medidas usando un espectrofotómetro de diodos en fila de Hewlett-Packard (modelo: 8453; Nortwalk, CT, EE.UU.) equipado con un soporte metálico de 44 mm de alto y 12 de fondo, pintado en negro mate que se sitúa en el compartimento de cubetas<sup>27</sup>. Para corregir la absorbancia de fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar. Además, los valores de absorbancia obtenidos a 660 nm fueron corregidos restando la absorbancia a una longitud de onda larga (800 nm) donde no absorbe el cromóforo, como es habitual en este tipo de sensores<sup>15</sup>. Todas las medidas se realizan a temperatura ambiente y las membranas desechables no fueron acondicionadas antes de su uso.

### **3. Resultados y discusión**

En esta sección se discute el parámetro analítico que ofrece los mejores resultados para el uso de la instrumentación portátil in situ, con un tiempo de análisis pequeño. También son llevados a cabo la caracterización instrumental y su aplicación a diferentes tipos de muestras.

#### **3.1. Procedimiento de medida**

Para simplificar la metodología analítica y disminuir el tiempo de análisis, en

el sentido de eliminar algunas de las disoluciones de calibración (HCl, NaOH o la disolución tampón) necesarias para el cálculo del parámetro analítico  $1-\alpha$ , estudiamos dos metodologías distintas: (1) mantener la absorbancia normalizada  $1-\alpha$  como parámetro analítico, pero considerando constantes algunos de los términos de absorbancia necesarios para su cálculo (ec.3); (2) usando un cociente de absorbancias  $A_{\text{patrón}}/A_{\text{referencia}}$  como parámetro analítico. Éste último se refiere a la relación de absorbancias de la membrana equilibrada con muestra o con disolución patrón de potasio  $A_{\text{patrón}}$  y la absorbancia de la membrana equilibrada con una disolución de referencia,  $A_{\text{referencia}}$ , en concreto NaOH, HCl o disolución tampón.

En el primer caso-  $1-\alpha$ , como parámetro analítico, estudiamos cómo es afectado su valor cuando alguno de los términos de absorbancia es constante. El valor  $\alpha$  usado en este caso es una absorbancia efectiva normalizada  $\alpha_{\text{ef}}$ , definida como

$$1 - \alpha_{\text{ef}} = \frac{A - A_{\text{NaOH}}}{A_{\text{Tampón}} - A_{\text{NaOH}}} \quad (\text{ec. 4.4})$$

donde  $A_{\text{NaOH}}$  y  $A_{\text{Tampón}}$  son valores de absorbancia medidos equilibrando el sensor con disoluciones  $10^{-2}$  M de NaOH y disolución tampón de pH 9, respectivamente. El uso del parámetro  $\alpha_{\text{ef}}$ , en lugar de  $\alpha$  es debido a que el cromoionóforo presente no se puede protonar de forma completa ( $1-\alpha \cong 0.9$ ) al pH de trabajo (9,0) debido al valor de su valor de  $\text{pKa}^{24}$ . De esta manera, utilizamos el valor de absorbancia de la membrana equilibrada con tampón, en lugar de la absorbancia de la membrana equilibrada en medio ácido  $A_{\text{HCl}}$ , como una medida del cromoionóforo en forma protonada, con el propósito de expandir esta absorbancia efectiva normalizada entre los valores de 0 y 1.

Aquí, hemos estudiado tres posibilidades: (a) manteniendo  $A_{\text{Tampón}}$  como un término constante; (b) manteniendo  $A_{\text{NaOH}}$  como un término constante; (c)

manteniendo ambos términos constantes. Para ello, 30 diferentes membranas desechables fueron preparadas y medidas utilizando ambos sistemas de medida para obtener los valores de absorbancia constantes mediante un promediado: (i) espectrofotómetro de diodos en fila [ $A_{\text{Tampón}} = 1,310$ , desviación estándar relativa DER= 4,30%;  $A_{\text{NaOH}} = 0,345$ ; el 3,64%] y (ii) con el fotómetro portátil [ $A_{\text{Tampón}} = 1,013$ , DER=3,61%;  $A_{\text{NaOH}} = 0,307$ , DER=3,53%]. Luego, cada membrana fue ensayada a siete niveles de concentraciones diferentes de potasio:  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ , y 0,1 M. La Tabla 4.1 muestra los valores promedio de  $1-\alpha_{\text{ef}}$  junto con las DER para cada nivel de concentración obtenidos en los cuatro casos estudiados: los casos a, b y c anteriores más los obtenidos con cada valor individual de  $A_{\text{NaOH}}$ ,  $A_{\text{Tampón}}$  y  $A_{\text{Patrón}}$ . Para las medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila, la precisión mejora una media de un 2% cuando el fondo, medido a 800 nm, es restado en todos los casos.

De forma general, podemos ver que los valores promedio de los valores de  $1-\alpha_{\text{ef}}$  que se obtienen para todos los casos son muy similares, aunque hay considerables diferencias con respecto a la precisión. En todos los casos, la dispersión de los valores de  $1-\alpha_{\text{ef}}$ , aumentan con la concentración de potasio. De las tres posibilidades estudiadas utilizando el promedio de valores, los mejores resultados fueron obtenidos en el caso donde se mantiene constante el valor de  $A_{\text{NaOH}}$  tanto para el fotómetro portátil como para el espectrofotómetro de diodos en fila.

El segundo método estudiado para simplificar el procedimiento experimental, fue usar los cocientes de absorbancia como parámetro analítico en lugar de  $1-\alpha_{\text{ef}}$ . Para lograr esto, probamos tres cocientes de absorbancia distintos: a)  $A_{\text{patrón}}/A_{\text{HCl}}$ ; b)  $A_{\text{patrón}}/A_{\text{Tampón}}$  y c)  $A_{\text{patrón}}/A_{\text{NaOH}}$ . En todos los casos, fueron estudiadas dos posibilidades: usar el valor de absorbancia para cada membrana

sensora (Tabla 4.2) y usar el valor medio de 30 diferentes membranas sensoras para  $A_{\text{NaOH}}$ ,  $A_{\text{Tampón}}$  y  $A_{\text{Patrón}}$  (Tabla 3).

Tabla 4.1. Comparación de los valores  $1-\alpha_{\text{ef}}$  obtenidos mediante el fotómetro portátil y el espectrofotómetro de diodos en fila.

[K <sup>+</sup> ] M	Espectrofotómetro de referencia		Fotómetro portátil		Espectrofotómetro de referencia		Fotómetro portátil	
	Individual A				Promedio $A_{\text{Tampón}}$			
	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %
$10^{-7}$	0,97	3,16	0,99	2,54	0,97	5,87	1,00	5,74
$10^{-6}$	0,95	2,97	0,97	2,92	0,95	5,95	0,98	4,89
$10^{-5}$	0,91	4,34	0,94	3,74	0,91	7,17	0,94	6,46
$10^{-4}$	0,69	4,75	0,72	4,44	0,69	7,44	0,72	7,20
$10^{-3}$	0,34	5,50	0,35	4,33	0,34	7,11	0,35	7,87
$10^{-2}$	0,10	8,45	0,10	6,93	0,10	8,92	0,10	9,47
$10^{-1}$	0,01	51,32	0,01	37,31	0,01	52,41	0,01	37,15
[K <sup>+</sup> ] M	Promedio $A_{\text{NaOH}}$				Promedio $A_{\text{Tampón}}$ y $A_{\text{NaOH}}$			
	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %	$1-\alpha_{\text{ef}}$	DER %
$10^{-7}$	0,97	3,16	0,99	2,54	0,97	5,90	0,99	5,81
$10^{-6}$	0,95	2,97	0,97	2,94	0,95	6,01	0,98	4,93
$10^{-5}$	0,91	4,37	0,93	3,77	0,91	7,26	0,93	6,58
$10^{-4}$	0,69	4,81	0,72	4,61	0,69	7,70	0,72	7,60
$10^{-3}$	0,34	5,63	0,35	5,54	0,34	8,08	0,35	9,54
$10^{-2}$	0,10	15,00	0,10	16,56	0,10	16,82	0,10	19,43
$10^{-1}$	0,01	105,48	0,01	151,36	0,01	103,49	0,01	142,33

Como se podría esperar, el uso de los valores medios de absorbancia de sensores en disoluciones tampón, ácido y base, fueron peores que usando los valores individuales, en términos de precisión. Comparando los resultados obtenidos usando valores individuales, podemos observar que el uso de  $A_{\text{HCl}}$  como valor de referencia ofrece mejores resultados que cualquier otro valor de referencia ( $A_{\text{Tampón}}$  y  $A_{\text{NaOH}}$ ) usando los instrumentos tanto de sobremesa como portátil.

Tabla 4.2. Comparación entre diferentes relaciones de absorbancia usadas como parámetro analítico obtenidas mediante el fotómetro portátil y el espectrofotómetro de diodos en fila.

[K <sup>+</sup> ] (M)	Espectr.de referencia		Fotómetro portátil		Espectr.de referencia		Fotómetro portátil		Espectr.de referencia		Fotómetro portátil	
	A/A <sub>HCl</sub>	DER (%)	A/A <sub>HCl</sub>	DER (%)	A/A <sub>T</sub>	DER (%)	A/A <sub>T</sub>	DER (%)	A/A <sub>NaOH</sub>	DER (%)	A/A <sub>NaOH</sub>	DER (%)
10 <sup>-7</sup>	0,93	3,98	0,94	1,60	0,98	2,33	1,00	1,76	3,73	4,35	3,29	3,54
10 <sup>-6</sup>	0,91	3,47	0,93	1,75	0,96	2,17	0,98	1,94	3,67	4,32	3,23	3,38
10 <sup>-5</sup>	0,88	4,45	0,90	2,19	0,93	3,12	0,95	2,56	3,54	4,62	3,15	3,49
10 <sup>-4</sup>	0,73	4,05	0,76	2,06	0,77	3,17	0,81	2,78	2,93	4,88	2,66	3,94
10 <sup>-3</sup>	0,48	4,07	0,52	1,88	0,51	3,08	0,55	1,89	1,95	3,82	1,81	3,22
10 <sup>-2</sup>	0,32	3,88	0,36	2,53	0,34	3,76	0,38	2,54	1,28	1,96	1,24	1,69
10 <sup>-1</sup>	0,26	4,49	0,29	3,16	0,27	4,29	0,31	2,99	1,04	2,05	1,02	0,93

A<sub>T</sub>: TampónTabla 4.3. Comparación entre diferentes relaciones de absorbancia usando como parámetro analítico los valores promedio de A<sub>HCl</sub>, A<sub>Tampón</sub> y A<sub>NaOH</sub> obtenidos con el fotómetro portátil y con el espectrofotómetro de diodos en fila.

[K <sup>+</sup> ] (M)	Espectr.de referencia		Fotómetro portátil		Espectr.de referencia		Fotómetro portátil		Espectr.de referencia		Fotómetro portátil	
	A/A <sub>HCl</sub>	DER (%)	A/A <sub>HCl</sub>	DER (%)	A/A <sub>T</sub>	DER (%)	A/A <sub>HCl</sub>	DER (%)	A/A <sub>HCl</sub>	DER (%)	A/A <sub>T</sub>	DER (%)
10 <sup>-7</sup>	0,93	4,32	0,94	4,04	0,98	4,32	1,00	4,04	3,73	4,32	3,29	4,04
10 <sup>-6</sup>	0,91	4,37	0,93	4,08	0,96	4,37	0,98	4,08	3,67	4,37	3,23	4,08
10 <sup>-5</sup>	0,88	5,21	0,90	4,49	0,93	5,21	0,95	4,49	3,54	5,21	3,15	4,49
10 <sup>-4</sup>	0,73	5,07	0,76	4,74	0,77	5,07	0,81	4,74	2,93	5,07	2,66	4,74
10 <sup>-3</sup>	0,48	3,92	0,52	4,20	0,51	3,92	0,55	4,20	1,95	3,92	1,81	4,20
10 <sup>-2</sup>	0,32	3,66	0,36	3,73	0,34	3,66	0,38	3,73	1,28	3,66	1,24	3,73
10 <sup>-1</sup>	0,26	3,94	0,29	3,39	0,27	3,94	0,31	3,39	1,04	3,94	1,02	3,39

A<sub>T</sub>: Tampón

Cuando comparamos los resultados obtenidos en el mejor de los casos del cálculo de  $1-\alpha_{ef}$  (Tabla 4.1) con respecto a  $A_{patrón}/A_{referencia}$  (Tabla 4.3) podemos concluir que el uso del cociente de absorbancias  $A_{patrón}/A_{HCl}$  como parámetro analítico ofrece los mejores resultados en términos de precisión en todo el rango de concentraciones estudiado y especialmente a altas concentraciones de potasio.

Por consiguiente, proponemos el cociente de absorbancias  $A_{patrón}/A_{HCl}$  como el parámetro analítico con esta instrumentación de tipo portátil.

Esta forma de medida requiere la equilibración de la membrana sensora desechable con una disolución  $10^{-2}$  M de HCl, medida de la absorbancia, para a continuación equilibrar el sensor desechable con la disolución patrón de potasio o con la muestra. Con el propósito de simplificar el procedimiento, usamos sensores desechables preparados con una disolución  $10^{-2}$  M de HCl para cambiar el cromoforo a su forma completamente protonada ( $\text{HC}^+$ ). Así, eliminamos la necesidad de equilibrar el sensor con HCl, de manera que solo es necesaria la medida directa del sensor, previa equilibración con la muestra o con el patrón de potasio. Este procedimiento puede ser usado siempre que la membrana sea estable.

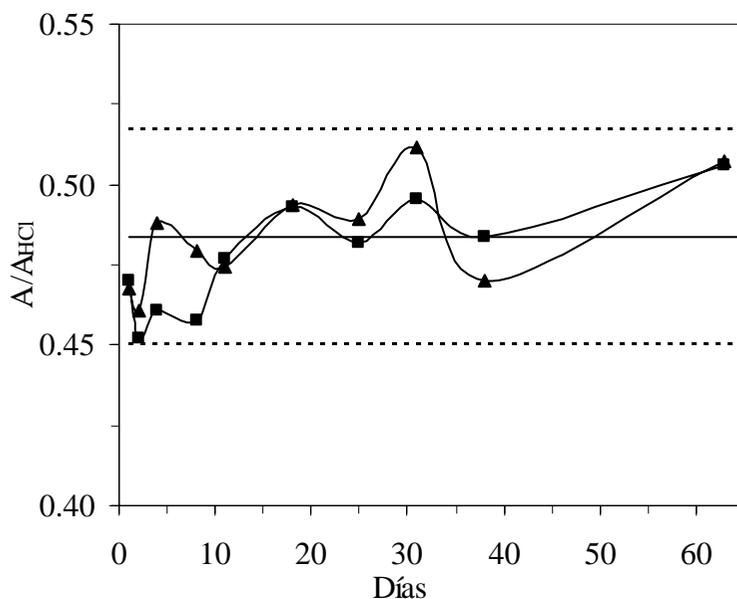


Figura 4.3. Estabilidad de la membrana medida con una disolución  $10^{-3}$  M de potasio. Las *líneas de puntos* indican el intervalo de confianza como  $\pm t \cdot s$  ( $n = 15$ ). *Triángulos*: sensores desechables previamente tratados con HCl; *Cuadrados*: Sensores desechables sin tratamiento previo.

Para demostrar su estabilidad se prepararon 20 membranas desechables diferentes, que se almacenaron en condiciones de oscuridad y con una atmósfera

inerte de nitrógeno. De ellas, 10 fueron preparadas con HCl y las otras 10 fueron usadas tal cual se prepararon. Periódicamente se probó una membrana de cada tipo con una disolución  $10^{-3}$  M de potasio. Los resultados de este chequeo de control, se muestran en la Figura 4.3, demostrando que las membranas desechables son estables hasta por lo menos 63 días bajo las condiciones de almacenamiento y que ambos tipos de membranas tienen el mismo tiempo de vida.

En resumen, el procedimiento ideado para la medida de la absorbancia, consiste en dos pasos: (1) medida directa de la absorbancia de la membrana desechable sin ningún tratamiento y (2) medida de la absorbancia tras la equilibración con disolución patrón o con una muestra. La instrumentación de tipo portátil calcula directamente la relación de absorbancias usadas como parámetro analítico o la concentración de potasio después de programar la función de calibrado para el procesamiento de la señal en el microprocesador.

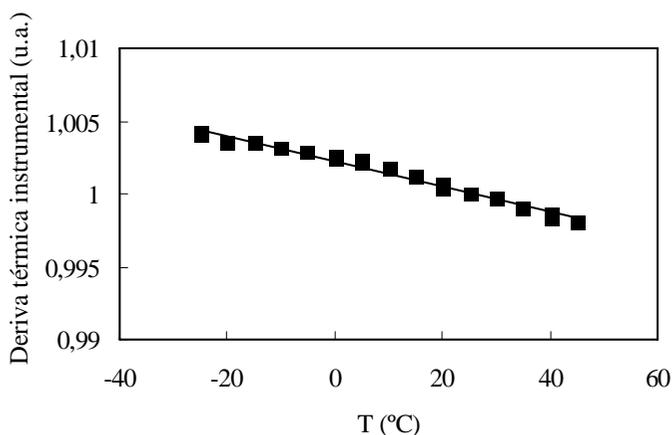


Figura 4.4. Deriva térmica de la instrumentación portátil. Los cuadrados representan los puntos experimentales junto con su línea de tendencia.

### 3.2. Caracterización del sistema portátil de medida

La Figura 4.4 muestra la influencia de la temperatura sobre la respuesta del fotómetro sin el sensor desechable. La curva se representa con datos normalizados a una temperatura de 25° C.

Como era de esperar, el efecto dominante es debido a un descenso en la intensidad de luz del LED, debido a un aumento de la temperatura. Sin embargo, este efecto es considerablemente reducido por circuito de polarización descrito en la Figura 4.2. Los datos experimentales de la Figura 4.4, se ajusta a una dependencia lineal ( $r^2 = 0,983$ ) con un coeficiente térmico por debajo de -90 ppm. Además de la baja deriva térmica, dicha dependencia lineal fue programada en el microprocesador para corregir el resultado final.

La estabilidad instrumental ha sido también caracterizada. En un experimento consistente en hacer una medida de absorbancia por minuto y por día, la deriva del tiempo no puede ser distinguida del ruido de cuantización del convertidor analógico-digital del microprocesador. Por tanto, la deriva del tiempo optoelectrónica está por debajo de un 0,05% al día.

La relación entre el parámetro analítico y la concentración de potasio es de tipo sigmoïdal. Como función de calibrado se ensaya la ecuación 4.5:

$$\frac{A}{A_{\text{HCl}}} = a_2 + \frac{a_2 - a_1}{1 + \exp\left(\frac{([K^+] - a_0)}{a_3}\right)} \quad (\text{ec. 4.5})$$

donde desde  $a_0$  hasta  $a_3$  son parámetros de ajuste.

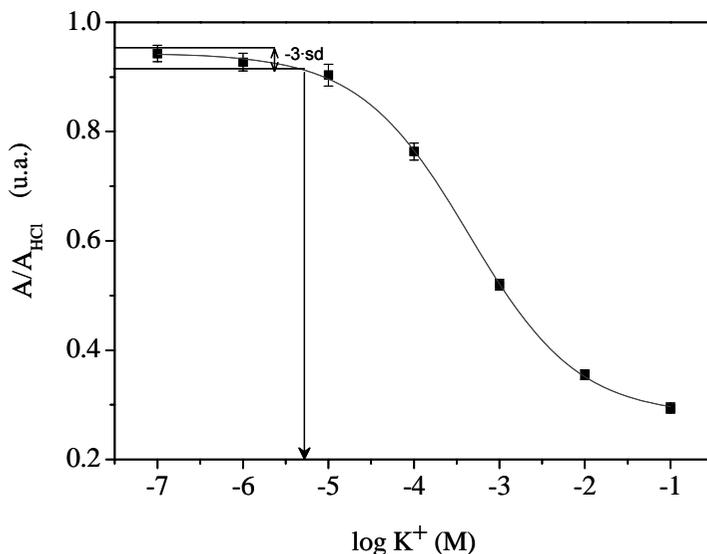


Figura 4.5. Función de calibrado sigmoideal, mostrando el límite de detección.

Utilizando un total de 30 membranas desechables analizadas a 7 concentraciones de potasio distintas se obtuvo la función indicada en la Tabla 4.4, la cual muestra un excelente ajuste ( $r^2 = 0,9998$ ). Esta función de calibrado (Figura 4.5) fue programada en el microprocesador del fotómetro portátil para obtener la concentración de potasio directamente. La interpolación del parámetro analítico experimental en la función sigmoideal, originó un amplio rango de medida (de  $5 \cdot 10^{-6}$  hasta 0.1 M).

La precisión del procedimiento instrumental propuesto fue estudiada a tres niveles de concentración de potasio ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M) usando doce sensores desechables, obteniendo desviaciones estándar relativas entre 5 y 8% cuando se expresan como logaritmo de la concentración de potasio (Tabla 4.4).

Tabla 4.4 Parámetros analíticos y especificaciones técnicas.

PARÁMETRO	Valor; S
$a_2$	0,2767; 0,01408
$a_1$	0,9428; 0,01609
$a_0$	-3,4145; 0,05936
$a_3$	0,6586; 0,06625
$r^2$	0,9998
$\chi^2/\text{DoF}$	0,12443
Rango analítico	0,005-100 mM
Límite Detección	0,005 mM
$1 \cdot 10^{-4}$ M	1,6 %
DER <sup>a</sup> $1 \cdot 10^{-3}$ M	1,1 %
$1 \cdot 10^{-2}$ M	2,1 %
Tiempo de equilibración	180 s
Tiempo de análisis	1 s
Tiempo de vida del sensor	2 meses
Alimentación	Batería: 9 V PP3 Adaptador 12 V AC/DC
Rango de temperatura	-20 / +45 °C
Deriva térmica	-90 ppm
Deriva en el tiempo	<0,05 %/día
Dimensiones	135 x 134 x 45 mm
Peso	440 g (sin baterías)

<sup>a</sup> Expresado como log de la concentración de K(I) (M)

Con el objeto de demostrar la veracidad de los resultados obtenidos mediante el sistema de medida propuesto, se preparó un experimento con 15 sensores desechables diferentes trabajando a cuatro niveles de concentración ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-2}$  M). Los sensores se midieron tanto con el fotómetro portátil como mediante un espectrofotómetro de diodos en fila, siendo éste último tomado como método de referencia y usando en cada sistema su propio parámetro analítico y su

propia función de calibración. Los resultados, expresados en miligramos por litro, del fotómetro portátil fueron representados frente a los provenientes de la medida con el espectrofotómetro de diodos en fila, lo que debería originar línea recta de pendiente la unidad y una ordenada en el origen de cero ( $y=0,9849x-1,0901; r^2 = 0,9939$ ). Esta regresión fue simultáneamente estudiada usando el test de la  $F^{28}$ .

Los resultados obtenidos muestran que la pendiente no difiere significativamente de la unidad y la ordenada en el origen no presenta diferencias significativas a cero. Los resultados obtenidos no muestran diferencias estadísticas entre ambos conjuntos ( $F_{cal}: 1,47; F_{teo}: 1,55; \alpha: 0,05; \text{grados de libertad: } 58$ ), lo que indica la veracidad del procedimiento estudiado comparado con aquel procedimiento para la determinación de potasio basado en el mismo esquema de reconocimiento y medido con un espectrofotómetro de diodos en fila caracterizado previamente por nosotros<sup>24</sup>.

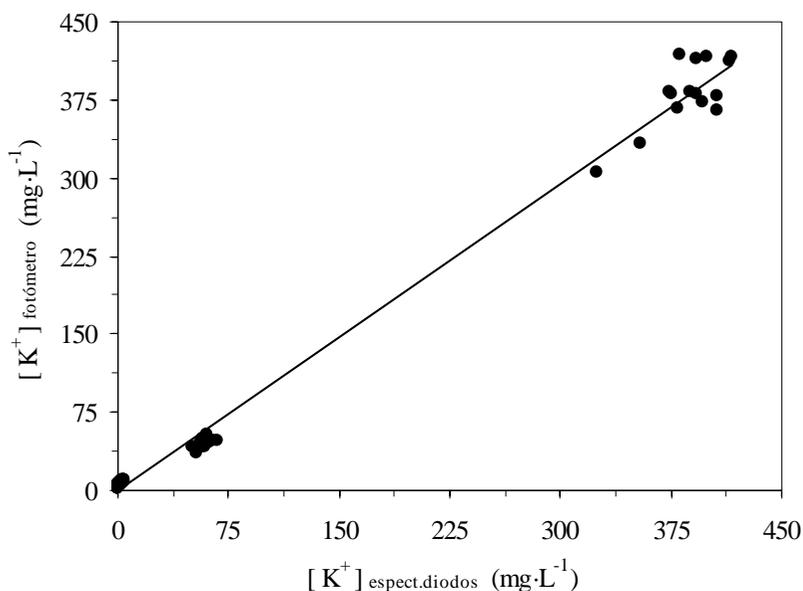


Figura 4.6. Veracidad del procedimiento instrumental. Eje X: resultados obtenidos por un espectrofotómetro de diodos en fila. Eje Y: Resultados obtenidos por el fotómetro portátil. Se muestran los datos experimentales (círculos) junto con su línea de tendencia.

Para calcular el límite de detección del procedimiento y teniendo en cuenta que la función de calibración es una curva sigmoideal (ver Figura 4.5), hemos calculado la desviación estándar de la señal analítica ( $A/A_{\text{HCl}}$ ) usando 58 membranas equilibradas con una disolución de tampón  $2 \cdot 10^{-2}$  M. Como el tampón nos da la señal analítica más alta, al valor medio  $A_{\text{tampón}}/A_{\text{HCl}}$  se le resta tres veces la desviación estándar, haciendo posible calcular el límite de detección del procedimiento, obteniendo un valor de  $5 \mu\text{M}$  ó  $0,19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . El límite superior del rango de medida es de 100 mM, que se corresponde con la concentración más alta probada. La Tabla 4.4 resume las especificaciones de la instrumentación portátil. Se expone una fotografía del instrumento, mostrando cómo se introduce la membrana desechable en la Figura 4.7.

Así, el límite de detección queda establecido como tres veces la desviación estándar de todas las membranas, obteniendo un límite de detección de  $5 \mu\text{M}$ , es decir,  $0,19 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . El límite superior del rango de medida se corresponde con 100mM, siendo ésta la más alta concentración probada. La Tabla 4.4 resume las especificaciones del fotómetro portátil.

En la Figura 4.7 se muestra una fotografía del instrumento, mostrando cómo se introduce la membrana desechable.

### 3.3 Validación y aplicaciones

El instrumento y el procedimiento aquí presentado fueron aplicados a la determinación de potasio en muestras reales al objeto de comprobar su utilidad. Para ello se seleccionaron muestras de agua de diversa procedencia, (mineral, fuente, grifo, arroyo, mar, nieve o lluvia), zumos de frutas y bebidas con diferentes contenidos en potasio que cubren el rango dinámico. La Tabla 4.5 muestra los resultados obtenidos usando un sensor desechable usando el procedimiento arriba descrito para potasio comparado con la espectrofotometría de absorción atómica

como método de referencia. La Tabla 4.5 muestra los resultados correspondientes al valor medio de 3 réplicas para cada muestra con cada uno de los métodos, la desviación estándar de estas medidas y el valor P del test de comparación de medias empleado. Como se observa no existe diferencia significativa entre las medidas obtenidas utilizando ambos métodos.



Figura 4.7. Fotografía de la instrumentación portátil mostrando cómo situar el sensor desechable.

Dado el amplio intervalo de concentraciones estudiado en la validación, se ha empleado el error relativo cuadrático medio (RMSRE) como característica para evaluar la capacidad de predicción de la calibración propuesta en relación con las concentraciones de referencia. El RMSRE fue calculado de mediante la expresión:

$$\text{RMSRE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left( \frac{\text{CONC}_{\text{estimada}} - \text{CONC}_{\text{referencia}}}{\text{CONC}_{\text{referencia}}} \right)^2} \quad (4.6)$$

donde N es el número de referencias (número de muestras que se utilizan en la validación) en el conjunto del ensayo. El valor que se obtuvo para el conjunto de datos de la Tabla 4.5 fue de 0,20. En conclusión, los resultados obtenidos para ambos métodos coinciden, lo que corrobora la validez del procedimiento propuesto aquí descrito.

Tabla 4.5. Determinación de potasio en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia. Los resultados se obtuvieron a partir de tres réplicas del análisis.

Muestra	Fotómetro Portátil		EAA		P <sub>val</sub> (%)
	K <sup>+</sup> (mM)	s	K <sup>+</sup> (mM)	s	
Agua mineral (Vichy Catalán)	1,5	0,61	1,6	0,020	84,2
Agua mineral (Mondariz)	0,14	0,10	0,13	0,00084	78,4
Agua mineral (Solán de Cabras)	0,025	0,016	0,032	0,00036	27,7
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,0073	0,0013	0,0094	0,00019	5,3
Agua de pozo (Otura, Granada)	0,051	0,0022	0,042	0,0090	36,0
Agua de grifo (Almuñecar, Granada)	0,043	0,0011	0,058	0,013	6,4
Mar (Almuñecar, Granada)	24	5,9	24	0,10	98,6
Zumo de tomate	79	8,7	73	0,39	24,6
Zumo de frutas	28	6,4	33	0,14	22,4
Sidra	23	2,3	23	0,31	64,5

## 4. Conclusiones

Hemos desarrollado un fotómetro portátil junto con un procedimiento de medida para un sensor desechable que responde a potasio. El instrumento realiza la medida de la absorbancia del cambio de color de un sensor desechable basado en un cromóforo-ionóforo, para la determinación de potasio en aguas y bebidas desarrollado previamente por nuestro equipo de investigación. La electrónica se basa en los dispositivos de estado sólido comerciales y baratos, controlados por un microcontrolador. Esto permite que nuestro instrumento sea de fácil uso requiriendo un bajo consumo de energía, suministrado por baterías. Se ha incluido la polarización de LED con realimentación negativa para asegurar máxima estabilidad de la emisión luminosa. Además se corrige la deriva térmica.

Para simplificar la metodología analítica y acortar el tiempo de análisis, con respecto a eliminar algunas disoluciones de calibración (HCL, NaOH o tampón), hemos usado la siguiente relación de absorbancias,  $A_{patrón}/A_{referencia}$  como parámetro analítico. El procedimiento ideado para la medida de absorbancia consiste en: (1) medida directa de la absorbancia de la membrana desechable sin ningún proceso de equilibración, (2) medida de la absorbancia después del proceso de equilibración con una disolución tampón o con una muestra. La instrumentación portátil nos da directamente el cociente de absorbancias usado como parámetro analítico o la concentración de potasio correspondiente, después de programar la función de calibrado para el procesamiento de la señal en el microprocesador. La función de calibrado de tipo sigmoideal permite un ancho rango de medida, desde  $5 \cdot 10^{-6}$  M hasta 0,1M, con DER comprendidas entre un 1 y un 2%, expresadas como logaritmo de concentración de potasio.

El fotómetro portátil aquí desarrollado junto con el procedimiento de medida se aplicó satisfactoriamente a la determinación de potasio en distintos tipos de muestras, obteniendo buenos resultados que fueron validados con respecto un procedimiento analítico de referencia.

## 5. Bibliografía

1. Overton, Edward B.; Ehrmann, Ursula; Dharmasena, H. P.; Carney, Kenneth R. *Field Anal.Chem.Tech.* **1996**, *1*, 87-92.
2. Dasgupta, Purnendu K.; Bellamy, Harvey S.; Liu, Hanghui; Lopez, Jorge L.; Loree, Ellis L.; Morris, Kavin; Petersen, Kaj; Mir, Kalam A. *Talanta* **1993**, *40*, 53-74.
3. Zukauskas, A.; Shur, M. S.; Gaska, R. *NATO Science Series, II: Mathematics, Physics and Chemistry* **2004**, *144*, 127-42.
4. Hauser, P. C. *Meas.Sci.Technol.* **1995**, *6*, 1081-85.
5. Lippitsch, M. E.; Kieslinger, D.; Draxler, S. *Sens.Actuators B* **1997**, *38*, 96-102.

6. Malinen, Jouko; Kansakoski, Markku; Rikola, Raimo; Eddison, Colin G. *Sens.Actuators B* **1998**, *51*, 220-26.
7. Matias, Francisco A. A.; Vila, Marta M. D. C.; Tubino, Matthieu *Sens.Actuators B* **2003**, *88*, 60-66.
8. Lau, King Tong; Yerazunis, William S.; Shepherd, Roderick L.; Diamond, Dermot *Sens.Actuators B* **2006**, *114*, 819-25.
9. Packman, A., Nicholson, J., and LONG, M. A colourimetric detector. [EP 1069424 A2]. 2006.
10. Trettnak, W.; Kolle, C.; Reninger, F; Dolezal, C.; O'Leary, P. *Sens.Actuators B* **1996**, *35-36*, 506-12.
11. Trinkel, M.; Trettnak, W.; Kolle, C. *Quim.Anal.* **2000**, *19*, 112-17.
12. Shimazaki, Y.; Fujioka, F.; Iwatsuki, M. *Field Anal.Chem.Tech.* **1998**, *2*, 173-78.
13. Hauser, P. C.; Thusitha, W. T. R. *Fresenius J.Anal.Chem.* **1997**, *357*, 1056-60.
14. Fonseca, Alexandre; Raimundo, Ivo M. jr. *Anal.Chim.Acta* **2004**, *522*, 223-29.
15. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D. *Integrated Analytical Systems*, Alegret, S., Ed.; Elsevier Science B.V: Amsterdam, 2003; Chapter 3.
16. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
17. Johnson, R. Daniel; Bachas, Leonidas G. *Anal.Bioanal.Chem.* **2003**, *376*, 328-41.
18. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
19. Narayanaswamy, Ramaier; Sevilla III, F. *Anal.Chim.Acta* **1986**, *189*, 365-69.
20. Ceresa, A.; Quin, Y; Peper, S.; Bakker, E. *Anal.Chem.* **2003**, *75*, 133-40.
21. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.
22. Vogel, P., Thym, D., Fritz M., and Mosoiu, D. Test Carried for the Determination of Ions. Boehringer Mannheim GmbH. 698.466[US 5,211,914], 1-22. 1993. Estados Unidos. 10-5-1991.

23. Citterio, D.; Omagari, M.; Kawada, T.; Sasaki, S.; Suzuki, Y.; Suzuki, K. *Anal.Chim.Acta* **2004**, *504*, 227-34.
24. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernandez Ramos, M. D.; Al Natsheh, Muneer *Sens.Actuators B* **2003**, *B88*, 217-22.
25. Morf, W. E.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1990**, *62*, 738-42.
26. Dasgupta, Purnendu K.; Eom, In Yong; Morris, Kavin J.; Li, Jianzhong *Anal.Chim.Acta* **2003**, *500*, 337-64.
27. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *481*, 139-48.
28. Hu, Y.; Massart, D. L. *J.Chromatogr.* **1989**, *458*, 311.



## **CAPÍTULO 5**

# **LINEALIZACIÓN DE CURVAS DE RESPUESTA EN SENSORES ÓPTICOS DESECHABLES BASADOS EN UN MECANISMO DE CAMBIO IÓNICO PARA CATIONES**



## LINEALIZACIÓN DE CURVAS DE RESPUESTA EN SENSORES ÓPTICOS DESECHABLES BASADOS EN UN MECANISMO DE CAMBIO IÓNICO PARA CATIONES

### Resumen

Se obtiene una función lineal cuando se aplica una transformación de tipo logístico a la curva de calibración sigmoïdal de optodos selectivos de iones de tipo tridimensional (*bulk optodes*) para la determinación de cationes basados en la química ionóforo-cromóforo. De esta manera, los problemas derivados de usar las funciones de calibración sigmoïdales se resuelven y además, el rango de aplicación se ve aumentado. El método es fácil de usar y elimina la necesidad de tratamiento previo en la muestra a analizar.

La influencia de diferentes parámetros sobre la linealización de los modelos teóricos ha sido estudiada: carga del analito, relación cromóforo-ionóforo, estequiometría del complejo y bondad de la linealización del ajuste teórico a los datos experimentales para dos sistemas experimentales diferentes. El procedimiento ha sido aplicado para la determinación de potasio y dureza usando sensores desechables, en distintos tipos de aguas (grifo, mineral, pozo, lluvia, nieve y mar), validando los resultados mediante un procedimiento analítico de referencia. Esta nueva calibración lineal propuesta para la determinación de cationes aumenta el rango lineal hasta en 7-8 órdenes de magnitud. La ventaja principal es que es posible cuantificar directamente muestras con un contenido en analito muy diferente de una manera rápida y simple.

El propósito de este trabajo es estudiar el uso de la función sigmoïdal completa para extraer información analítica mediante su transformación en una función lineal y así obtener un rango de aplicación más amplio que haga posible medir muestras con una concentración de analito mucho más amplia y sin tener que diluir o concentrar la muestra previamente.

## 1. Introducción

En 1982, S.C. Charlton *et al.* publicaron un artículo<sup>1</sup> sobre la determinación de potasio en suero basado en el uso de ionóforos en membranas de PVC plastificado junto con las así llamadas sustancias *reporter*. Este fue el principio de un fructífero conjunto de patentes presentada por la empresa Miles Inc. y dedicadas al análisis de electrólitos en suero principalmente en formato tira reactiva haciendo uso de la química seca<sup>2-5</sup>.

El excelente estudio del mecanismo de proceso por W. Simon *et al.*<sup>6,7</sup> ha hecho posible el desarrollo de un gran variedad de optodos de membrana completa desde 1989. En el caso de los optodos de membrana completa para cationes, la detección óptica se basa en el intercambio iónico entre el analito catiónico en disolución, debido al ionóforo presente en la membrana lipofílica, y un catión de la referencia, generalmente los protones, también presente en membrana como complejo con un indicador ácido-base o cromoionóforo. Estas membranas responden al cociente de la actividad del analito catiónico y la actividad del catión de la referencia (ion hidrógeno); consecuentemente, la medida o la fijación del pH permite la determinación de la actividad o de la concentración del analito trabajando a fuerza iónica constante. Diversos sensores químicos para los cationes de importancia se han diseñado y caracterizado; así para sodio<sup>8,9-11</sup>, potasio<sup>11-13</sup>; calcio<sup>14,15</sup>; magnesio<sup>16,17</sup>; dureza<sup>18</sup>; mercurio<sup>19</sup>; plata<sup>20</sup>; plomo<sup>21</sup>; o cobre<sup>22</sup>, entre otros.

Los esquemas de sensado se podrían llevar a la práctica de diversas maneras, tales como sondas de fibra óptica<sup>12</sup>; optodos de guías de onda activas<sup>23</sup>; sensores de flujo<sup>24</sup>; tiras reactivas o sensores desechables<sup>25</sup>; y sensores ópticos basados en microesferas<sup>26</sup>, todos los cuales son ejemplos de diversas realizaciones prácticas. Sin embargo, aunque los aspectos técnicos de estos sensores son diferentes, los principios de funcionamiento son los mismos y pueden ser llevadas a

la práctica en un amplio número de dispositivos diferentes de acuerdo con las necesidades.

La función respuesta característica de dichos sensores –el parámetro analítico frente al logaritmo de la actividad de analito– presenta una forma sigmoideal tal como predice la teoría<sup>27</sup>. Esto supone un problema para la calibración, pues solo la zona central del sigmoide, la cual puede ser asimilada a una línea recta, es empleada como función de calibrado, perdiéndose de esta forma parte de la información analítica que el rango dinámico completo contiene.

El propósito de éste capítulo es linealizar la relación matemática entre el parámetro analítico y el logaritmo de la actividad del analito en los optodos tridimensionales selectivos a iones con el objetivo de expandir su rango de medida, utilizando la función de respuesta completa.

La transformación de una relación no lineal en una lineal se ha llevado a cabo mediante una regresión logística, que es un tipo de modelo lineal generalizado, que hace posible predecir un resultado discreto a partir de un conjunto de variables que pueden ser continuas, discretas, dicotómicas, o una combinación de alguna de ellas.

En un modelo de regresión logit, los valores predichos para la variable respuesta nunca podrán ser  $\leq 0$  o  $\geq 1$ , independientemente de los valores de las variables independientes. Esto se logra aplicando la ecuación de regresión 5.1, la cual siempre da los valores predichos en el rango de 0 a 1.

$$y = \exp(b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_n \cdot \eta_n) / (1 + \exp(b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_n \cdot \eta_n)) \quad (\text{ec.5.1})$$

Si considerásemos una variable dependiente  $y$  que fluctúa desde 0 a 1 (por ejemplo, una probabilidad), podremos transformar (transformación logit o logística) la variable  $y$  como:

$$y' = \ln(y/(1-y)) \quad (\text{ec.5.2})$$

Es de notar que esta variable transformada  $y'$  puede asumir teóricamente cualquier valor entre menos y más infinito. Dado que la transformada logit resuelve el asunto de los límites 0/1 para la variable dependiente original, podemos usar esos valores transformados de logit en una ecuación de regresión lineal ordinaria. Concretamente, si desarrollamos la transformación logit a ambos lados de la ecuación de regresión logit, obtendremos el modelo de regresión múltiple lineal estándar de la ecuación 5.3:

$$y' = (b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_n \cdot x_n) \quad (\text{ec.5.3})$$

Este tipo de transformación logística ha sido usada en Química Analítica con propósitos muy diferentes, tales como linealizar la forma sigmoideal de la respuesta en inmunoensayos, tanto radioinmunoensayos<sup>28</sup> como ELISA<sup>29</sup>. También para evaluación de ensayos rápidos<sup>30</sup> y ensayos con varillas indicadoras<sup>31</sup> de respuesta dicotómica. Adicionalmente, la transformación logística ha sido aplicada a otras situaciones analíticas, así para modelar factores de capacidad en función del pH en la optimización de procedimientos HPLC<sup>32</sup> y para modelar la movilidad como una función del pH en electroforesis capilar de zona<sup>33</sup>.

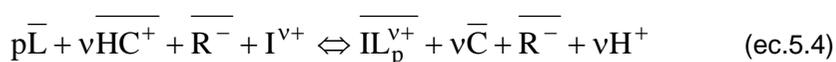
En esta Memoria, presentamos la evidencia de que la función de transformación de tipo logístico puede ser usada para linealizar los datos en sensores de optodo tridimensional para cationes, dando resultados fiables cuando se aplica concretamente a sensores ópticos previamente desarrollados por nosotros para la determinación de potasio<sup>34</sup> y dureza<sup>18</sup> en diferentes tipos de aguas. Para validar la metodología, se han analizado diferentes muestras reales de agua de diversa procedencia y con una concentración de analito en las zonas extremas de las nuevas funciones de calibrado, comparándose los resultados con un método de referencia basado en espectrofotometría de absorción atómica.

## 2. Teoría

### 2.1. Modelo general

El fundamento de sensores ópticos basados en cambios de concentración en el interior de una fase separada, los denominados optodos tridimensionales, esta bien establecida<sup>27, 8, 7</sup>. En el caso del sensado de cationes, el reconocimiento de cationes se debe al ionóforo  $L$  presente en la membrana polimérica delgada mediante la interacción selectiva huésped-anfitrión y la transducción óptica es inducida a través de una reacción de intercambio iónico, implicando un coexistente cromoióforo  $C$ .

El intercambio del analito catiónico  $I^{V+}$  presente en la disolución de la muestra por un catión de referencia, generalmente el hidrogenoión presente como una especie protonada  $HC^+$  del cromoióforo, se hace posible mediante los aniones  $R^-$  inmovilizados, provenientes generalmente de una sal lipofílica que controla la actividad total del ión en membrana. (ec. 5.4).



La ecuación 5.4 describe este equilibrio global de cambio iónico, en el cual las especies barradas se refieren a las especies inmovilizadas en la fase orgánica de la membrana, gobernado por la constante de equilibrio global  $K_{\text{ext}}$  que es función de las lipofilicidades relativas del analito y del ión de referencia, de la constante de la estabilidad del complejo  $\overline{IL_p^{V+}}$  y de la constante de la acidez de la especie

$HC^+$ <sup>35, 36</sup>.

La respuesta del sensor se puede conseguir a través de los cambios en la absorbancia o luminiscencia del cromoióforo, que es la especie óptica medible en la fase membrana, como un parámetro normalizado  $\alpha$ <sup>27, 8</sup>.

El valor de  $\alpha$ , es definido como  $[C]/C_C$  donde  $[C]$  es la concentración del cromoióforo desprotonado, que se relaciona con la constante de equilibrio global  $K_{ex}$ , las concentraciones analíticas del cromoióforo  $C_C$ , del ionóforo  $C_L$ , y del anión lipofílico, las actividades del analito y del ión de referencia, hidrogenoión  $H^+$ , en solución acuosa a través de una función de respuesta sigmoideal implícita:

$$a_{I^{v+}} = \frac{1}{K_{ext}} \left( \frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^v \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{v \left( C_L - \frac{p}{v} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^p} \quad (\text{ec. 5.5})$$

El parámetro experimental  $\alpha$ , grado de desprotonación del cromoióforo, es obtenido usando las absorbancias o luminiscencias del problema ( $A$ ), la absorbancia mínima ( $\alpha=1$ ) correspondiente a la especie desprotonada ( $A_C$ ) y la absorbancia máxima ( $\alpha=0$ ) correspondiente con la especie completamente protonada del cromoióforo  $A_{HC}$ . (eq.5.6) y dependen del cociente de las actividades del ión de hidrógeno y del ión de referencia en fase acuosa.

$$\alpha = \frac{A_{HC} - A}{A_{HC} - A_C} \quad (\text{ec. 5.6})$$

La forma logarítmica de la ecuación 5.5 muestra la dependencia entre la actividad del analito catiónico  $a_{I^{v+}}$ , y el grado de desprotonación del cromoióforo,  $\alpha$ , puesto que todos los otros términos son constantes para cada sistema analítico. Representando  $\alpha$  frente a  $\log a_{I^{v+}}$ , se obtiene una curva de tipo sigmoideal, como se muestra en la Figura 1.

$$\log a_{I^{v+}} = \log \left( \left( \frac{\alpha}{1-\alpha} \right)^v \cdot \frac{a_{H^+}^v}{K_{ext}} \cdot \frac{(C_R - (1-\alpha)C_C)}{v \left( C_L - \frac{p}{v} (C_R - (1-\alpha)C_C) \right)^p} \right) \quad (\text{ec.5.7})$$

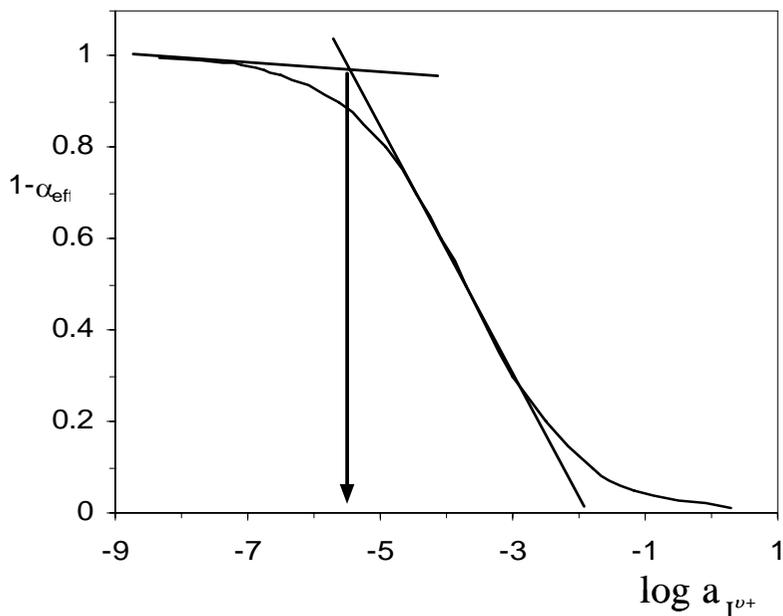


Figura 5.1. Rango dinámico lineal en funciones de respuesta de tipo sigmooidal usando la anterior metodología.

En optodos de membrana completa, la parte central de la curva sigmooidal es prácticamente lineal y es usada habitualmente como curva de calibrado lineal con propósitos analíticos. El rango de medida útil suele cubrir habitualmente de 2 a 4 órdenes de magnitud de la concentración de analito y depende, a un valor de pH constante, de la composición de la membrana, la carga del anión analito y la estequiometría del complejo formado con el ionóforo en la membrana polimérica;

pudiéndose incrementar el rango de trabajo para analitos de mayor carga y/o mayores estequiometrías del complejo<sup>6;27</sup>.

Con propósito de análisis se emplea generalmente la parte lineal de la curva de respuesta sigmoideal<sup>37</sup>, definida entre un límite inferior y un límite superior. El límite inferior se puede calcular haciendo uso de diferentes aproximaciones que se basan en: i) la pérdida de sensibilidad debido a la forma sigmoideal de la función respuesta a bajas concentraciones del catión y ii) por la interferencia de otros cationes<sup>27</sup>. La primera de las aproximaciones, por pérdida de sensibilidad, puede ser definida de tres formas: a) por la desviación estandar de la señal de fondo<sup>21</sup>; b) por la variación en una fracción dada de la pendiente máxima de la función respuesta, por ejemplo, un medio o un cuarto<sup>36</sup> y c) por el punto de corte de dos funciones lineales en la parte de máxima y mínima pendiente del sigmoide, esta última en la zona de baja actividad de la función sigmoideal<sup>38</sup> (Figura 5.1).

Dado que la sensibilidad disminuye continuamente con el aumento de la actividad de analito, se puede definir el límite superior de modo análogo a las definiciones del apartado b y c. En este último caso, se hace necesario el poder definir una función lineal en la parte de mínima pendiente de la zona de alta actividad. Si esto no es posible, como suele ocurrir debido a algunos problemas como la falta de solubilidad de la sal correspondiente, se obtiene un límite superior práctico a partir de la intersección de la función de calibrado lineal con el eje de abscisas<sup>39</sup>.

En los primeros estudios sobre estos sistemas, generalmente en el formato de tira reactiva, en el cual el parámetro analítico era la absorbancia o, más comúnmente, la reflectancia difusa, se utilizaron distintas funciones de calibración. Así, Charlton *et al.*<sup>1</sup> encontraron una dependencia hiperbólica de la absorbancia de la tira reactiva con la concentración de analito, linealizada por medios un diagrama doblemente recíproco. En el caso de medidas de la reflectancia, la transformación

de Kubelka-Munk<sup>40</sup> y la transformación de Williams-Clapper<sup>41</sup> se han utilizado como un algoritmo adecuado para calibración.

El uso de la parte central de la función de respuesta sigmoideal como rango de medida en los optodos de membrana supone una pérdida de información analítica potencial, ya que el rango de medida de analito es varios órdenes de magnitud más corto que todo el rango dinámico completo del sigmoide. Con la intención de utilizar la función sigmoideal completa para obtener información analítica, se estudia en este capítulo su transformación en una función lineal para obtener un rango de aplicación más amplio que haga posible medir muestras con una amplia variedad de concentraciones, eliminando la necesidad de un tratamiento previo.

Para encontrar una función analítica del tipo  $Y = A + B \cdot X$  a partir del modelo teórico sigmoideal, la ecuación 5.8 se reescribe como:

$$\log\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right) + \frac{1}{v} \log\left(\frac{\left(\frac{C_R}{C_C} - (1-\alpha)\right)}{v\left(\frac{C_L}{C_C} - \frac{p}{v}\left(\frac{C_R}{C_C} - (1-\alpha)\right)\right)^p}\right) = \frac{1}{v} \log \frac{K_{\text{ext}} \cdot C_C^{p-1}}{a_{H^+}^v} + \frac{1}{v} \log a_{I^{v+}} \quad (\text{ec.5.8})$$

Esta última ecuación puede reescribirse de una manera simplificada como:

$$Y(\alpha) + D(\alpha) = A + B \cdot X \quad (\text{ec.5.9})$$

donde  $Y(\alpha)$  es el logit decimal de  $\alpha$ ;  $X$  es el logaritmo decimal de la actividad del catión considerado;  $A$  es un término independiente que permanece constante para cada sistema analítico y  $B$  es el coeficiente lineal o pendiente ( $B = 1/v$ ). Utilizamos aquí el logaritmo decimal en lugar del logaritmo neperiano para así mantener el

formalismo usual en las ecuaciones analíticas que implican constantes de equilibrio y concentraciones.

La ecuación 5.9 es similar a la ecuación de una línea recta ( $Y(\alpha)$  frente a  $X$ ), excepto por la introducción de un término denominado disturbador  $D(\alpha)$  y definido como:

$$D(\alpha) = \frac{1}{v} \log \left( \frac{\left( \frac{C_R}{C_C} - (1 - \alpha) \right)}{\left( \frac{C_L}{C_C} - \frac{p}{v} \left( \frac{C_R}{C_C} - (1 - \alpha) \right) \right)^p} \right) \quad (\text{ec.5.10})$$

La Figura 5.2 muestra la variación teórica de  $D(\alpha)$  para diversas condiciones de concentraciones analíticas de los componentes de la membrana, de carga del analito y de distintas estequiometrías.

Por lo tanto, utilizamos aquí una transformación logit pero utilizamos el logaritmo decimal en lugar del logaritmo neperiano para así mantener el formalismo usual en este campo entre el grado de desprotonación  $a$  y la actividad del analito para obtener una curva de calibración lineal. El tipo de transformación logit que hemos utilizado es conocido como modelo log-logit completamente especificado<sup>42</sup> que describe una expresión algebraica equivalente a la función logística, la cual es linealizada eficazmente por la ecuación:  $\text{logit } Z = a + b \cdot \log(\text{concentracion})$ , siendo el logit de  $Z$  completamente especificado igual a:  $\text{logit } Z = \log[(Z - Z_{\min}) / (Z_{\max} - Z)]$ .

Para verificar la validez de la ecuación X para linealizar la respuesta sigmoideal de optodos completos para cationes, hemos seleccionado dos sensores desechables estudiados previamente por nosotros, uno para potasio<sup>34</sup> y otro para dureza (calcio mas magnesio)<sup>18</sup>. La ecuación general (5.8) fue ajustada para cada

caso particular y se ha comprobada experimentalmente.

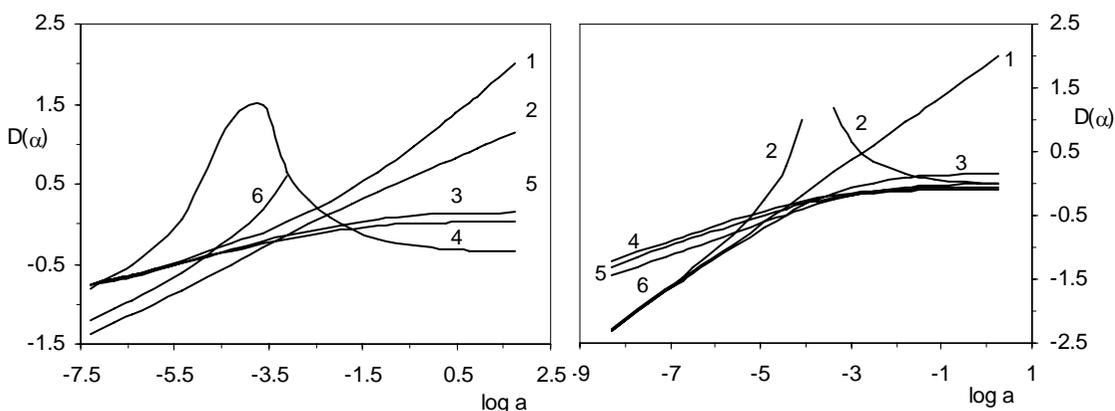


Figura 5.2. Variación del logit decimal  $D(\alpha)$  como una función del logaritmo decimal para dureza (1): 1:  $\nu=2$ ,  $p=2$ ; 2:  $\nu=1$ ,  $p=0.5$ ; 3:  $\nu=2$ ,  $p=1$ ; 4:  $\nu=2$ ,  $p=0.5$ ; 5:  $\nu=1$ ,  $p=2$ ; 6:  $\nu=1$ ,  $p=1$ ; y potasio (2): 1:  $\nu=1$ ,  $p=1$ ; 2:  $\nu=1$ ,  $p=2$ ; 3:  $\nu=1$ ,  $p=0.5$ ; 4:  $\nu=2$ ,  $p=0.5$ ; 5:  $\nu=2$ ,  $p=1$ ; 6:  $\nu=2$ ,  $p=2$ .

## 2.2. Modelo para el sensor de potasio

En este caso, el equilibrio de cambio iónico que tiene lugar es el siguiente:



Dado que en este caso el cromoióforo no puede estar completamente protonado ( $1-\alpha \cong 0,9$ ) al el pH de trabajo (9,0), es difícil determinar la absorbancia para  $\alpha = 0$ , por lo que el problema se resuelve usando un valor efectivo de  $\alpha$ ,  $\alpha_{ef}$ , en donde  $A_{HC}$  es medido en una disolución tampón como se indica en la Sección Experimental.

En el caso del potasio, las concentraciones analíticas de ionóforo,

cromoionóforo y sal lipofílica son iguales,  $C_L = C_C = C_R = C$ , y, además,  $v = 1$  y el factor estequiométrico  $p = 1^{34}$ , así la ecuación 5. 5 se reduce a:

$$a_{K^+} = \frac{a_{H^+}}{K_{ext}^{K^+}} \left( \frac{\alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}} \right)^2 \quad (\text{ec. 5.12})$$

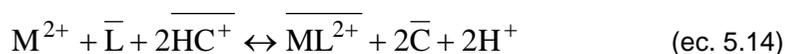
Tomando logaritmos decimales en la ecuación anterior resulta:

$$\log \left( \frac{\alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}} \right) = \frac{1}{2} \log \frac{K_{ext}^{K^+}}{a_{H^+}} + \frac{1}{2} \log a_{K^+} \quad (\text{ec. 5.13})$$

En esta ecuación el parámetro disturbador  $D(\alpha)$  toma la forma de un logit decimal, razón por la cual da lugar a una línea recta con la pendiente de 1/2, en concreto,  $Y(\alpha_{ef}) + D(\alpha_{ef}) = A + 1/2 \cdot X$ , donde  $Y(\alpha_{ef})$  es el logaritmo decimal de  $\alpha$  y  $X$  es el logaritmo decimal de la actividad del potasio.

### 2.3. Modelo para el sensor desechable de dureza

Al poner en contacto el sensor con una disolución acuosa que contiene calcio y magnesio, se da el siguiente equilibrio de cambio iónico en la membrana:



En este caso particular, también se utiliza  $\alpha_{ef}$  como parámetro analítico por la misma razón arriba indicada. Las concentraciones analíticas de ionóforo, cromoionóforo y sal lipofílica cumplen la condición:  $C_L = C_R = (1/2) C_C = C$ , y,  $v = 2$  y  $p = 0,5^{18}$ , así:

$$a_{M^{2+}} = \frac{a_{H^+}^2}{K_{\text{exch}}^{M^{2+}}} \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right)^2 \cdot \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{\sqrt{8 - \alpha_{\text{eff}}}} \right) \cdot \sqrt{C} \quad (\text{ec. 5.15})$$

Tomando logaritmos decimales en la ecuación 5.15 resulta::

$$\log \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right) + \frac{1}{2} \log \frac{\alpha_{\text{eff}}}{\sqrt{8 - \alpha_{\text{eff}}}} = \frac{1}{2} \log \frac{K_{\text{exch}}^{M^{2+}}}{a_{H^+}^2 \sqrt{C}} + \frac{1}{2} \log a_{M^{2+}} \quad (\text{ec. 5.16})$$

Esta ecuación que resulta (ec. 5.16) presenta la forma  $Y(\alpha_{\text{ef}}) + D(\alpha_{\text{ef}}) = A + 1/2 \cdot X$  donde  $Y(\alpha_{\text{ef}})$  es el logit decimal de  $\alpha$  y  $X$  es el logaritmo decimal del contenido total de metal (calcio mas magnesio) expresada como carbonato cálcico.

En este caso el parámetro disturbador  $D(\alpha_{\text{ef}})$  no presenta una dependencia lineal con el logaritmo de la actividad, lo cual produce una perturbación en el modelo lineal. Como se muestra en la Figura 5.2, el término disturbador muestra un comportamiento casi lineal en relación con  $X$  y, por esta razón, cuando  $Y(\alpha_{\text{ef}})$  se representa frente a  $X$ , se obtiene un línea recta, aunque muestra una pendiente menor que el valor teórico  $1/2$ .

Por lo tanto, se puede aplicar la transformación logit decimal al grado de desprotonación  $\alpha$  para obtener curvas de calibración lineales con la actividad del analito, lo que se podría utilizar como curva de calibración para este tipo de sensores.

## 2.4. Cálculo del límite de detección.

Este modelo permite la linealización de los datos experimentales que cubren el rango dinámico de respuesta del sensor óptico y, además, podría ser utilizado para calcular el límite de detección (LD). Este LD es la concentración del catión que proporciona un valor de  $\alpha$  significativamente diferente de cero. Es posible establecer un valor mínimo de  $\alpha$  tal que cumpla la condición  $\alpha \geq 3 \cdot s_0$ , donde  $s_0$  es la desviación estándar de los valores experimentales de  $\alpha$  cuando la concentración del analito es próxima a cero y el LD es la concentración correspondiente de analito calculada de la curva de calibración:

$$LD = 3 \cdot \frac{s_0}{b} - a \quad (\text{ec. 5.17})$$

siendo a y b la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente.

## 2.5. Estimación de la constante global de equilibrio

La constante global de equilibrio para optodos de membrana completa se calcula normalmente por ajustando los datos experimentales al modelo teórico por un simple ajuste<sup>37</sup>, empleando una aproximación de mínimos cuadrados a los puntos centrales del sigmoide<sup>39</sup> o bien por cálculo iterativo<sup>43</sup>. Con la transformación de datos que aquí se propone, se puede calcular la constante de coextracción global  $K_{\text{ext}}$  a partir de la ordenada en origen de la ecuación linealizada 5.8.

$$A = \frac{1}{v} \log \frac{K_{\text{exch}} \cdot C_C^{p-1}}{a_{\text{H}^+}^v} = \frac{1}{v} ((p-1) \log C_C + v \cdot \text{pH} - pK_{\text{exch}}) \quad (\text{ec. 5.18})$$

Solo es necesario conocer el valor de pH y las concentraciones analíticas de los componentes en la membrana.

### 3. Experimental

#### 3.1. Reactivos

Los reactivos químicos empleados son de grado reactivo analítico y todas las disoluciones acuosas se prepararon empleando agua procedente de un sistema de purificación de osmosis reversa Milli-Ro 12 mas Milli-Q (Millipore, Bedford, MA).

Las disoluciones patrón de calcio (3.1 M), magnesio (3.1 M) y potasio (2,0 M) se prepararon en agua, por pesada de  $\text{CaCO}_3$  (Panreac, Barcelona),  $\text{MgCO}_3$  (Merck, Darmstadt, Alemania) y KCl (Aldrich, Steinheim, Alemania), respectivamente. Disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución con agua. Tampones: 0,2 M de pH 9,0 a partir de tris(hidroximetil)amino metano (Tris) (Sigma-Aldrich) y HCl (Merk).

Para la preparación de las membranas sensoras para potasio se utilizaron los mismos que en el capítulo 4 de esta memoria en la sección 2.1. Para las membranas sensoras de dureza se empleó cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC), tributil fosfato (TBP), y tetrahidrofurano (THF), todos ellos adquiridos a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid), potasio tetrakis (4-clorofenil)borato sódico (TCPB) suministrado por Fluka (Fluka, Madrid). El ionóforo y cromoióforo siguientes fueron sintetizados, purificados y caracterizados por nosotros de acuerdo con la bibliografía: 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazacicloocta decano (K22B5)<sup>18;44</sup>; 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino)fenoxacina<sup>14</sup>. Como soporte se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

### 3.2. Preparación de las membranas de un solo uso y procedimiento de medida

Las membranas se prepararon con ayuda de un dispositivo giratorio sobre un soporte de poliéster<sup>45</sup>. Las mezclas para la preparación de las membranas sensibles a potasio se detalla en el capítulo 4, sección 2.2 y las membranas sensibles a calcio y magnesio se prepararon a partir de una disolución conteniendo 25,0 mg (27,8 p/p %) de PVC, 63,0 mg (70,0 p/p %) de TBP, 0,5 mg (0,56 p/p %) de K22B5, 0,85 mg (0,94 p/p %) de (1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina y 0,71 mg (0,79p/p %) de TCPB. En ambos casos disueltos en 1 mL de THF recientemente destilado. Los sensores desechables se prepararon por deposición de 20  $\mu$ L de las anteriores disoluciones sobre una lámina de poliéster de 14 mm  $\times$  45 mm  $\times$  0,5 mm de espesor con la ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas y se almacenaron en un desecador a vacío a temperatura ambiente para permitir una evaporación lenta del disolvente.

La respuesta de los dos sensores desechables fue evaluada por adición de 9 mL de la disolución a ensayar en un tubo de plástico de polietileno junto con 1 mL de disolución tampón de pH 9,0. A continuación, se introduce el sensor desechable en el tubo durante 5 minutos sin agitación. Después de alcanzado el equilibrio, la absorbancia de las membranas se miden a 655 en un espectrofotómetro de diodos en fila Hewlett-Packard HP-8453 (Nortwalk, CT, USA) provisto de un soporte de cubeta de 44mm de alto y 12 mm de ancho fabricado en hierro y pintado de negro mate<sup>18</sup>. Las disoluciones patrón usadas para los propósitos de calibración en el caso del sensor desechable de dureza fueron preparadas con una relación molar 1:1 de calcio y magnesio. Los valores de absorbancia, correspondientes a la especie completamente protonada ( $A_{HC}$ ) y desprotonada ( $A_C$ ) del cromoionóforo necesarios para calcular los valores de  $\alpha_{ef}$ , se midieron acondicionando los sensores desechables en tampón Tris  $2 \cdot 10^{-2}$  M y NaOH  $10^{-2}$  M. Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-Hückel<sup>46</sup>. Para corregir la absorbancia del fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo

Mylar. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no necesitaron ser acondicionadas antes de su uso.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Verificación del modelo teórico: establecimiento de la curva de calibrado lineal

Para verificar la validez de los modelos teóricos (ecuaciones 5.13 y 5.16), se prepararon independientemente dos series de 11 disoluciones patrón de dureza (calcio y magnesio) y 10 disoluciones patrón para potasio conteniendo entre  $1,77 \cdot 10^{-8}$  y 2,5 M en actividades ( $2 \cdot 10^{-8}$  y 3 M en concentraciones) de calcio y magnesio y  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y 0,87 M en actividades ( $1 \cdot 10^{-8}$  y 1.5 M en concentraciones) de potasio, respectivamente. Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental, obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  (ec.5.6). Los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados (OLS, ordinary least squares).

La precisión del logaritmo de la actividad fue estudiada en todo el rango de aplicación, observándose como la varianza se incrementa hacia los extremos del rango analítico. La Figura 5.3 muestra las curvas de varianza obtenidas, las cuales siguen un perfil parabólico para los dos casos estudiados. Los valores experimentales están ajustados por una regresión curvilínea parabólica.

La desviación estándar  $s_0$  del valor experimental  $\alpha$  necesario para el cálculo del límite de detección se obtuvo usando un procedimiento de dos etapas. En un

primer paso, fueron obtenidos un valor  $s_{01}$  y un LD1 a partir de los valores replicados de los valores de  $\alpha$  para la concentración más baja ensayada de analito. En el segundo paso utilizamos las concentraciones de todos los valores experimentales  $\alpha$  correspondientes a las concentraciones de analito que están debajo de este primer LD1. Con esos valores de  $\alpha$ , se calcula una desviación de estándar promedio y se obtiene el LD correspondiente usando la ecuación 5.17.

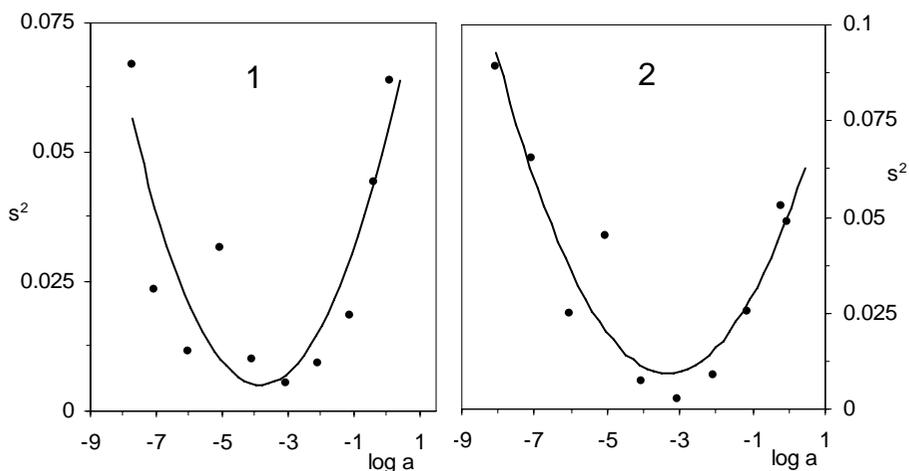


Figura 5.3. Curvas de varianza del logit decimal de  $\alpha_{ef}$  como una función del logaritmo decimal de las actividades de dureza (A) y potasio (B).

El rango dinámico lineal para potasio obtenido si empleamos la metodología previa era desde 0,013 a 100 mM (5 órdenes de magnitud) y ahora es desde 0,0001 a 1.500 mM (7 órdenes). Para el caso de dureza la metodología previa daba un rango analítico desde 1,9 a 15.000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (5 órdenes), mientras que usando esta nueva metodología el nuevo rango comprende desde 0,007 a 300.000  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (8 órdenes) (Figura 5.4). Este considerable incremento en el rango dinámico lineal es la ventaja principal de la metodología propuesta.

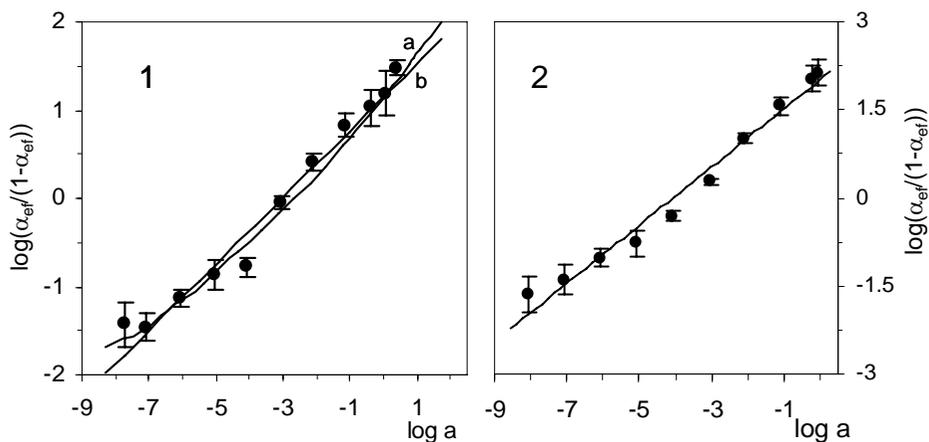


Figura 5.4. Comparación entre las curvas de calibrado para (1) dureza; a: función lineal teórica, b: función propuesta y (2) potasio.

Tabla 5.1. Características analíticas de los sensores desechables estudiados usando la metodología de linealización propuesta

Parámetro	Sensor desechable	
	Potasio	Dureza
Ordenada	1,970	1,143
Desviación estándar de la ordenada	0,053	0,040
Pendiente	0,481	0,377
Desviación estándar de la pendiente	0,011	0,013
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	95,8 %	95,0 %
Linealidad on-line (%)	97,7 %	96,7 %
Anterior límite de detección	0,013	1,9
Nuevo límite de detección	0,00001	0,007
Previo rango dinámico lineal	$1,3 \cdot 10^{-2} - 10^2$	$1,9 - 1,5 \cdot 10^3$
Nuevo rango dinámico lineal	$1,6 \cdot 10^{-4} - 1,5 \cdot 10^3$	$0,017 - 3 \cdot 10^5$

Las unidades de concentración están en mM para potasio y  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  para dureza.

Una posible desventaja de esta metodología es el hecho de que la precisión de las medidas disminuye con un perfil parabólico hacia los extremos del rango dinámico lineal, aunque estos valores son aceptables para sensores de tipo

desechable. La Tabla 1 muestra las características analíticas del procedimiento propuesto comparando los resultados con la metodología anterior.

Las constantes globales de equilibrio,  $\log K_{\text{extr}}$ , calculadas a partir de la ordenada de las ecuaciones linealizadas (ec.8) fueron de -5,1 para potasio y -15,7 para dureza. Los valores calculados empleando la aproximación de mínimos cuadrados para los puntos centrales del sigmoide<sup>39</sup> fueron de -5,3 y -15,9 respectivamente.

## 4.2. Aplicaciones analíticas

Con el propósito de evaluar la utilidad del método de linealización que se propone para sensores ópticos de cationes, se ha aplicado el método a dos sensores de un solo uso que ya han sido caracterizados y estudiados previamente por nosotros para la determinación de potasio y dureza. Para hacer esto, se seleccionaron muestras de aguas de diferente procedencia (grifo, pozo, río, nieve, mar) cuya concentración de dureza y potasio está en las nuevas zonas del rango dinámico lineal obtenido en el método de linealización propuesto. En la Tabla 5.2 se muestran los resultados obtenidos empleando el procedimiento descrito aquí para sensores desechables para potasio y dureza, comparados con un método de espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia. La Tabla 5.2 incluye también los valores medios para tres determinaciones de cada muestra y la desviación estandar de estas medidas y el nivel de probabilidad ( $P_{\text{val}}$ ) del test de comparación de medias empleado. Como se observa no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando los sensores y el método de referencia.

Tabla 5.2. Determinación de potasio y dureza en distintos tipos de muestras usando EAA como método de referencia.

MUESTRA	Sensor desechable		EAA		P <sub>val</sub> (%)
	K (mM)	s <sup>(1)</sup>	K (mM)	s	
Agua mineral (Vichy Catalán)	1,59	0,196	1,61	0,040	81,8
Agua mineral (Mondariz)	0,25	0,019	0,26	0,001	26,5
Lluvia (Granada)	9,6·10 <sup>-4</sup>	6,4·10 <sup>-4</sup>	6,72·10 <sup>-4</sup>	5,42·10 <sup>-5</sup>	47,6
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	1,4·10 <sup>-2</sup>	3,2·10 <sup>-3</sup>	1,14·10 <sup>-2</sup>	9,39·10 <sup>-5</sup>	19,1
Zumo de albaricoque y melocotón	22,5	2,75	26,2	0,23	61,9
Zumo de frutas	34,9	2,15	37,5	0,19	5,6
Sidra	26,3	1,90	23,2	0,43	5,4
Agua de pozo (Otura, Granada)	0,076	0,002	0,075	0,009	6,6
Agua de pozo (Valderrubio, Granada)	0,13	0,02	0,164	0,016	94,1
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	13,5	3,69	19,3	1,18	27,6

MUESTRA	Sensor desechable		EAA		P <sub>val</sub> (%)
	mg·L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	s	mg·L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub>	s	
Agua de pozo (Otura, Granada,)	516	43,2	468	10,6	13,6
Agua de pozo (Valderrubio, Granada)	440	76,3	451	12,2	82,2
Lluvia (Granada)	2,3	1,39	4,11	0,13	8,4
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,77	0,09	0,81	0,08	72,5
Agua de río (Lachar, Granada)	1672	235,7	1973	10,1	9,2

<sup>(1)</sup> Desviación estándar

Por otra parte, dado el amplio intervalo de concentraciones estudiado en la validación, se ha empleado el error relativo cuadrático medio (RMSRE) como estadístico apropiado para evaluar la capacidad de predicción de la calibración propuesta en relación con las concentraciones de referencia. El RMSRE fue calculado de mediante la expresión:

$$\text{RMSRE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left( \frac{\text{CONC}_{\text{estimada}} - \text{CONC}_{\text{referencia}}}{\text{CONC}_{\text{referencia}}} \right)^2} \quad (\text{ec.6.19})$$

donde N es el número de referencias (número de muestras que se utilizan en la validación) en el conjunto del ensayo. Los valores que se obtuvieron para el conjunto de datos de la Tabla 2 son 0,20 y 0,22 para el sistema analítico de potasio

y dureza, respectivamente. En conclusión, los resultados obtenidos para ambos métodos coinciden, lo que corrobora la validez de las suposiciones hechas en esta metodología de linealización.

## 5. Conclusiones

Hemos establecido un simple modelo matemático lineal que se ha aplicado a membranas sensoras de cationes que se basan en el empleo de química ionóforo-cromoionóforo y trabajan por un mecanismo de cambio iónico. Esta metodología permite una determinación de las muestras directa y rápidamente sin la necesidad de operaciones preliminares, haciendo que el rango de aplicación se incremente hasta 7-8 órdenes de magnitud en la concentración analítica, permitiendo la medida directa de muestras con contenidos de analito extremos. En los dos ejemplos que hemos estudiado, sensores desechables para potasio y dureza, ha sido posible el análisis de muestras de nieve y agua de mar. Esta nueva linealización de la curva respuesta para sensores ópticos desechables incrementa la viabilidad de este tipo de sensores ópticos, ofreciendo al mercado una herramienta útil y barata para obtener información química in situ para un amplio rango de muestras y que puede ser implementado fácilmente en una instrumentación de tipo portátil como la estudiada en el capítulo anterior.

## 6. Bibliografía

1. Charlton, S. C.; Fleming, R. L.; Zipp, A. *Clin.Chem.* **1982**, *28*, 1857-61.
2. Charlton, S. C. Multilayer test device containing ionophore and reporter substance and its use for determination of ions in aqueous solution. (Miles Laboratories, Inc. EP Patent 207392, 1986.
3. Charlton, S. C., Fleming, R. L., Hemmes, P., and Lau, A. L. Y. Unified test means for ion determination. Miles Laboratories Inc. US Patent 4,645,744. 1985.

4. Charlton, Steven C., Denton, James B. Selectivity improvement for lithium ion tests. Miles, Inc. US Patent 4,968,630. 1989.
5. Yip, Kin-Fai, Charlton, S. C. Compound useful in detecting ions and method of preparing it. Miles Inc. US Patent 4,552,697. 1985.
6. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998; Chapter 6.
7. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
8. Bühlmann, P.; Pretsch, E.; Bakker, E. *Chem.Rev.* **1998**, *98*, 1953-687.
9. Chan, W. H.; Lee, A. W. M.; Lam, Y. S.; Lu, J. Z. *Microchem.J.* **2002**, *72*, 201-07.
10. Yang, Xiaohai; Wang, Kemin; Guo, Cancheng *Anal.Chim.Acta* **2000**, *407*, 45-52.
11. Hisamoto, H.; Miyashita, N.; Watanabe, K.; Nakagawa, E.; Yamamoto, N.; Suzuki, K. *Sens.Actuators B* **1995**, *29*, 378-85.
12. Alder, J. F.; Ashworth, D. C.; Narayanaswamy, R.; Moss, R. E.; Sutherland, I. O. *Analyst* **1987**, *112*, 1191.
13. Chan, W. H.; Lee, A. W. M.; Kwong, D. W. J.; Tam, W. L.; Wang, K. M. *Analyst* **1996**, *121*, 531-34.
14. Morf, W. E.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1990**, *62*, 738-42.
15. Kim, K. H.; Minamitani, H.; Hisamoto, H.; Suzuki, K.; Kang, S. *Anal.Chim.Acta* **1997**, *343*, 199-208.
16. Siswanta, D.; Hisamoto, H.; Sato, S.; Matsumoto, Y.; Koike, Y.; Yamamori, S.; Suzuki, K. *Anal.Sci.* **1997**, *13*, 429-35.
17. Zhang, W.; Jenny, L.; Spichiger-Keller, U. E. *Anal.Sci.* **2000**, *16*, 11-18.
18. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *481*, 139-48.
19. Lerchi, M.; Reitter, E.; Simon, W.; Pretsch, Ernoe; Chowdhury, A.; Kamata, S. *Anal.Chem.* **1994**, *66*, 1713-17.

20. Lerchi, M.; Orsini, F.; Cimermam, Z.; Pretsch, E. *Anal.Chem.* **1996**, *68*, 3210-14.
21. Lerchi, M.; Bakker, E.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1534-40.
22. Alizadeh, N.; Moemeni, A.; Shamsipur, M. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *464*, 187-96.
23. Hisamoto, H.; Kim, K. H.; Manabe, Y.; Sasaki, K.; Minamitani, H.; Suzuki, K. *Anal.Chim.Acta* **1997**, *342*, 31-39.
24. Hauser, P. C.; Litten, J. C. *Anal.Chim.Acta* **1994**, *294*, 49-56.
25. Krause, C; Werner, T.; Wolfbeis, O. S. *Anal.Sci.* **1998**, *14*, 163-67.
26. Teltng-Diaz, Martin; Bakker, E. *Anal.Chem.* **2002**, *74*, 5251-56.
27. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
28. Laba, C.; Haas, H.; Jodkowski, J.; Lange, A. *Arch.Immun.Ther.Exper.* **1986**, *34*, 111-27.
29. Plikaytis, B. D.; Turner, S. H.; Gheesling, L. L.; Carlone, G. M. *J.Clin.Microbiol.* **1991**, *29*, 1439-46.
30. Clark, James A.; El Shaarawi, Abdul *Appl.Environ.Microbiol.* **1993**, *59*, 380-88.
31. Hurlbut, T. A., III; Littenberg, B. *Am.J.Clin.Pathol.* **1991**, *96*, 582-88.
32. de Aguiar, P. F.; Bourguignon, B.; Khots, M. S.; Penninckx, W.; Massart, D. L. *Quim.Anal.* **1993**, *12*, 177-82.
33. de Aguiar, P. F.; Jimidar, M.; Massart, D. L. *Acta Chromatogr.* **1997**, *7*, 35-48.
34. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernandez Ramos, M. D.; Al Natsheh, Muneer *Sens.Actuators B* **2003**, *B88*, 217-22.
35. Bakker, E.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1805-12.
36. Seiler, K.; Simon, W. *Sens.Actuators B* **1992**, *6*, 295-98.
37. Seiler, K.; Wang, K.; Bakker, E.; Morf, W. E.; Rusterholz, B.; Spichiger-Keller, U. E.; Simon, W. *Clin.Chem.* **1991**, *37*, 1350-55.
38. Bakker, E.; Willer, M.; Pretsch, E. *Anal.Chim.Acta* **1993**, *282*, 265-71.

39. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.
40. Anand, K. and Koon-Wah, L. Reflective particle-containing analysis composition and device. EP Patent 0141647. 1985.
41. Curme, H. G.; Columbus, R. L.; Dappen, G. M.; Eder, T. W.; Fellows, W. D.; Figueras, J.; Glover, C. P.; Goffe, C. A.; Hill, D. E.; Lawton, W. H.; Muka, E. J.; Pinney, J. E.; Rand, R. N.; Sanford, K. J.; Wu, T. W. *Clin.Chem.* **1978**, *24*, 1335-42.
42. Rodbard, D.; Hutt, D. M. 1974 165-92.
43. O'Neill, S.; Conway, S.; Twelmeyer, J.; Egan, O.; Nolan, K.; Diamond, D. *Anal.Chim.Acta* **1999**, *398*, 1-11.
44. Suzuki, K.; Watanabe, K.; Matsumoto, Y.; Kobayashi, M.; Sato, S.; Siswanta, D.; Hisamoto, H. *Anal.Chem.* **1995**, *67*, 324-34.
45. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
46. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* **1982**, *136*, 363-68.



## **CAPÍTULO 6**

# **DIFERENTES MEDIDAS ESPECTRALES PARA LA DETERMINACIÓN DE POTASIO MEDIANTE SENSORES DESECHABLES**



## **DIFERENTES MEDIDAS ESPECTRALES PARA LA DETERMINACIÓN DE POTASIO MEDIANTE SENSORES DESECHABLES**

### **Resumen**

Se estudia el empleo de diferentes tipos de medidas espectrales sobre Membranas desechables para la determinación rápida de K(I) en aguas. En concreto, se comparan medidas de absorción de radiación por transmisión (espectrofotométricas) y medidas por reflexión (espectrorradiométricas). En los resultados se obtiene una buena correlación entre la concentración de K(I) y la reflectancia/absorbancia a una determinada longitud de onda: 482 nm. Las incertidumbres instrumentales han sido estimadas como la desviación estándar de 3 medidas independientes. Los resultados muestran que las incertidumbres menores corresponden a las medidas espectrorradiométricas. La medida del color es un método rápido y simple que proporciona un parámetro útil en control de calidad de potasio. Además, hemos aplicado la linealización, desarrollada del capítulo anterior, de la curva de respuesta de tipo sigmoideal para incrementar el rango de aplicabilidad cuando se usan medidas espectrorradiométricas.

A partir de las medidas espectrorradiométricas, calculando las correspondientes diferencias del color hemos estudiado la posible discriminación visual de las diferentes concentraciones de K(I), mediante estas membranas desechables. Se ha observado que mediante discriminación visual teóricamente es posible establecer seis grupos de concentraciones, obteniendo en consecuencia una escala graduada de color para esta clase de sensor. Es interesante la posibilidad de utilizar la discriminación cromática humana como detector de la concentración de K(I), por cuanto ello significa en cuanto a rapidez, sencillez y economía del proceso de detección.

## 1. Introducción

Una de las demandas actuales es la introducción de controles medioambientales o de salud rigurosos, que sean simples, rápidos, y eficaces, y que originen una información fiable. Este tipo de sistemas rápidos de análisis que se pueden llevar a cabo in situ, evita el uso de instrumentación compleja y esto hace que sea una metodología atractiva para los usuarios. Además, con frecuencia la evaluación del diagnóstico se suele realizar por una simple inspección visual que no genera dificultades adicionales para el usuario.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que una discriminación visual sólo alcanza resultados analíticos preliminares, siendo así, un resultado rápido. En muchos casos, la información que proporcionan es suficiente para el propósito, dando al usuario una visión global del problema y ayudándole a decidir en primera instancia. Pero para obtener la confirmación de un resultado, es necesario un método químico alternativo más específico.

De las formas de llevar a cabo este tipo de métodos, una de las más interesantes es mediante membranas desechables, también llamados tiras reactivas. Estas membranas tridimensionales<sup>1</sup>, denominadas “*bulk membranes*”, consisten generalmente en delgadas almohadillas o finas películas que contienen todos los reactivos necesarios para un ensayo situados dentro de la almohadilla o film y en estado sólido<sup>2</sup>. Estas zonas reactivas o matrices se encuentran adheridas a pequeñas tiras de material plástico o incluso papel de filtro impregnado con los reactivos, que sirven de soporte y permiten su manipulación.

Las membranas desechables permiten llevar a cabo análisis químicos de forma rápida, económica y sin necesidad de personal especializado. Además, no es necesario realizar toma ni tratamiento de muestras, desplazamiento hasta los laboratorios convencionales de análisis, ni hacer uso de una instrumentación de laboratorio más o menos compleja<sup>3,4</sup>.

En concreto, el desarrollo de métodos para la determinación de K(I) ha recibido especial atención en análisis clínicos, pues el nivel de dicho ión en fluidos biológicos, junto con otros metabolitos, puede indicar ciertos trastornos metabólicos. La determinación rutinaria de K(I) se realiza por fotometría de llama, potenciometría con electrodos selectivos de iones<sup>5,6</sup>, o con membranas desechables tanto visuales como de tipo óptico por medida de reflectancia difusa<sup>7</sup>.

En este capítulo realizamos un estudio comparativo de diferentes tipos de medidas espectrales, espectrofotométricas y espectrorradiométricas, sobre membranas desechables de tipo óptico para la determinación rápida de K(I) en aguas. Las medidas espectrofotométricas, están basadas en la medida de absorción de radiación por transmisión<sup>8</sup>. Las medidas espectrorradiométricas están basadas en la medida de la radiación, que procedente de la fuente se refleja principalmente en la superficie de la zona reactiva, pero también en la parte de radiación que atraviesa la zona reactiva, se refleja en el soporte o el fondo sobre el cual está situada la tira, y vuelve a atravesar la zona reactiva (reflexión). Las medidas espectrorradiométricas están muy relacionadas con la percepción visual de la tira que obtendría un observador bajo las mismas condiciones de iluminación.

Hemos estudiado también la posibilidad de valorar visualmente la concentración de K(I) a partir de las diferencias de color percibidas sobre la zona sensora de las membranas desechables. En la bibliografía se encuentran distintos métodos de análisis ópticos basados en el análisis del color<sup>9,10</sup>.

## **2. Experimental**

### **2.1. Instrumentación y software**

Para realizar las medidas espectrofotométricas de las membranas

desechables se utilizó un espectrofotómetro de diodos en fila HP 8453(Nortwalk, CT, EE.UU.) provisto de un portamuestras de diseño propio<sup>11</sup> como se indica en el capítulo de metodología de esta Memoria. Las Membranas desechables se prepararon en un sistema centrífugo de giro variable de diseño propio de acuerdo con Seiler *et al.*<sup>12</sup>.

Las medidas espectrorradiométricas se hicieron mediante un espectrorradiómetro PR-704 de PhotoResearch (Chatsworth, CA. EE.UU). Las membranas desechables se situaron en una cabina VeriVide CAC Portable (Leslie Hubble Limited, Leicester, Reino Unido) provista con las fuentes luminosas D65, F y TL84 que simulan, respectivamente, a los iluminantes D65, A y F11 de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE)<sup>13</sup>. Para nuestras medidas, hemos utilizado la fuente luminosa D65, que simula el iluminante D65 dentro de las tolerancias prescritas por el British Standard BS 950 Part1 (BS 950-1, 1967). Para las medidas se situó el espectrorradiómetro a 45° respecto de la normal a la superficie de la membrana. Las tiras desechables se situaron sobre la base de la cabina, pintada con el mismo color gris estándar que las paredes de la misma. Este fondo va a influir en las medidas puesto que las tiras no son completamente opacas. La radiancia de la fuente de luz fue medida sobre una superficie de BaSO<sub>4</sub> (tomado como difusor perfecto) situado en las mismas condiciones que las membranas desechables. Esta medida se ha tomado como blanco de referencia en los cálculos de las coordenadas colorimétricas CIELAB<sup>13</sup>. Se realizaron tres medidas independientes para cada membrana desechable y para el blanco de referencia.

Los programas utilizados para el tratamiento de datos y el ajuste de datos experimentales fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU., 1993 y GraphMatica para Win32 v. 1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido. Mathematica v. 5.0, 1988-2003 (Wolfram Research) y Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE.UU.) para cálculos generales junto con OriginPro 7.5 (Northampton, MA, EE.UU.).

## **2.2. Reactivos y materiales.**

Todas las disoluciones, reactivos y materiales empleados fueron los mismos que los empleados en el Capítulo 4 sección 2.1 de esta Memoria de Doctorado.

## **2.3. Preparación de la membrana sensora y sistema de medida**

La preparación de la zona sensora es igual a la ya descrita en la sección 2.2 del Capítulo 4 de esta Memoria.

## **2.4. Condiciones de Medida**

La respuesta del sensor desechable para potasio y dureza fue evaluada por adición de 9 mL de la disolución a ensayar en un tubo de plástico de polietileno junto con 1 mL de disolución tampón de pH 9,0. A continuación, se introduce el sensor desechable en el tubo durante 5 minutos sin agitación. Tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución y tras sacudirla se introduce en un portamuestras de fabricación propia para medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila o se coloca en la cabina para las medidas con el espectrorradiómetro.

## **2.5. Cálculos**

### **2.5.1. Medidas de Absorbancia**

Una vez equilibrado el sensor durante 5 minutos con una disolución patrón dentro del tubo de plástico, se introduce la membrana en el porta muestras de fabricación propia<sup>14</sup> para el espectrofotómetro de diodos en fila, se realiza la

medición del espectro de absorbancia. La variación del espectro de absorción de la tira reactiva con la concentración de K(I) se muestra en la Figura 1, que indica la presencia de un isobéptico a 580 nm mostrando la existencia de un equilibrio ácido-base. Del espectro de absorbancia utilizamos el valor de absorbancia media a 660 nm. Como señal analítica utilizamos el grado de protonación del cromoióforo,  $\alpha_{ef}$  que es una absorbancia normalizada<sup>15</sup>, definida según:

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_{base}}{A_{tampón} - A_{base}} \quad (\text{ec. 6.1})$$

donde  $A_{base}$  es la absorbancia de la tira después de introducirla en NaOH 0,01 M;  $A_{tampón}$  es la absorbancia después de introducirla en la disolución reguladora y A es la absorbancia de la tira en el problema conteniendo K(I).

El uso del parámetro  $\alpha_{ef}$ , en lugar de  $\alpha$  es debido a que el cromoióforo presente no se puede protonar de forma completa ( $1 - \alpha \cong 0.9$ ) al pH 9.0 de trabajo. De esta manera, utilizamos el valor de absorbancia de la membrana equilibrada con tampón, en lugar de la absorbancia de la membrana equilibrada en medio ácido  $A_{HCl}$ , como una medida del cromoióforo en forma protonada, con el propósito de expandir esta absorbancia efectiva normalizada entre los valores de 0 y 1.

Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-Hückel<sup>16</sup>. Para corregir la absorbancia del fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar, además para las medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila, la precisión mejora una media de un 2% cuando el valor de la línea base, medido a 800 nm, es sustraído en todos los casos. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no necesitaron ser acondicionadas antes de su uso.

## 2.5.2. Medidas de reflectancia

En la Figura 6.1.b se muestra la reflectancia espectral de membranas desechables tratadas de forma análoga a lo descrito en el apartado anterior. Esta reflectancia ha sido calculada como el cociente de la radiancia espectral de las membranas entre la radiancia espectral del blanco de referencia, utilizando la fuente luminosa D65. En la Figura 6.1.b se observa un isobéptico a 580 nm y una modificación de señal con la concentración de K(I) a 482 nm. Como parámetro analítico se utiliza una reflectancia normalizada definida por la ecuación (6.2), siendo el significado de los subíndices igual al anterior en la ecuación 6.1.

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{r - r_{base}}{r_{tampón} - r_{base}} \quad (\text{ec. 6.2})$$

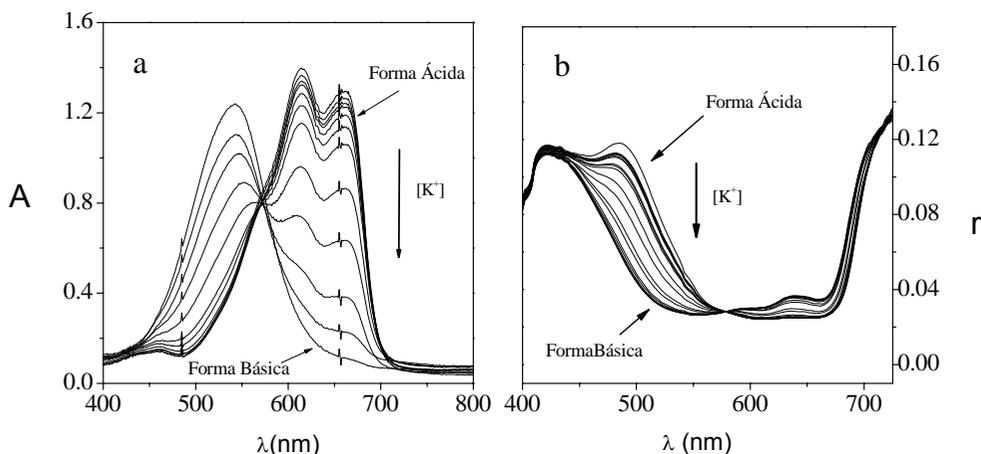


Figura 6.1. Espectros de absorción(a) y reflectancia (b) para diferentes concentraciones de K(I). La forma básica tiene un máximo de absorción a 540 nm y la ácida a 610 y 660 nm; y en reflectancia para la forma básica a 638 nm y para la ácida a 482 y 424 nm.

Hemos observado una desviación en las reflectancias calculadas, por lo que hemos corregido las reflectancias haciendo una sustracción de la línea base a 580 nm ya que es a esa longitud de onda donde todos los espectros presentan un valor similar.

### 2.5.3. Análisis del color.

Hemos estudiado el cambio de color producido en la zona sensora de las membranas desechables y cómo se relaciona con la concentración de K(I) de la disolución donde se ha sumergido la tira reactiva. Además, analizamos si sería posible una valoración visual de las tiras a partir del cambio de color observado en las mismas. Para realizar esta valoración visual se observan las tiras iluminadas por la fuente luminosa, siendo la luz de la fuente reflejada en la membrana, y no la transmitida, la que alcanza la retina del observador. Por tanto, entre las medidas espectrofotométricas y espectrorradiométricas (por transmisión), son estas últimas las que mejor se correlacionan con la observación visual de las tiras desechables que haría un sujeto en las mismas condiciones de iluminación. A partir de las medidas espectrorradiométricas calculamos la reflectancia espectral de cada membrana como el cociente espectral, entre la radiancia de la membrana y la radiancia de la fuente (medida a través del blanco de referencia). Al igual que el análisis realizado en el apartado 2.5.2, hemos trabajado con reflectancias corregidas para el cálculo de las coordenadas cromáticas.

A partir de la reflectancia o transmitancia (dependerá del tipo de muestra) espectral de una muestra, la distribución espectral de la fuente que la ilumina, y datos referentes al observador, es posible calcular unas coordenadas cromáticas de la muestra. Debido al carácter trivariante del color se necesitan 3 valores para especificarlo unívocamente<sup>17;18</sup>. Usualmente se utilizan los valores triestímulo para determinar un estímulo cromático. Los valores triestímulo están definidos por las ecuaciones siguientes<sup>13;17;18</sup>:

$$X_{10} = k \sum_{\lambda} R_{\lambda} S_{\lambda} \bar{x}_{\lambda,10} \Delta\lambda \quad (\text{ec.6.3})$$

$$Y_{10} = k \sum_{\lambda} R_{\lambda} S_{\lambda} \bar{y}_{\lambda,10} \Delta\lambda \quad (\text{ec.6.4})$$

$$Z_{10} = k \sum_{\lambda} R_{\lambda} S_{\lambda} \bar{z}_{\lambda,10} \Delta\lambda \quad (\text{ec.6.5})$$

$$\text{Donde: } k = \frac{100}{\sum_{\lambda} S_{\lambda} \bar{y}_{\lambda,10} \Delta\lambda}, R_{\lambda} \text{ es la reflectancia o reflectancia espectral de}$$

la muestra (calculada en nuestro caso),  $S_{\lambda}$  es la distribución espectral de la fuente luminosa (medida con el espectrorradiómetro del blanco de referencia),  $R_{\lambda} S_{\lambda}$  es la radiancia espectral de la muestra bajo la fuente luminosa (corresponde con la medida directa del espectrorradiómetro) y  $\bar{x}_{\lambda,10}$ ,  $\bar{y}_{\lambda,10}$ ,  $\bar{z}_{\lambda,10}$  son las funciones de mezcla del observador, que están relacionadas con los receptores retinianos (principalmente con los conos, pero con alguna interacción de los bastones). Se utilizan los valores tabulados para un Observador Patrón, en nuestro caso el Observador CIE 1964, puesto que las muestras subtenden un ángulo mayor de  $4^{\circ}$  desde la posición de observación y medida<sup>17,18</sup>. Este es el origen del subíndice 10 que acompaña a las variables.

Como fuente luminosa hemos utilizado los datos espectrales<sup>13</sup> que proporciona la CIE de los iluminantes D65 y A, que corresponden a luz día y luz interior incandescente respectivamente. Estos iluminantes constituyen unos estándares que no siempre pueden alcanzarse escrupulosamente con fuentes de iluminación reales, pero que permiten que los resultados obtenidos sean independientes de la iluminación específica de cada laboratorio. El iluminante D65 es el más utilizado, a la vez que el recomendado para el uso de las fórmulas de diferencia de color que utilizaremos más adelante (CIELAB y CIEDE2000). Corresponde a la iluminación natural en un día despejado (luz-día con una temperatura de color correlacionada de 6500 k). Además hemos calculado las coordenadas de color bajo el iluminante A, que corresponde al caso en que el observador realiza la valoración visual de las tiras en el interior, bajo una iluminación incandescente<sup>17</sup>.

Actualmente no son los valores tristímulo, sino las coordenadas CIELAB<sup>13;17;18</sup>, las coordenadas más utilizadas para especificar el color de una muestra. Además son las coordenadas CIELAB las actualmente recomendadas por

la CIE<sup>13</sup>. Se calculan a partir de los valores triestímulo mediante las ecuaciones siguientes:

$$L^*_{10} = 116 f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - 16 \quad (\text{ec.6.6})$$

$$a^*_{10} = 500 \left[ f\left(\frac{X}{X_n}\right) - f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) \right] \quad (\text{ec.6.7})$$

$$b^*_{10} = 200 \left[ f\left(\frac{Y}{Y_n}\right) - f\left(\frac{Z}{Z_n}\right) \right] \quad (\text{ec.6.8})$$

donde:

$$f(I) = \begin{cases} I^{1/3} & \text{cuando } I > 0.008856 \\ 7.787 \cdot I + \frac{16}{116} & \text{en caso contrario} \end{cases} \quad (\text{ec.6.9})$$

y los valores sub-n corresponden a los valores triestímulo del blanco de referencia.

También se definen, como alternativa a  $a^*_{10}$  y  $b^*_{10}$ , las coordenadas croma y ángulo de tono:  $C^*_{ab,10}$  y  $h_{ab,10}$  respectivamente. El croma y el ángulo de tono coordenadas son las coordenadas cilíndricas correspondientes a las coordenadas cartesianas  $a^*_{10}$  y  $b^*_{10}$ :

$$C^*_{ab,10} = \sqrt{(a^*_{10})^2 + (b^*_{10})^2} \quad (\text{ec.6.10})$$

$$h_{ab,10} = \arctg\left(\frac{b^*_{10}}{a^*_{10}}\right) \quad (\text{ec.6.11})$$

Con la claridad, el croma y el ángulo de tono ( $L^*_{10}$ ,  $C^*_{ab,10}$  y  $h_{ab,10}$ , respectivamente) se tiene especificada colorimétricamente cada una de las membranas. Además, estas coordenadas están más relacionadas con los atributos psicológicos de color a los que corresponden (claridad, croma y tono)<sup>19</sup> que  $a^*_{10}$  y  $b^*_{10}$ .

Una vez caracterizadas colorimétricamente las membranas, analizamos cómo varían cada una de las coordenadas de color con la concentración de K(I), pues por los cambios en las reflectancias espectrales son esperados cambios en las coordenadas de color.

Por otro lado, hemos estudiado las diferencias de color entre las membranas que han reaccionado a concentraciones de K(I) consecutivas. Las diferencias de color pueden calcularse de forma euclídea en el espacio de color definido por CIELAB, mediante la fórmula:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*_{10})^2 + (\Delta a^*_{10})^2 + (\Delta b^*_{10})^2} \quad (\text{ec.6.12})$$

Sin embargo, para obtener mejor acuerdo entre los resultados obtenidos por la fórmula y las valoraciones visuales, la CIE recomienda utilizar la siguiente ecuación, denominada CIEDE2000<sup>20</sup>:

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H'}{K_H S_H}\right)} \quad (\text{ec.6.13})$$

En esta ecuación se introducen una serie de modificaciones sobre la ecuación euclídea de CIELAB, para mejorar la correlación entre las diferencias de color calculadas y percibidas, siendo estas mejoras estadísticamente significativas<sup>21</sup>.

Una vez calculadas las diferencias de color entre muestras consideraremos 1 unidad CIEDE2000 como el valor mínimo para que la diferencia de color pueda ser percibida en condiciones normales<sup>22</sup>. Aunque este valor es supraumbral y es posible percibir diferencias de color por debajo, en la práctica tomaremos 1 unidad CIEDE2000 como el valor para el cual las diferencias de color son claramente percibidas.

### 3. Resultados y discusión

El equilibrio de cambio iónico que tiene lugar en el caso del sensor desechable para potasio ya se ha descrito en el Capítulo 5, sección 2.1 de esta Memoria de Doctorado para el modelo sigmoideal y en la sección 2.2 para el modelo lineal.

#### 3.1. Caracterización analítica del método

##### 3.1.1. *Modelo sigmoideal*

###### 3.1.1.1. *Medidas Espectrorradiométricas*

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ), y la actividad de K(I), se prepararon 18 disoluciones patrón conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y 0,87 M en actividades ( $1 \cdot 10^{-8}$  y 1,5 M en concentraciones). Se analizaron 3 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada, obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  (Figura 6.2).

El rango dinámico lineal viene dado por la zona central de la curva de calibrado, la cual se establece como una recta mediante un ajuste por medio de mínimos cuadrados, verificando su correcto ajuste al modelo lineal mediante la aplicación del test de fallo de ajuste<sup>14</sup>.

Para definir el rango de medida se prepararon 2 series de disoluciones patrón, una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal (8 patrones, 3 réplicas de cada uno), en un rango de concentraciones comprendido entre  $4,4 \cdot 10^{-6}$  y  $8,5 \cdot 10^{-3}$  en actividades ( $5 \cdot 10^{-6}$  y  $1 \cdot 10^{-2}$  M en concentraciones); y otra serie de disoluciones patrón en la zona de mínima pendiente del sigmoide con baja actividad (5 patrones, 3 réplicas de cada uno) entre  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y  $8,7 \cdot 10^{-7}$  en actividades ( $10^{-8}$  y

$1 \cdot 10^{-6}$  M en concentración). Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, respectivamente:

$$1-\alpha_{ef} = -0,5425 - 0,2716 \log a_{K^+} \text{ .Máxima pendiente} \quad (\text{ec.6.14})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,7328 - 0,0332 \log a_{K^+} \text{ . Mínima actividad} \quad (\text{ec.6.15})$$

La precisión de las medidas espectrorradiométricas (expresada como la desviación estándar relativa de 3 medidas independientes) se realizó con un estudio a 3 niveles de actividad usando disoluciones de K(l)  $2,19 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,19 \cdot 10^{-4}$  y  $2,17 \cdot 10^{-3}$  ( $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-4}$ , y  $2,5 \cdot 10^{-3}$  en concentración) que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado seis veces. Obteniendo DER, expresadas como logaritmo de la actividad del potasio (Tabla 6.1). En dicha Tabla aparecen además los valores obtenidos en los mismos parámetros analíticos utilizando un espectrofotómetro de diodos en fila.

De la intersección de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD, mostrado en la Tabla 6.1. Como límite superior del rango de medida hemos usado el valor más alto probado que caiga dentro del rango lineal, que es 10 mM.

### 3.1.1.2. Medidas Espectrofotométricas.

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ), y la actividad de K(l), haciendo las medidas mediante un espectrofotómetro de diodos en fila, se prepararon las mismas 18 disoluciones patrón que en la sección anterior, procediendo de igual manera en las zonas de máxima pendiente y en la de baja actividad.. Se analizaron 3 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada, obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  (Figura 6.2).

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, respectivamente:

$$1-\alpha_{ef} = -0,4327 - 0,2528 \log a_{K^+} \text{ . Máxima pendiente} \quad (\text{ec.6.16})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,9239 - 0,0003 \log a_{K^+} \text{ . Mínima actividad} \quad (\text{ec.6.17})$$

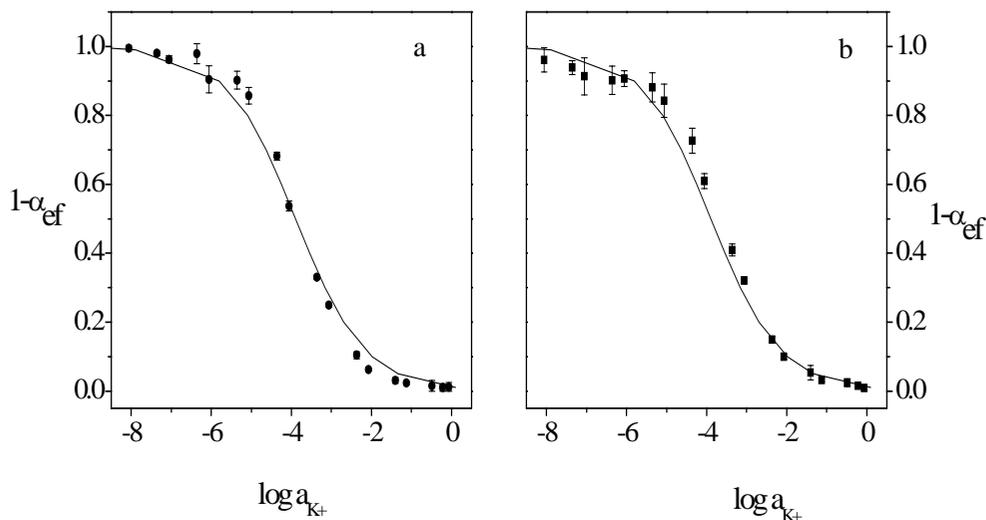


Figura6.2. Ajuste del modelo teórico a los datos experimentales espectrorradiométricos (curva a) y espectrofotométricos (curva b).

Tabla 6.1. Parámetros analíticos obtenidos para el modelo sigmoidal usando un espectrorradiómetro y un espectrofotómetro de diodos en fila.

Parámetro	Modelo Sigmoidal	
	Espectrorradiómetro	Diodos
Ordenada	-0,5425	-0.4327
Desviación estándar de la ordenada	0,0247	0.0146
Pendiente	-0,2716	-0.2528
Desviación estándar de la pendiente	0,0063	0.0038
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9708	0.9846
Linealidad on-line	98,8	98.7
DER	$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	2,1
	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M	1,7
	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M	4,6
límite de detección <sup>b</sup>	0,005	0,006
rango dinámico lineal <sup>b</sup>	0,005-10	0.011-50

a: DER% de  $\log a_{K^+}$  ; b: mM ;

La precisión se evaluó a los mismos niveles que en el apartado anterior, y el rango lineal fue calculado por el mismo procedimiento resultando, esto es, de la intersección de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD, mostrado en la Tabla 6.1. Como límite superior del rango de medida hemos usado el valor más alto probado que caiga dentro del rango lineal, que es 50 mM. En la Tabla 6.1 aparecen éstos y otros parámetros analíticos para las medidas espectrofotométricas.

### 3.1.2. Modelo lineal

#### 3.1.2.1. Medidas Espectrorradiométricas

Para caracterizar la relación lineal entre nuestro parámetro analítico  $\log(a_{ef}/(1-\alpha_{ef}))$  obtenido mediante el espectrorradiómetro, se usó el mismo conjunto de disoluciones patrón que para el modelo sigmoideal, realizando 3 replicas igualmente, con distintos sensores desechables.

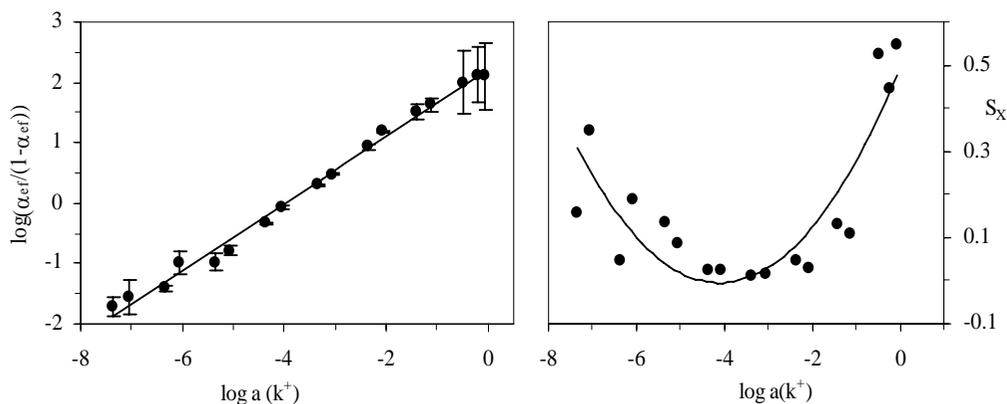


Figura6.3. Curva de respuesta linealizada para sensores desechables que responden a  $k(l)$  junto con su curva de varianza. Medidas Espectrorradiométricas.

La precisión fue estudiada en todo el rango de aplicación, observando que la varianza aumenta en los extremos del rango analítico. La Figura 6.3 muestra la

función lineal de respuesta obtenida junto con la curva de varianza apropiada, la cual sigue un comportamiento parabólico como cabía esperar.

La precisión fue estudiada a las mismas concentraciones que para el modelo sigmoideal, de  $K(I)$   $2,19 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,19 \cdot 10^{-4}$  y  $2,17 \cdot 10^{-3}$  ( $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-4}$ , y  $2,5 \cdot 10^{-3}$  en concentración) que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado seis veces. Obteniendo valores de DER expresadas como logaritmo de la actividad del potasio (Tabla 6.2).

El límite de detección en el modelo lineal se calculó mediante la ecuación 5.17 presentada en el Capítulo 5 de esta Memoria. En dicha Tabla aparecen además los valores obtenidos para otros parámetros analíticos.

### 3.1.2.2. *Medidas Espectrofotométricas*

Para verificar la validez del modelo lineal teórico (ecuación 5.13 correspondiente al Capítulo 5), se prepararon 10 disoluciones patrón para potasio conteniendo  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y  $0,87$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-8}$  y  $1,5$  M en concentraciones) de potasio, respectivamente. Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez. La Figura 5.4, correspondiente al Capítulo 5 de esta Memoria muestra la función lineal de respuesta obtenida junto con la curva de varianza apropiada, la cual sigue un comportamiento parabólico como cabía esperar.

La precisión fue estudiada a las mismas concentraciones que para el modelo sigmoideal, de  $K(I)$   $2,19 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,19 \cdot 10^{-4}$  y  $2,17 \cdot 10^{-3}$  ( $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-4}$ , y  $2,5 \cdot 10^{-3}$  en concentración) que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 10 veces. Obteniendo valores de DER expresadas como logaritmo de la actividad del potasio (Tabla 6.2).

El límite de detección en el modelo lineal se calculó mediante la ecuación 5.17 presentada en el Capítulo 5 de esta Memoria). En dicha Tabla aparecen además los valores obtenidos para otros parámetros analíticos.

Tabla 6.2. Parámetros analíticos obtenidos para el modelo lineal usando un espectrorradiómetro y un espectrofotómetro de diodos en fila.

Parámetro	Modelo Lineal	
	Espectrorradiómetro	Diodos
Ordenada	2,188	1,970
Desviación estándar de la ordenada	0,0573	0,053
Pendiente	0,5422	0,481
Desviación estándar de la pendiente	0,0130	0,011
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	97,3 %	95,8 %
Linealidad on-line	97,7 %	97,7 %
DER	$2,5 \cdot 10^{-5}$ M	2,8
	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M	1,5
	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M	3,9
límite de detección <sup>b</sup>	$1,22 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-4}$
rango dinámico lineal <sup>b</sup>	$1,22 \cdot 10^{-4} - 1,5 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^{-4} - 1,5 \cdot 10^3$

a: DER% de  $\log a_{K^+}$ ; b: mM ;

Las constantes globales de equilibrio,  $\log K_{\text{extr}}$ , calculadas a partir de la ordenada de las ecuaciones linealizadas (ec.5.13, correspondiente al capítulo 5 de esta Memoria) fueron de -5,06 para las medidas espectrofotométricas y de -4,6 para medidas espectrorradiométricas.. Los valores calculados empleando la aproximación de mínimos cuadrados para los puntos centrales del sigmoide<sup>14</sup> fueron de  $5,45 \pm 0,31$  para medidas de absorbancia y  $5,31 \pm 0,27$  para medidas de reflectancia. Considerando las incertidumbres experimentales observamos que ambos métodos ostentan una precisión similar.

Con el objeto de demostrar la veracidad de los resultados obtenidos mediante el sistema de medida propuesto, se preparó un experimento con 3

membranas diferentes trabajando a cuatro niveles de actividad  $4.4 \cdot 10^{-5}$ ,  $8.7 \cdot 10^{-5}$ ,  $4.4 \cdot 10^{-4}$  y  $8.7 \cdot 10^{-4}$ , ( $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$  y  $10^{-3}$  en concentración).

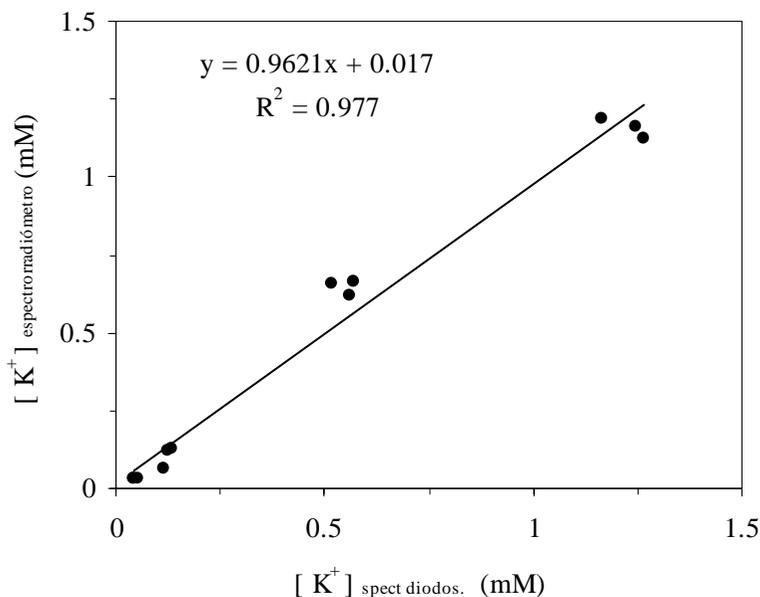


Figura 6.4. Veracidad del procedimiento instrumental. Eje X: resultados obtenidos por un espectrofotómetro de diodos en fila. Eje Y: Resultados obtenidos por el espectrorradiómetro. Se muestran los datos experimentales (círculos) junto con su línea de tendencia.

Los sensores se midieron tanto con el espectrorradiómetro como mediante el espectrofotómetro de diodos en fila, siendo éste último tomado como método de referencia y usando en cada sistema su propio parámetro analítico junto con su función de calibración. Los resultados, expresados en mM, del espectrorradiómetro fueron representados junto con aquellos provenientes de la medida con el espectrofotómetro de diodos en fila, esperando una línea recta de pendiente unidad y ordenada en el origen cero, ver Figura 6.4. Esta línea de regresión fue chequeada simultáneamente – usando el test de la  $F^{23}$ , donde la pendiente no difiere significativamente de 1 y la ordenada en el origen no presenta diferencias significativas de cero. Lo resultados obtenidos muestran que efectivamente no hay diferencias significativas para ambas condiciones. ( $F_{\text{cal}}$ : 0,002;  $F_{\text{teo}}$ : 2,69;  $\alpha$ : 0,05; grados de libertad: 12).

### 3.2. Análisis del color

Hemos estudiado el cambio en las coordenadas del color de las membranas, mediante las coordenadas CIELAB ( $L^*_{10}$ ,  $C^*_{ab,10}$ , y  $h_{ab,10}$ ), ( claridad, croma y ángulo de tono) cuando han reaccionado en disoluciones con distinta concentración de K(I), o equivalentemente con distinta actividad.

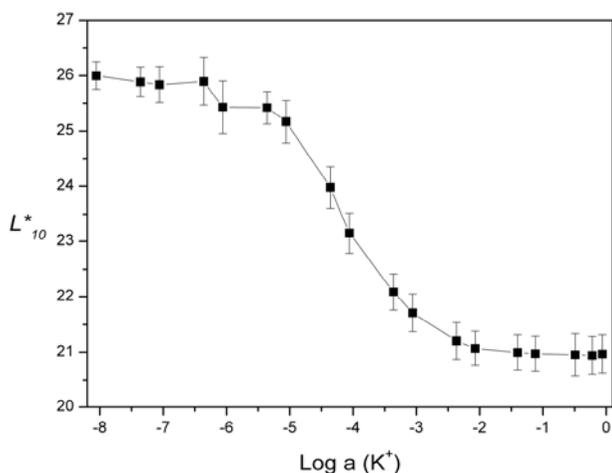


Figura 6.5. Variación de la coordenada L\* (Claridad) con el logaritmo de la actividad del potasio.

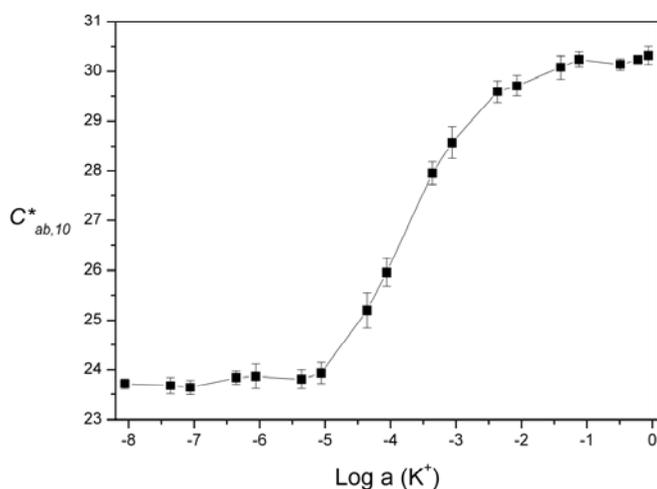


Figura 6.6. Variación de la coordenada C\* (Croma) con el logaritmo de la actividad del potasio.

En las Figuras 6.5, 6.6 y 6.7 se muestran el cambio en cada una de las coordenadas con el logaritmo de la actividad de K(I). También se muestra la desviación estándar de las 3 medidas realizadas en los segmentos de error.

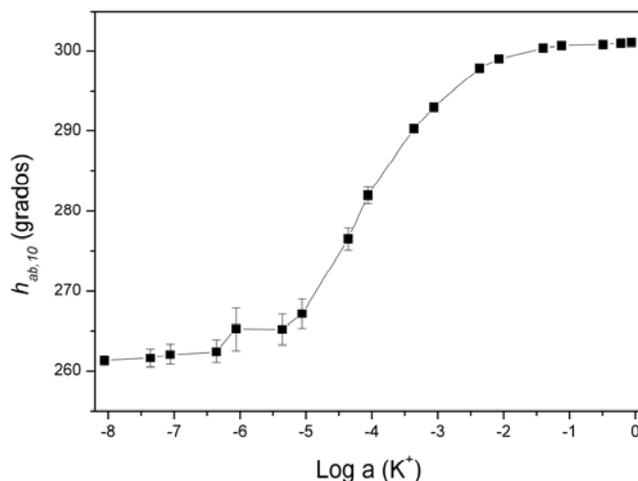


Figura 6.7. Variación de la coordenada  $h$  (ángulo de tono) con el logaritmo de la actividad del potasio.

En las Figuras 6.5, 6.6 y 6.7 podemos observar que cuando aumenta la actividad, disminuye la claridad de la membrana, y simultáneamente aumenta su croma y ángulo de tono. Este cambio es más acusado para valores de la actividad intermedios y es menor para los valores extremos de actividad y concentración. Como consecuencia las diferencias de color seguirán este mismo comportamiento. Cabe resaltar el hecho de que el cambio en las coordenadas de color sea continuo (creciente o decreciente), puesto que así se tiene una correspondencia biunívoca entre coordenadas de color y concentraciones.

El cambio global de color es consecuencia de los cambios en las coordenadas tal y como hemos analizado. Para calcular una diferencia de color hemos de definir un color de referencia (*standard*) respecto al cual se calcula la diferencia de color de un color de prueba (*batch*). Hemos calculado las diferencias

de color entre cada dos concentraciones consecutivas, tomando como *standard* las coordenadas de la membrana activada por la concentración de más baja actividad, y como *batch* las coordenadas de la membrana que ha reaccionado con la disolución con mayor actividad. Los resultados se muestran en la Figura 6.8.

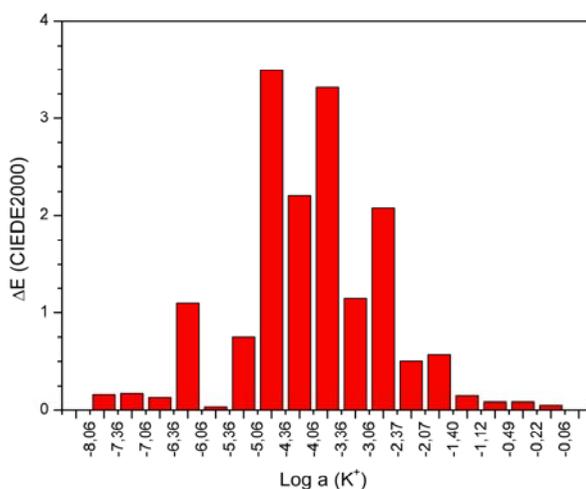


Figura 6.8. Diferencias de color (en unidades CIEDE2000) entre membranas activadas en concentraciones sucesivas, frente al logaritmo de la actividad.

Considerando perceptibles las diferencias de color mayores a 1 unidad CIEDE2000 se puede observar en la Figura que las concentraciones intermedias son claramente perceptibles, mientras que en bajas y altas concentraciones no es posible una discriminación visual. En las 4 primeras columnas de la Tabla 6.3 se tienen los valores numéricos, en unidades CIELAB y CIEDE2000, para diferencias de color entre membranas activadas en concentraciones sucesivas.

Las pequeñas diferencias de color entre concentraciones consecutivas se explican porque los cambios en la reflectancia debidos a las distintas concentraciones se producen básicamente en las longitudes de onda 482 nm, 544 nm y 658 nm; permaneciendo muy parecidos los valores de reflectancia en el resto del espectro, según se observa en la Figura 6.1. Puede plantearse como objeto de

estudio el cambio del cromoforo por otro que permita aumentar las diferencias de color, lo que implica una mejor percepción visual, que podría permitir prescindir de instrumentación de medida.

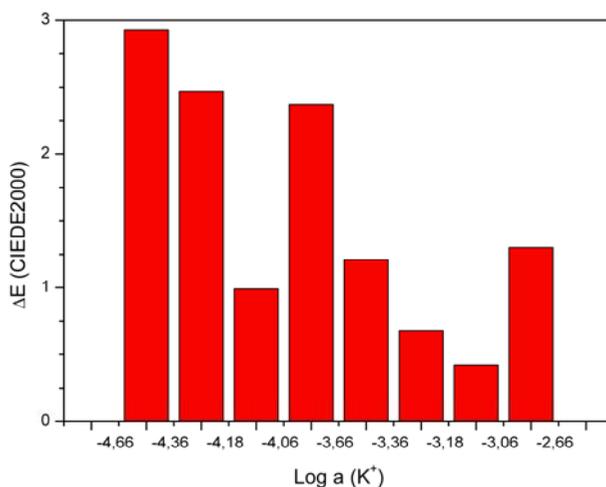


Figura 6.9 Diferencias de color (en unidades CIEDE2000) frente al logaritmo de la actividad entre membranas activadas en concentraciones sucesivas para concentraciones intermedias.

Debido a las grandes diferencias de color que hemos encontrado en la zona central, nos planteamos estudiar más en profundidad dicha zona, por lo que consideramos nuevas disoluciones de K(I) con concentraciones (y log actividad) intermedias a las estudiadas anteriormente. En la Figura 6.9 se muestran las diferencias de color, en unidades CIEDE2000, entre membranas activadas por concentraciones sucesivas, de valores intermedios a los estudiados.

En las 4 últimas columnas de la Tabla 6.3 se muestran las diferencias de color (en unidades CIELAB y CIEDE2000) entre las membranas que se han activado en disoluciones con concentración de K(I) consecutivas, para las disoluciones con las concentraciones intermedias a las analizadas inicialmente.

Tabla 6.3 Valores de concentración,  $1-\alpha_{ef}$  y diferencias de color en unidades CIELAB ( $\Delta E$ ) y CIEDE2000 ( $\Delta E_{00}$ ).

[k+](M)	Log a (K <sup>+</sup> )	$\Delta E$	$\Delta E_{00}$	[k+](M)	Log a (K <sup>+</sup> )	$\Delta E$	$\Delta E_{00}$
$1,0 \cdot 10^{-8}$	-8,06	0,18	0,15				
$5,0 \cdot 10^{-8}$	-7,36						
$5,0 \cdot 10^{-8}$	-7,36	0,19	0,17				
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-7,06						
$1,0 \cdot 10^{-7}$	-7,06	0,25	0,12				
$5,0 \cdot 10^{-7}$	-6,36						
$5,0 \cdot 10^{-7}$	-6,36	1,27	1,10				
$1,0 \cdot 10^{-6}$	-6,06						
$1,0 \cdot 10^{-6}$	-6,06	0,07	0,03				
$5,0 \cdot 10^{-6}$	-5,36						
$5,0 \cdot 10^{-6}$	-5,36	0,88	0,75				
$1,0 \cdot 10^{-5}$	-5,06						
$1,0 \cdot 10^{-5}$	-5,06						
$5,0 \cdot 10^{-5}$	-4,36	4,34	3,49	$2,5 \cdot 10^{-5}$	-4,66		
				$5,0 \cdot 10^{-5}$	-4,36	3,76	2,93
$5,0 \cdot 10^{-5}$	-4,36	2,70	2,21	$5,0 \cdot 10^{-5}$	-4,36	3,36	2,47
				$7,5 \cdot 10^{-5}$	-4,18		
				$7,5 \cdot 10^{-5}$	-4,18		
$1,0 \cdot 10^{-4}$	-4,06			$1,0 \cdot 10^{-4}$	-4,06	1,37	0,99
$1,0 \cdot 10^{-4}$	-4,06	4,52	3,33	$1,0 \cdot 10^{-4}$	-4,06	3,26	2,37
				$2,5 \cdot 10^{-4}$	-3,66		
				$2,5 \cdot 10^{-4}$	-3,66		
$5,0 \cdot 10^{-4}$	-3,36			$5,0 \cdot 10^{-4}$	-3,36	1,63	1,21
$5,0 \cdot 10^{-4}$	-3,36	1,52	1,15	$5,0 \cdot 10^{-4}$	-3,36	0,92	0,68
				$7,5 \cdot 10^{-4}$	-3,18		
				$7,5 \cdot 10^{-4}$	-3,18		
$1,0 \cdot 10^{-3}$	-3,06			$1,0 \cdot 10^{-3}$	-3,06	0,55	0,42
$1,0 \cdot 10^{-3}$	-3,06	2,71	2,07	$1,0 \cdot 10^{-3}$	-3,06	1,69	1,30
				$2,5 \cdot 10^{-3}$	-2,66		
$5,0 \cdot 10^{-3}$	-2,37						
$5,0 \cdot 10^{-3}$	-2,37						
$1,0 \cdot 10^{-2}$	-2,07	0,62	0,50				
$1,0 \cdot 10^{-2}$	-2,07						
$5,0 \cdot 10^{-2}$	-1,40	0,78	0,56				
$5,0 \cdot 10^{-2}$	-1,40						
$1,0 \cdot 10^{-1}$	-1,12	0,23	0,14				
$1,0 \cdot 10^{-1}$	-1,12						
$5,0 \cdot 10^{-1}$	-0,49	0,12	0,08				
$5,0 \cdot 10^{-1}$	-0,49						
1,0	-0,22	0,14	0,08				
1,0	-0,22						
1,5	-0,06	0,10	0,05				

A la vista de las Figuras 6.8 y 6.9 y de la Tabla 6.3 podemos establecer grupos de concentraciones que un observador puede distinguir, bajo una iluminación D65 con la misma geometría que se utilizó en las medidas y que se ha explicado anteriormente.

- Las bajas concentraciones, desde  $1 \cdot 10^{-8}$  hasta  $5 \cdot 10^{-7}$ , son indiscernibles entre ellas, pero sí se diferencian del grupo siguiente.

- Las concentraciones desde  $1 \cdot 10^{-6}$  hasta  $1 \cdot 10^{-5}$  se diferencian del grupo anterior y del siguiente, pero no entre ellas.

- Las concentraciones intermedias  $2,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $7,5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $2,5 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  y  $2,5 \cdot 10^{-3}$  son todas ellas discernibles de las demás.

- Las altas concentraciones, desde  $1 \cdot 10^{-2}$  hasta 1,5, son discernibles de las más bajas, pero indiscernibles entre sí.

A partir de los grupos formados se pueden calcular las coordenadas de color de unos patrones (uno por grupo) con los que se podría comparar la tira reactiva tras activarla en una disolución de K(I), para determinar de forma visual un rango donde se encuentra la concentración de K(I) de la disolución. Mediante este método se puede obtener una primera aproximación rápida, sencilla y barata de la concentración de K(I), que en algunos casos puede ser suficiente.

A continuación estudiamos cómo se modifican los resultados obtenidos cuando la valoración visual de las tiras reactivas se realiza en el interior bajo iluminación incandescente, y no bajo la luz día que simula D65. De forma teórica hemos calculado las coordenadas de cromaticidad utilizando la distribución espectral del iluminante A suministrada por la CIE<sup>R1</sup>. En las Figuras siguientes 6.10 y 6.11 se muestra la variación en las coordenadas de color con la concentración

para el iluminante A y también para el iluminante D65. En la Figura 6.11 se ha tomado la misma escala en las coordenadas  $a^*_{10}$  y  $b^*_{10}$  para facilitar la interpretación de la misma.

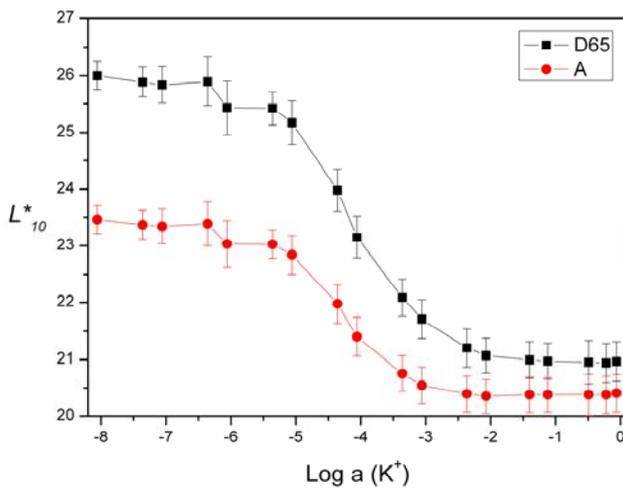


Figura 6.10. Variación en las coordenadas de color (Claridad) con la concentración para el iluminante A y también para el iluminante D65.

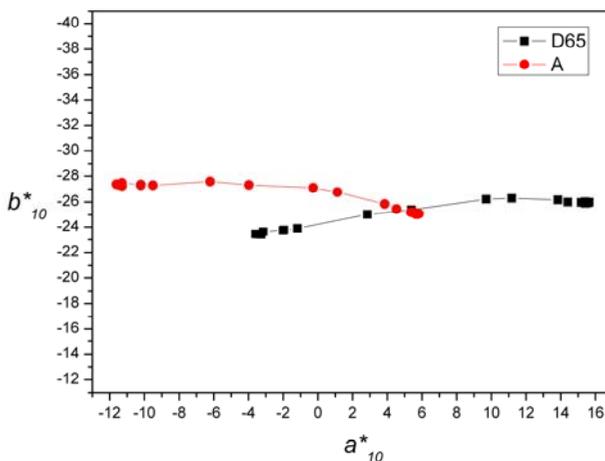


Figura 6.11. Variación en las coordenadas de color con la concentración para el iluminante A y también para el iluminante D65 (el cromatismo y el ángulo de tono son las coordenadas cilíndricas correspondientes a las cartesianas  $a^*_{10}$  y  $b^*_{10}$ ).

En la Figura 6.10 se observa que con el iluminante A la claridad de las tiras disminuye en todos los casos, y también se reduce la variación de la claridad con la concentración. La variación del croma y ángulo de tono con la concentración puede observarse en la Figura 6.11, siendo el croma y el ángulo de tono las coordenadas cilíndricas correspondientes a las cartesianas  $a^*_{10}$  y  $b^*_{10}$  que son las representadas en la Figura. Es muy claro que para ambos iluminantes la variación en el ángulo de tono es mucho más importante que la variación en el croma. Los cambios globales son similares con ambos iluminantes. En ambos casos cuando aumenta la concentración va aumentando el ángulo de tono, provocado principalmente por el aumento de la coordenada  $a^*_{10}$ . La concentración de K(I) provoca cambios más pequeños sobre el croma de las membranas, aumentando cuando se utiliza el iluminante D65, pero disminuyendo en el caso del iluminante A.

Además, los valores iniciales del ángulo de tono difieren entre ambos iluminantes. En el caso del iluminante D65 se parte de un ángulo de tono de unos  $260^\circ$  (que corresponde a un color azulado) y se llega hasta  $300^\circ$  aproximadamente (que corresponde a un color púrpura). Para el iluminante A las membranas que han reaccionado a concentraciones bajas el ángulo de tono es de  $245^\circ$  aproximadamente y se llega a ángulos de tono de  $280^\circ$  aproximadamente para las disoluciones con mayor concentración. En ambos casos el valor del croma está en torno a 27 unidades, que aún sin ser elevado permite una buena discriminación en tono.

En la Figura siguiente 6.12 se muestran las diferencias de color obtenidas bajo el iluminante A, comparadas con las anteriores para las concentraciones estudiadas inicialmente. Según los resultados puede concluirse que se mantienen los grupos de concentraciones distinguibles mediante una valoración visual. Se observa que las diferencias de color disminuyen ligeramente para las concentraciones pequeñas y aumentan ligeramente para las concentraciones más grandes.

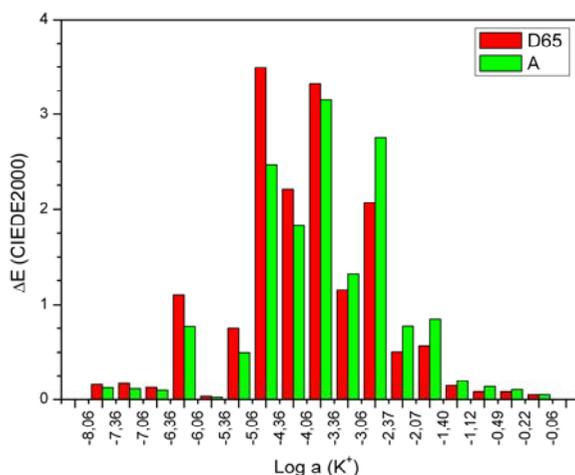


Figura 6.12 las diferencias de color obtenidas bajo el iluminante A, comparadas con las anteriores para las concentraciones estudiadas inicialmente

#### 4. Conclusiones

En este capítulo hemos comprobado la viabilidad de usar medidas espectrorradiométricas para la determinación de potasio haciendo uso de membranas desechables, comparando siempre los resultados obtenidos con las medidas resultantes de un espectrofotómetro de diodos en fila, utilizado como método de referencia. Además se comprueba que las medidas espectrorradiométricas pueden ser linealizadas, con lo que el límite de detección se ve aumentado en 2 órdenes de magnitud. Por otro lado, se han estudiado las diferencias de color existentes en la membrana para todo el rango de concentraciones ensayado, concluyendo que es posible un análisis rápido y semicuantitativo mediante la observación visual de las membranas, que se pueden contrastar con unos patrones o bien una carta de color<sup>R9</sup>. Este análisis es válido tanto bajo iluminación natural como bajo iluminación incandescente.

## 5. Bibliografía

1. Spichiger-Keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, 1 ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 1998.
2. Wang, J. Y. Reagent test device containing hydrophobic barriers. Patente US 4,618,475. 1986.
3. Unger-Heumann, M. *Fresenius J.Anal.Chem.* **1996**, *354*, 803-06.
4. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D. *Integrated Analytical Systems*, Alegret, S., Ed.; Elsevier Science B.V: Amsterdam, 2003; Chapter 3.
5. Bobacka, J.; Ivaska, A.; Lewenstam, A. *Anal.Chim.Acta* **1999**, *385*, 195-202.
6. Lee, D.; Thomas, J. D. R *Talanta* **1994**, *41*, 901-07.
7. Charlton, S. C.; Fleming, R. L.; Zipp, A. *Clin.Chem.* **1982**, *28*, 1857-61.
8. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernandez Ramos, M. D.; Al Natsheh, Muneer *Sens.Actuators B* **2003**, *B88*, 217-22.
9. Hirayama, E.; Sugiyama, T.; Hisamoto, H.; Suzuki, K. *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 465-74.
10. Suzuki, K.; Hirayama, E.; Sugiyama, T.; Yasuda, K.; Okabe, H.; Citterio, D. *Anal.Chem.* **2002**, *74*, 5766-73.
11. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *481*, 139-48.
12. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
13. CIE 15:2004 *Colorimetry,(Technical Report) 3rd Edition*, 2004.
14. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.
15. Bakker, E.; Bühlmann, P.; Pretsch, E. *Chemical Rev.* **1997**, *97*, 3083-132.
16. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* **1982**, *136*, 363-68.
17. Berns, R. S. *Billmeyer and Saltzman's Principles of Color Technology, 3rd Edition*, 2000.

18. Wyszecki, G.; W.S.Stiles *Color Science: Concepts and Methods, Quantitative Data and Formulae, 2nd Edition*, John Wiley & Sons.: 1982.
19. Fairchild, M. D. *Color Appearance Models. 2nd Edition*, Wiley: 2004.
20. CIE Publ.142-2001 *Improvement to Industrial Colour-Difference Evaluation*, CIE Central Bureau: Vienna: 2001.
21. Melgosa, Manuel; Huertas, Rafael; Berns, Roy S. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **2004**, *21*, 2269-75.
22. Melgosa, M; Hita E; Poza A.J.; Alman D.H; Berns R.S *Color Research and Application* **2007**, *22*, 148-55.
23. Hu, Y.; Massart, D. L. *J.Chromatogr.* **1989**, *458*, 311.



## **CAPÍTULO 7**

# **EMPLEO DE UN ESCÁNER CONVENCIONAL PARA LA MEDIDA DE SENSORES DESECHABLES**



## EMPLEO DE UN ESCÁNER CONVENCIONAL PARA LA MEDIDA DE SENSORES DESECHABLES

### Resumen

En este Capítulo describimos el empleo de un escáner óptico convencional, como un dispositivo alternativo para realizar análisis cuantitativo. Así, mediante el empleo de un software para el procesamiento de imágenes digitales, se puede hacer una evaluación numérica de la intensidad del color de la zona sensora de una membrana desechable que responde a potasio. Este método se basa en escanear simultáneamente diferentes sensores desechables una vez que han sido equilibrados con disoluciones de muestra o con patrones. El procesamiento del color de las imágenes se realiza usando un editor gráfico general como es Adobe Photoshop. Las funciones de calibración se construyen utilizando el parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$ , que es una señal, transfectancia o absorbancia, relativa proveniente de una relación de los valores de luminosidad del canal seleccionado, RGB o CMYK, para el sensor desechable. Este estudio ha sido realizado trabajando con los dos modos distintos en que un escáner puede trabajar, reflexión o transmisión. En el modo de transmisión se utilizaron distintos filtros coloreados para observar el comportamiento de la señal analítica ante ellos. En modo transfectancia hemos utilizado dos escáneres distintos, uno de ellos correctamente calibrado haciendo uso de una tarjeta de calibración IT-8. En ambos modos hemos realizado gestión del color para conseguir una buena correspondencia entre los colores reales y los generados en el procesamiento digital. En modo transfectancia hemos aplicado un protocolo digital, optimizado por nosotros, para el proceso de adquisición de la imagen con la finalidad de aumentar aún más la sensibilidad del sistema, almacenando los datos en formato TIFF. El segundo escáner se utilizó sin realizar ninguna de estas operaciones y almacenando los datos en un formato que admite compresión de la información como es jpeg. Los datos obtenidos fueron comparados con buenos resultados con los suministrados por un espectrofotómetro de diodos en fila.

## 1. Introducción

El hecho de que un escáner sea de fácil uso, ha originado un aumento de su uso en campos muy diversos como se indicó en el Capítulo 2 dedicado a Metodología de trabajo en esta Memoria de Doctorado. Por otra parte, los avances en esta tecnología en las dos últimas décadas, han dado como resultado el que cada vez se describan aplicaciones de los escáneres en el campo de la Química Analítica para realizar determinaciones colorimétricas o luminiscentes, desplazando en ocasiones la determinación subjetiva basada en la discriminación visual y ampliando la posibilidad de discriminación del colores del ser humano.

Proponemos en este Capítulo un método alternativo de análisis mediante el uso de sensores desechables basado en el análisis digital del color usando un escáner como instrumento de medida en lugar de, por ejemplo, la espectrometría convencional. En este caso la capacidad para capturar la imagen, digitalizarla, almacenarla y reproducirla con colores consistentes entre distintos dispositivos, es esencial. Así, la gestión del color, está siendo incluida dentro de los sistemas operacionales de los programas, haciendo uso de perfiles de color desarrollados por el Consorcio Internacional del Color (ICC).

En análisis digital, el realce de la imagen, el llamado gamma, tiene un efecto crucial para discernir los detalles en regiones oscuras, afectando también a la saturación y en un grado inferior la tonalidad de colores<sup>1-3</sup>. Nosotros hemos estudiado cómo afecta a la imagen diversos tipos de tratamientos<sup>4-6</sup>. Por otra parte, se han optimizado parámetros propios del escáner como son la profundidad del color y la resolución usando el escáner tanto en modo transreflectancia como en modo transmisión. Tras establecer el parámetro analítico para este caso, se han establecido las características analíticas del procedimiento, validando estadísticamente los resultados con los obtenidos siguiendo el procedimiento de medida habitual.

## **2. Experimental**

### **2.1. Reactivos y materiales**

Todas las disoluciones, reactivos y materiales empleados fueron los mismos que los empleados en el Capítulo 4 sección 2.1 de esta Memoria de Doctorado.

### **2.2. Preparación de la membrana sensora**

La preparación de la zona sensora es igual a la ya descrita en la sección 2.2 del Capítulo 4 de esta Memoria.

Con el objeto de reducir el tiempo de análisis con el escáner se dispusieron dos o tres zonas sensoras sobre el soporte de tipo Mylar, de manera que tenemos dos o tres réplicas por cada sensor desechable. Las membranas así preparadas están listas para ser usadas mediante el procedimiento de medida con el escáner convencional.

### **2.3. Instrumentación y software**

Para llevar a cabo las medidas mediante el escáner hemos utilizado un porta muestras de diseño propio (Figura 7.2) fabricado en poliestireno blanco (Evergreen, Woodinville, EE.UU.). Para obtener las imágenes digitales tanto en modo transfectancia como en modo transmisión hemos usado un escáner Microtek modelo ScanMaker i700 (CA, EE.UU.). Cuando se operaba en modo transmisión, estos para medidas iluminando desde atrás a las membranas de forma que el haz de luz atraviese las membranas sensoras hasta alcanzar el sensor CCD del escáner, se han usado una serie de filtros, cuyos datos característicos se recogen

en la Tabla 7.1 y en la Figura 7.1. Las medidas de las membranas desechables mediante este escáner se realizaron utilizando el programa Silverfast (LaserSoft Imaging AG, Kiel, Alemania). Además hemos utilizado un escáner Scanjet 4100C de Hewlett-Packard (Hewlett-Packard Company, CA, EE.UU), utilizando el propio programa del escáner para su manejo (Jetimage 20).

El programa utilizado para obtener del color de la zona sensora de los sensores desechables es el Adobe Photoshop CS ver. 8.0.1. (Adobe System Inc., San Jose, California, EE.UU.). Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila (Nortwalk, CT, EE.UU.) conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200. Dicho espectrofotómetro está equipado con un soporte metálico de 44 mm de alto y 12 de fondo, pintado en negro mate que se coloca en el compartimiento de cubetas<sup>7</sup>. La adquisición y la manipulación de los datos espectrales fueron realizadas usando el programa Chemstation suministrado por HP para las medidas de absorbancia.

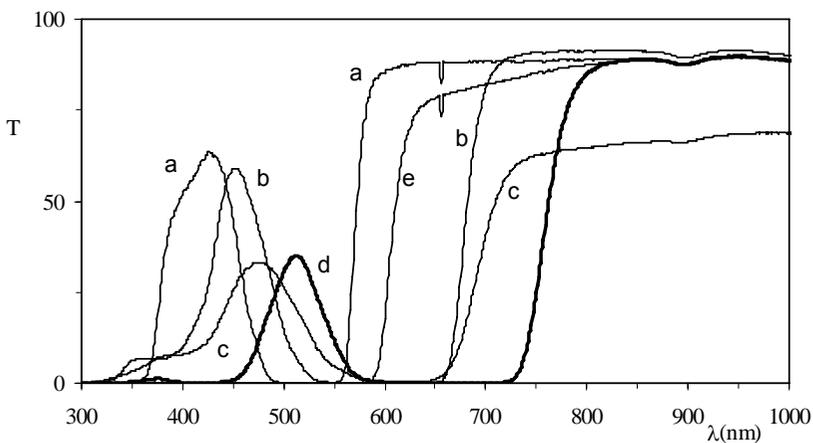


Figura 7.1. Espectros de transmisión de los filtros utilizados para escanear en modo transmisión .a:16-30, b:18-19, c:18-18, d:15-05, e:16-16.

Los programas utilizados para el tratamiento de datos y el ajuste de datos experimentales y cálculos estadísticos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU., 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d,

1998 editado por K. Hertzner y adaptado por J. Garrido. Mathematica ver. 5.0, 1988-2003 (Wolfram Research) y Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE.UU.) para cálculos generales junto con OriginPro 7.5 (Northampton, MA, EE.UU.).

Tabla 7.1. Caracterización de los filtros empleados con un escáner en modo transmisión.

Parámetros	Filtros				
	16-30	18-19	18-18	15-05	16-16
Transmisión del pico (%)	89,538	91,352	70,647	89,896	89,46
80% pico	580 nm	693 nm	721 nm	777 nm	627 nm
50% pico	571 nm	680 nm	696 nm	760 nm	609 nm
5% pico	561 nm	663 nm	663 nm	735 nm	593 nm
<i>Paso de banda</i>					
Centro de la longitud de onda	426 nm	452 nm	478 nm	514 nm	-
50%	76 nm	59 nm	84 nm	59 nm	-
10%	109 nm	165 nm	207 nm	104 nm	-
1%	131 nm	209 nm	316 nm	152 nm	-
Coordenadas FWHM (nm)	(381-457)	(428-487)	(436-520)	(483-542)	-
Transmisión de pico (%)	63,652	59,086	33,222	34,983	-

## 2.4. Condiciones de medida

La respuesta del sensor desechable para potasio fue evaluada por adición de 8 mL de la disolución a ensayar en un tubo de plástico de polietileno junto con 2 mL de disolución tampón 0,1 M de Tris de pH 9,0. A continuación, se introduce el sensor desechable en el tubo durante 5 minutos sin agitación. Tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución y tras sacudirla se introduce en un portamuestras de fabricación propia para el escáner cubriéndolo con una lámina de color blanco de poliestireno para realzar el contraste. Este soporte fue empleado cuando se usa el escáner en modo de transfectancia. Las imágenes obtenidas fueron almacenadas en formato del archivo TIFF (ScanMaker i700) y en jpeg (Scanjet 4100 C). La información del color, en cada sensor desechable, fue descompuesta en los colores rojo, verde y azul provenientes del espacio de color RGB y los colores cian, magenta y amarillo de espacio de color CMYK. Esta

información del color fue obtenida de un área de la zona sensora del sensor desechable, denominada región del interés (ROI), para cada canal, como un valor promedio, usando la opción histograma de Photoshop. Finalmente, estos valores fueron transferidos a una hoja de cálculo para el análisis de los datos. Para comparar el procedimiento de la medida y evaluar el funcionamiento del escáner, las membranas desechables para potasio también fueron medidas usando un espectrofotómetro de diodos en fila.

Ahora bien, en el caso de usar el espectrofotómetro de diodos en fila, se mide la absorbancia de los sensores a 660 nm, una vez equilibrados, en un espectrofotómetro de diodos en fila provisto de un soporte de cubeta para el sensor desechable fabricado en hierro y pintado de negro mate<sup>7</sup>. Los valores de absorbancia, correspondientes a la especie completamente protonada ( $A_{HC}$ ) y desprotonada ( $A_C$ ) del cromoforo necesarios para calcular los valores de  $\alpha_{ef}$ , se midieron acondicionando los sensores desechables en tampón Tris  $2 \cdot 10^{-2}$  M y NaOH  $10^{-2}$  M. Para corregir la absorbancia del fondo utilizando el espectrofotómetro, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar, además para las medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila, la precisión mejora una media de un 2% cuando el valor de la línea base, medido a 800 nm, es sustraído en todos los casos. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no necesitaron ser acondicionadas antes de su uso.

Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-Hückel<sup>8</sup>.

## 2.5. Sistema de análisis y gestión del color

La gestión del color<sup>9</sup> es un asunto de importancia en la captura, el ajuste y la impresión de las imágenes digitales, porque permite entender y controlar los colores de la imagen y sus cambios de un dispositivo otro. En primer lugar, es importante calibrar el escáner para conseguir colores precisos a través del

programa de calibración. Considerando que cada dispositivo de entrada y salida tienen su propia gama del color, los colores no son consistentes. Para cada dispositivo de entrada y de salida se tiene que generar un perfil ICC específico (fichero de datos que caracteriza el comportamiento del espacio de color de un dispositivo). El sistema de gestión del color compara dos perfiles, el del remitente de los datos, es decir aquí un escáner, con el del receptor de los datos, por ejemplo un monitor, y calcula una relación para la conversión, la cual traduce los datos de la imagen en los colores correctos. Para obtener esta correlación del color entre el escáner y el monitor utilizamos una tarjeta de calibración IT-8<sup>10;11</sup> la cual es diseñada para medir el funcionamiento de los dispositivos de entrada y para generar los perfiles ICC. La gestión del color es posible trabajando con los programas Silverfast y Adobe Photoshop<sup>12;12-14</sup>.

Las ventajas que reporta la gestión del color en este estudio son: 1) aumento de la reproducibilidad entre los escáneres; 2) asegura una mejor correspondencia entre los colores verdaderos y los virtuales; 3) asegura una mejor discriminación entre colores similares y, por extensión, entre las concentraciones correspondientes.

## **2.6. Digitalización y adquisición de la imagen**

La adquisición de una imagen es probablemente el paso más importante en imagen digital. Para encontrar las mejores condiciones de adquisición de una imagen que incluyan la información analítica, estudiamos la influencia de diversas variables implicadas tales como niveles, contraste y brillo. Este estudio fue realizado en el modo de inspección previa (previsualización) del escáner y no usando el editor gráfico para no perder información, si se está trabajando en 24 bits, que es la profundidad de color más común hoy día. La imagen en 48 bits ofrece una gama tonal más resistente, sin embargo, se ha preferido trabajar en el modo previsualización del escáner, para mantener en la imagen la mayor cantidad posible

de datos. Con esta finalidad, hemos estudiado nueve maneras distintas de obtener la imagen digital, mediante la optimización de los parámetros del escáner, además de otra forma donde la imagen se adquiere sin ningún tipo de tratamiento, esto es, la imagen escaneada tal cual se obtiene. Se ha realizado el estudio de todas ellas en términos de precisión y de correspondencia de los datos experimentales con el modelo teórico sigmooidal o lineal. Así, fueron estudiados los siguientes procedimientos de optimización en el escáner ScanMaker i700 en modo transreflectancia trabajando a 48 bits y 300dpi:

A) *Sin ningún tipo de optimización.*

B) Mediante autoajuste utilizando el *comando de autoajuste*. Se trata de un método fácil y rápido e implica que se optimizan automáticamente los puntos de luz y de sombra, incluyendo los tonos medios y equilibrando automáticamente el color del matiz, según el modelo del escáner y del tipo de imagen seleccionada.

C) *Optimización manual*, usando cuatro estrategias distintas: C.1) *Autoajuste, más ajuste manual de los niveles*: Haciendo uso del comando autoajuste, pueden aparecer algunos defectos en la ventana del histograma, correspondientes a los diferentes niveles, así por ejemplo puede suceder que el nivel de salida de negro no es cero (sea, por ejemplo, 18), lo que provoca que no haya negros puros en la imagen final, o que el nivel de salida del blanco no sea 255 y, por la misma razón que antes, no se consiga blanco puro en la imagen final, e incluso que el ajuste de entrada del blanco haya sobrepasado el comienzo del histograma, lo que significa que pueda haber perdido detalle en las luces altas, con la consiguiente pérdida de información. De esta manera y para tener mayor sensibilidad, es necesario un ajuste fino de los niveles de entrada dentro de cada canal moviendo los reguladores hacia los extremos de los primeros píxeles registrados e igualmente de los últimos. C.2) *Autoajuste, más ajuste manual de los niveles, más corrección manual del blanco y del negro*: implica el mismo procedimiento que en C.1, más un nuevo paso que mejora el rango tonal, a través del establecimiento del blanco y del negro

patrones, haciendo uso de una lámina mate de color negro y del soporte blanco de estireno. C.3) *Ajuste manual de los niveles*: consiste en el mismo procedimiento que en C., pero sin el empleo del comando autoajuste. C.4) *Ajuste manual de los niveles, más corrección manual del blanco y del negro*: Ajuste manual, seleccionando el blanco y el negro de una lectura de la lámina negra y del soporte de estireno blanco.

Los cuatro casos restantes (D.1, D.2, D.3, D.4) son los mismos casos presentados en C, pero introduciendo un nuevo paso, consistente en el uso de curvas de gradación<sup>15;16</sup>. Dichas curvas de gradación se refieren a la relación entre los niveles de entrada y de salida. Para ello se utiliza una gráfica de ejes X-Y, que representan los valores de luminosidad de los píxeles de entrada (eje X) frente a los valores de los píxeles de salida (eje Y)<sup>15;17</sup>.

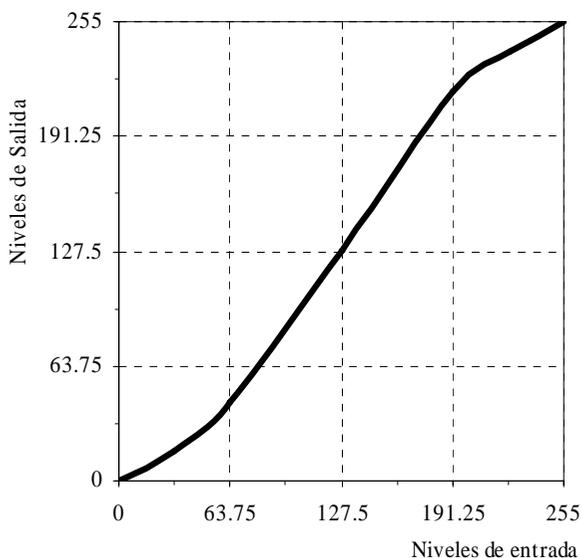


Figura 7.2 Curva de gradación usada. Parejas de valores: (0,0), (32,16), (64,43), (128,128), (192,216), (224,239), (255,255).

Aunque existen diferentes tipos de curvas de gradación, con la curva empleada aquí se gana en detalle, es decir en información, a costa de los píxeles más claros y más oscuros<sup>18;19</sup>. Para utilizar esta curva de gradación, debemos de mantener constante la pendiente de la línea recta, en los valores intermedios, que cruza el diagrama, suavizando el principio y el final de la misma hacia los vértices más cercanos, resultando una curva de gradación en forma de  $S^{20}$ , como se muestra en la Figura 7.2. Así, y considerando cada caso estudiado, este nuevo paso se realizaría después del ajuste de niveles y antes de la corrección del blanco y del negro.

### 3. Resultados y discusión

El equilibrio de cambio iónico que tiene lugar en el caso del sensor desechable para potasio ya se ha descrito en el Capítulo 5, sección 2.1 de esta Memoria de Doctorado en la para el modelo sigmoideal y en la sección 2.2 para el modelo lineal.

Ahora bien, en nuestro caso, los cambios calorimétricos de la zona sensora de la membrana son evaluados a partir de las imágenes de las membranas obtenidas trabajando con el escáner en el modo de reflectancia, en realidad en modo transreflectancia y en transmisión. Los datos numéricos se pueden extraer de las imágenes a través de la definición de una región del interés (ROI) para cada área sensora. El promedio del color de los píxeles, usando el espacio de color RGB o de CMYK, de cada ROI es utilizado para la estimación del parámetro analítico  $\alpha$ .

De esta manera, el parámetro normalizado  $1-\alpha_{ef}$  se obtiene usando la luminosidad de cada zona sensora, definido como el cociente entre la intensidad de color promedio del canal adecuado, obtenido del histograma ( $I_x$ ), y su máximo valor ( $I_0$ ) obtenido de una lectura del soporte de estireno blanco, que es usualmente un valor cercano a su máximo teórico de 255. Así, usando estos valores es posible obtener una densidad de reflexión efectiva, análoga a la absorbancia efectiva, de

los diferentes canales de luminosidad. De manera que el parámetro analítico  $1-\alpha_{\text{ef}}$ , puede ser definido como:

$$1 - \alpha_{\text{ef}} = \frac{\left( -\log \frac{I_X}{I_0} \right) - \left( -\log \frac{I_{(\text{NaOH})_X}}{I_0} \right)}{\left( -\log \frac{I_{(\text{buffer})_X}}{I_0} \right) - \left( -\log \frac{I_{(\text{NaOH})_X}}{I_0} \right)} \quad (\text{ec.7.1})$$

Y de manera simplificada:

$$1 - \alpha_{\text{eff}} = \frac{\log(I_X) - \log(I_{(\text{NaOH})_X})}{\log(I_{(\text{buffer})_X}) - \log(I_{(\text{NaOH})_X})} \quad (\text{ec.7.2})$$

El uso de absorbancias efectivas, o reflexión efectiva ya que en este caso trabajamos con el escáner en modo transfectancia. obtenidas del escáner, ha sido usado por diferentes autores<sup>14;21-25</sup>. Sin embargo, este parámetro y al igual que ocurre con la imagen grabada por el escáner, depende de las características del objeto, de la composición de la luz que incide en el objeto y también de las propiedades de grabación del dispositivo. La definición del parámetro analítico  $1-\alpha_{\text{ef}}$ , de acuerdo con la ec.7.1 tiene la propiedad de ser independiente del iluminante. Esta aproximación es similar al vector de cromaticidad definido por Finlayson *et al.*<sup>15</sup> basado en la ecualización técnica del histograma.

Para conseguir la imagen digital de la membrana desechable, se ha utilizado un porta muestras de diseño propio, realizado en poliestireno blanco, que posee cinco zonas para mantener a las diferentes membranas a registrar en la misma posición, incrementando así su reproducibilidad. Este portamuestras se muestra en la Figura 2.12 del Capítulo de 2 de esta Memoria. El espectro de reflexión de dicho soporte junto con el espectro de reflexión de la lámina negra

utilizada como referencia en el apartado 2.6 de este capítulo se muestran en la Figura 7.3

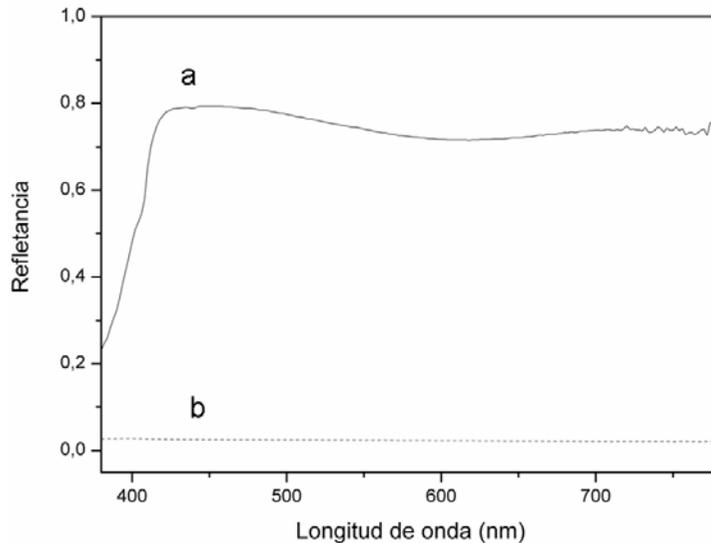


Figura 7.3. Espectros de reflexión de a) poliestireno utilizado como portamuestras y b) de la lámina de plástico negro utilizada como referencia en el apartado 2.6.

De la manera descrita, hemos transformado el valor medio del color del píxel del ROI en densidades de reflexión estimadas que puede ser usadas como parámetro analítico del escáner, utilizando el modelo teórico sigmoideal mediante una expresión similar a la utilizada en la metodología espectrofotométrica<sup>26</sup>.

Dependiendo del tipo de colorante que se use para la fabricación de los filtros que componen el mosaico de color interno del CCD, tendrán estos diferentes rangos de longitudes de onda y diferentes grados de solapamiento. Así, es posible seleccionar, en una primera aproximación, el canal mas conveniente comparando el espectro de absorción del colorante usado con el espectro de transfectancia para el sensor de potasio, que vemos que tiene un máximo a 482 nm y otro de menor intensidad a 660 nm. De esta manera podemos concluir que los mejores canales podrían ser a priori el rojo y azul. Por otra parte, el espectro de absorción presenta

dos máximos, uno a 545 y otro a 660, por lo que los posibles canales serían el verde o el rojo<sup>27</sup>.

Hay más de 50 formatos de archivo en los que se pueden grabar y almacenar las imágenes digitales, siendo los formatos más comunes son: jpeg, gif, png, tiff, bmp and pict<sup>28:29</sup>. Aquí debemos elegir el mejor formato de imagen que haga posible un almacenamiento sin pérdida de información haciendo uso de cualquier tipo de compresión. De hecho, es importante un formato de imagen que nos de toda la información del color traducida en la información numérica de cada diferente canal. Además, y como hemos aplicado una calibración al escáner, con tarjetas IT-8, y trabajamos con gestión del color, hemos de elegir un formato sin compresión, para mantener una relación entre los colores reales y los generados por los. Por eso, hemos seleccionado el formato de archivo tiff porque además de no realizar compresión, presenta la ventaja de poder ser soportado por todos los tipos de equipos informáticos, ya sean Macintosh o PC.

### **3.1. Influencia de la adquisición sobre el parámetro analítico utilizando el escáner en modo transflectancia. Selección del canal.**

Para estudiar las distintas formas de adquirir una imagen, aplicadas a un escáner en modo transflectancia, previamente descritas en la sección experimental, y considerando los espacios de color RGB y CMYK, se prepararon cuatro diferentes membranas desechables que fueron medidas usando diez disoluciones patrón de potasio:  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1 M.. Para ello seleccionamos 16 bits por canal como profundidad de color (lo que significa 281 billones de colores o lo que es lo mismo 48 bits) y a una resolución óptica de 300 dpi (*dots per inch*) o ppp (puntos por pulgada). Con estas condiciones de partida, conseguimos mantener una buena calidad de la imagen y un rango tonal más resistente, debido a que tiene más niveles tonales, a posibles fracturas del

histograma que implicarían pérdida de información. A continuación, se procede a discutir los resultados obtenidos usando los diferentes tipos de adquisición de imagen:

**Espacio de color RGB:** Hemos encontrado en todos los casos estudiados que el sigmoide experimental que se consigue usando los datos del canal rojo se desplaza hacia la derecha, esto es, hacia un rango de actividades más alto, por lo que es descartado por su baja sensibilidad. Adicionalmente, los resultados generados empleando los canales luminosidad y escala de grises, no muestran correspondencia con el modelo teórico. De manera que sólo estudiamos detalladamente los canales verde y azul.

De todos los datos experimentales provenientes de los diferentes procedimientos de optimización estudiadas, descartamos algunos casos. En concreto: 1) El caso B en ambos canales, verde y azul, debido a que muestran una mala precisión, en torno a un 20 % de media en términos de desviación estándar relativa (DER) de  $1-\alpha_{ef}$ . 2) Los casos C.1, C.3, D.1 y D.3, (que no tienen corrección del blanco y negro), pues no muestran relación con la curva teórica. La Tabla 7.2 muestra los valores medios de  $1-\alpha_{ef}$  junto con su desviación estándar relativa en % para cada concentración obtenida en los cinco casos restantes para el canal verde y azul.

Con los datos provenientes del canal verde (Tabla 7.2), observamos peores resultados en términos del parámetro analítico y de la precisión, que con los resultados provenientes del canal azul. Cuando usamos los casos C.2 y C.4 (que no utilizan curvas de gradación) el rango de aplicación es menor a altas concentraciones, y en el caso D.2, similar aunque usando curvas de gradación, el rango es también mas pequeño, aunque ahora a bajas concentraciones. Finalmente, seleccionamos el caso D.4. *ajuste manual de los niveles, más curva de gradación, más corrección manual del blanco y del negro*, debido a que todos los datos experimentales siguen el modelo teórico y se mejora la calidad de la imagen

digital. Cuando comparamos los resultados obtenidos sin aplicar ningún tipo de tratamiento (caso A) con el caso seleccionado, caso D.4, encontramos que el rango es más pequeño a altas concentraciones en el caso A y una peor precisión, hablando en términos generales.

Tabla7.2 Comparación del parámetro analítico  $1 - \alpha_{ef}$ , junto con su DER asociada obtenido para los canales verde y azul.

[K*] M	A		C.2		C.4		D.2		D.4	
	$1 - \alpha_{ef}$	DER %								
Canal Verde										
$1 \cdot 10^{-7}$	0,91	2,13	0,92	5,57	0,70	7,71	1,03	1,20	0,82	7,34
$1 \cdot 10^{-6}$	0,82	5,25	0,61	11,03	0,61	16,05	0,91	9,11	0,58	13,60
$5 \cdot 10^{-6}$	0,72	4,83	0,49	9,65	0,30	14,18	0,94	5,99	0,52	12,12
$5 \cdot 10^{-5}$	0,50	7,33	0,24	11,94	0,22	18,02	0,49	13,09	0,19	10,72
$1 \cdot 10^{-4}$	0,49	7,71	0,26	16,37	0,13	17,60	0,49	11,09	0,14	13,75
$5 \cdot 10^{-4}$	0,43	10,97	0,12	17,69	0,10	22,51	0,30	19,28	0,13	16,34
$1 \cdot 10^{-3}$	0,36	13,48	0,13	21,66	0,06	18,33	0,34	17,32	0,10	19,20
$1 \cdot 10^{-2}$	0,19	14,63	0,09	19,14	0,03	14,20	0,11	21,23	0,04	11,36
$5 \cdot 10^{-2}$	0,04	33,37	0,03	48,32	0,01	28,28	0,01	302,2	0,00	54,31
0,1	0,02	22,82	0,00	73,97	0,00	56,53	0,00	447,8	-0,01	73,79
[K*] M										
Canal azul										
$1 \cdot 10^{-7}$	0,90	1,27	0,90	1,63	0,87	1,55	0,91	1,75	0,88	1,61
$1 \cdot 10^{-6}$	0,79	4,11	0,86	3,85	0,80	4,65	0,84	4,33	0,83	4,66
$5 \cdot 10^{-6}$	0,72	3,03	0,83	2,79	0,79	3,41	0,83	2,99	0,79	3,42
$5 \cdot 10^{-5}$	0,56	3,24	0,58	3,65	0,59	3,89	0,61	3,59	0,59	4,17
$1 \cdot 10^{-4}$	0,40	3,77	0,50	1,66	0,44	3,16	0,44	2,44	0,38	2,87
$5 \cdot 10^{-4}$	0,22	3,39	0,22	1,56	0,25	4,16	0,24	3,90	0,27	4,67
$1 \cdot 10^{-3}$	0,14	6,07	0,19	3,62	0,21	6,18	0,22	3,64	0,22	4,61
$1 \cdot 10^{-2}$	0,02	57,06	0,00	436,2	-0,37	7,57	0,09	11,82	0,05	36,68
$5 \cdot 10^{-2}$	0,00	101,5	0,02	21,18	-0,47	4,53	0,04	13,26	0,03	34,51
0,1	-0,01	33,22	0,05	12,86	-0,02	77,92	0,00	64,68	-0,03	29,42

**Espacio de color CMKY.** Muestra situaciones similares que en el espacio de color RGB, así, descartamos los canales luminosidad, escala de grises, amarillo y negro debido a que no tienen relación con el modelo teórico. Para el canal cian,

los datos encontrados, muestran el mismo comportamiento que el canal rojo del espacio de color RGB. De manera, que la mejor optimización, teniendo en cuenta rango de aplicación y precisión, se logra trabajando con el canal magenta y en las condiciones correspondientes al caso D.4, similarmente a previamente encontrado para RGB.

Tabla7.3.Valores medios para  $1-\alpha_{ef}$  junto con su DER asociada para el canal magenta en los espacios de color CMYK y P&P CMYK.

[K <sup>+</sup> ] M	A		D.4		A		D.4	
	Canal Magenta en CMYK				Canal Magenta en P&P CMYK			
	$1-\alpha_{ef}$	RSD %	$1-\alpha_{ef}$	RSD %	$1-\alpha_{ef}$	RSD %	$1-\alpha_{ef}$	RSD %
$1 \cdot 10^{-7}$	0,80	5,56	0,88	3,73	0,80	5,42	0,87	7,45
$1 \cdot 10^{-6}$	0,49	15,58	0,69	8,33	0,59	13,71	0,75	6,40
$5 \cdot 10^{-6}$	0,40	12,59	0,61	5,44	0,48	9,82	0,63	2,65
$5 \cdot 10^{-5}$	0,10	25,63	0,30	12,59	0,20	14,31	0,49	7,67
$1 \cdot 10^{-4}$	0,11	15,58	0,17	10,61	0,15	15,04	0,26	11,83
$5 \cdot 10^{-4}$	0,01	35,79	0,09	19,23	0,03	28,16	0,14	20,60
$1 \cdot 10^{-3}$	0,00	72,46	0,03	31,47	0,00	52,77	0,08	232,67
$1 \cdot 10^{-2}$	0,00	431,52	0,00	189,46	0,00	198,50	0,00	124,21
$5 \cdot 10^{-2}$	0,00	60,58	0,00	140,61	0,00	105,32	0,00	48,30
0,1	0,00	59,19	0,00	81,37	0,00	39,52	0,00	44,40

Hemos trabajado asimismo con una modificación del espacio de color CMYK, denominado P&P de Silverfast, obteniendo resultados muy parecidos a los obtenidos en CMYK. El caso D.4 fue nuevamente quien originó los mejores resultados.

Ahora tratamos de para seleccionar el mejor canal dentro de los diferentes espacios de color manteniendo el protocolo D.4. Para ello, estudiamos el canal azul, del espacio de color RGB, y el canal magenta en CMYK y P&P CMYK, evaluando su precisión a tres niveles de concentración ( $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$  y  $1 \cdot 10^{-2}$  M) usando 10 diferentes sensores desechables obteniendo las siguientes valores de DER: el

canal azul y utilizando el protocolo D.4, es el que presenta la mejor precisión, entre un 0,7 y un 4,5 %. En el caso del CMYK, esta va desde 1,7 a 24 % y para P&P CMYK, desde 0,9 al 8,5 %. Por tanto, se seleccionó el canal azul.

Además, estudiamos la precisión del escáner en diferentes posiciones de la superficie de medida. Para ello, dividimos esta superficie del escáner en 15 zonas, 3 por cada zona de medida posible en el soporte de poliestireno blanco y cubriendo la totalidad de la superficie del escáner. Para ello usamos 4 diferentes membranas desechables a una concentración de potasio de  $1 \cdot 10^{-4}$  M. Los resultados obtenidos, expresados en términos de DER de  $1-\alpha_{ef}$  fueron entre 2-3 %. Por ello concluimos que es posible utilizar toda la plataforma del escáner.

### 3.2. Influencia del tratamiento de imagen

En esta sección, empleando el escáner a 48 bits-300dpi y haciendo uso del canal azul, estudiamos cómo afectan a los valores numéricos del ROI de las imágenes digitales, algunas estrategias normalmente utilizadas para el realce de las mismas. Así, exponemos los resultados encontrados utilizando 9 estrategias distintas para la mejora de la definición de la imagen usando Adobe Photoshop, que fueron ensayadas para el escáner ScanMaker i700 trabajando en modo transreflectancia:

(i) *Enfocar*: ajusta el enfoque de una imagen desenfocada, incrementando el contraste entre los píxeles adyacentes, (ii) *Enfocar más*: aumenta el contraste de los píxeles adyacentes unas tres veces más que el filtro enfocar. (iii) *Desenfocar* y (iv) *Desenfocar más*: El efecto de aplicar estos filtros consisten en suavizar los detalles de una imagen, promediando los píxeles próximos junto a los bordes marcados de las líneas definidas y las áreas sombreadas de una imagen. Eliminan el ruido allí donde se producen transiciones de color significativas en una imagen. Además, hemos aplicado distintas estrategias<sup>6</sup> más elaboradas para mejorar el enfoque de una imagen digital.

Así, la estrategia (v), consiste en utilizar una máscara de enfoque (USM, *Unsharp Mask*), que enfoca la imagen ajustando el contraste de los píxeles adyacentes y ofrece un mayor control que enfocar o enfocar más. En su versión común, tal como se presenta en Photoshop, la máscara de enfoque se maneja con tres reguladores: cantidad, radio y umbral. **Cantidad** regula el alcance de la variación en los valores de tono. **Radio** establece el tamaño de la máscara de convolución, es decir, hasta qué distancia se comparan los valores. **Umbral**, por último, fija la diferencia mínima para considerar a un píxel próximo diferente del píxel de referencia. se ha aplicado la máscara de enfoque con unos valores: cantidad 200, radio 0,7 y umbral 2. La siguiente *estrategia (vi)* es aplicando un filtro de paso alto<sup>6,30,31</sup> con un radio igual a 10 ajustando la opacidad. La *estrategia (vii)* consiste en aplicar una máscara de enfoque con los siguientes valores: 300-0.7-5 realizando después una transición a modo **Multiplicar** con porcentaje del 75% y tratando de compensar el oscurecimiento con el ajuste de los tonos medios con la herramienta **Niveles** aplicando un gamma de 1,20<sup>6</sup>. La *estrategia (viii)* consiste en hacer una máscara de luminancia<sup>6</sup>: para ello se pasa la foto al modo LAB, se copia el contenido del canal L y se pega en un canal nuevo. Luego se invierte este último y con la herramienta **Niveles** se recorta el negro de salida al valor 20. Después se carga como selección y se aplica la máscara de enfoque con valores 500-0,7-5, siendo necesario disminuir el efecto de esta máscara de enfoque con una transición: del 40% (viii.1) y del 80% (viii.2). La última *estrategia (ix)*: Sigue los principales pasos de una acción de Paul Bleic<sup>6,32</sup>. Para ello, comenzamos reforzando la imagen con el filtro **Paso alto**, y a continuación crear una máscara para dos duplicados de la capa. La máscara se hace a partir de una copia del canal rojo realzado (bien replicándolo y fundiendo en superponer al 50%, bien con el mezclador de canales en monocromo 100-0-0%), filtrada con la herramienta **Detectar bordes**, invertida, aclarada con niveles y suavemente desenfocada. Las dos réplicas del original con esta máscara de visibilidad se colocan una en modo **Oscurecer** al 50% y otra en modo **Aclarar** al 20%.

Todos los resultados de esta experimento se muestran en la Tabla 7.4, en términos de precisión del ROI como DER del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  obtenidos utilizando el canal azul.

Tabla 7.4. Dispersión de los valores de ROI basados en el promedio de la luminosidad del canal azul y DER del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  para las diferentes estrategias de realce de la imagen.

[K <sup>+</sup> ] M	48 bits\300 dpi		i		ii		iii		iv	
	s	DER %	s	DER %	s	DER %	s	DER %	s	DER %
$1 \cdot 10^{-8}$	8,20	1,58	12,49	1,82	16,73	1,58	7,15	1,65	6,49	1,56
$5 \cdot 10^{-8}$	7,85	1,14	11,69	1,08	15,62	1,27	6,73	1,33	6,57	1,21
$1 \cdot 10^{-7}$	7,29	1,75	11,14	1,58	15,19	1,90	6,40	1,85	5,86	1,89
$1 \cdot 10^{-6}$	7,92	1,44	11,54	1,33	15,85	1,21	6,57	1,26	6,25	1,19
$5 \cdot 10^{-6}$	8,44	0,99	12,56	1,11	17,24	0,88	7,56	0,94	7,52	0,60
$5 \cdot 10^{-5}$	8,86	3,24	13,42	3,11	18,04	3,25	7,70	3,35	7,55	3,22
$1 \cdot 10^{-4}$	11,32	4,02	16,62	3,63	22,21	3,61	10,32	3,43	10,25	4,10
$5 \cdot 10^{-4}$	13,72	9,15	14,05	8,76	24,98	8,81	12,45	8,73	11,97	8,13
$1 \cdot 10^{-3}$	14,03	10,05	19,32	11,09	25,25	9,22	12,77	10,34	12,31	10,34
$1 \cdot 10^{-2}$	14,45	24,27	19,21	25,98	25,25	26,48	12,88	25,96	12,71	24,75
$5 \cdot 10^{-2}$	13,23	28,30	18,48	24,60	24,34	27,91	12,27	31,01	11,78	26,56
0,1	13,72	104,7	19,14	112,9	25,26	118,2	12,13	120,0	12,41	109,4
[K <sup>+</sup> ] M	v		vi		vii		viii.1		ix	
	s	DER%	s	DER %	s	DER %	s	DER %	s	DER %
$1 \cdot 10^{-8}$	13,23	1,98	11,08	1,72	13,32	1,93	11,51	1,66	8,99	1,59
$5 \cdot 10^{-8}$	12,83	1,73	10,74	1,55	12,95	1,40	11,20	1,28	9,13	1,10
$1 \cdot 10^{-7}$	11,77	2,42	10,44	1,97	12,12	2,61	10,48	2,10	8,34	2,95
$1 \cdot 10^{-6}$	12,40	1,69	10,54	1,22	12,73	1,51	11,14	1,58	9,18	1,46
$5 \cdot 10^{-6}$	13,79	1,37	11,56	0,53	13,63	1,25	12,12	1,11	9,74	1,18
$5 \cdot 10^{-5}$	14,34	3,39	12,46	2,44	14,01	3,74	12,89	3,03	10,33	3,11
$1 \cdot 10^{-4}$	18,28	4,29	15,95	4,32	16,15	5,30	16,67	3,76	13,29	3,54
$5 \cdot 10^{-4}$	20,60	9,15	18,67	11,44	14,73	10,99	18,85	9,80	14,99	9,12
$1 \cdot 10^{-3}$	21,26	9,26	18,83	14,39	17,24	12,97	19,38	10,47	15,61	10,21
$1 \cdot 10^{-2}$	20,93	22,11	19,05	87,08	15,65	22,41	19,33	17,79	16,52	13,89
$5 \cdot 10^{-2}$	20,74	52,66	18,05	71,88	14,98	19,15	18,35	17,26	15,65	17,85
0,1	20,87	116,9	18,39	122,4	14,70	123,4	18,84	70,21	15,46	82,20

En términos generales, el uso del desenfoque y de desenfocar más, (estrategias iii y iv), provoca que los valores de dispersión del ROI decrezcan, aunque decrece igualmente la calidad de la imagen digital, razón por la cual fueron descartados. Las estrategias de enfoque (i,ii, v-ix), generan un incremento en los valores de dispersión del ROI, excepto para el caso ix. La estrategia vii.2 no se muestra ya que presentaba valores más altos de DER que la estrategia viii.1. Por otro lado, el caso ix, mejora ostensiblemente la definición de la imagen, sin disminución de la precisión del ROI, por lo que no lleva consigo peor precisión del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$ . Así la estrategia (ix), mejora el enfoque de la imagen, manteniendo la calidad, sin incrementar la diferencia entre los píxeles, y por tanto, no aumenta la dispersión después del gran tratamiento de la imagen que se ha realizado. Sin embargo, aunque mejora el enfoque sin aumentar la dispersión, no mejora los valores de DER, lo que es debido en este caso, a la propia definición del parámetro analítico como luminosidad relativa. Consecuentemente, en la práctica, decidimos no usar ningún tratamiento de imagen después de su almacenamiento.

### 3.3. Área de medida de los sensores desechables

En este apartado se discute la forma de seleccionar el área de la membrana desechable desde la cual se obtiene el valor promedio necesario para el cálculo del parámetro analítico. Para ello, se han hecho dos estudios: 1) distribución del color en la zona sensora y 2) la simetría del color<sup>33</sup>. Ambos estudios se realizaron con los datos obtenidos trabajando con tres membranas desechables a tres niveles de concentración del analito  $1\cdot 10^{-8}$ ,  $1\cdot 10^{-4}$  y  $1\cdot 10^{-2}$  M, para las distintas condiciones de profundidad de color y resolución escogidas como óptimas en este Capítulo.

1) La distribución del color, en la zona sensora circular del sensor, fue estudiada dividiendo el diámetro horizontal y el vertical en pequeños cuadrados, representando la luminosidad de cada cuadrado como función de la relación  $r/R$ , siendo  $r$  el radio de media ( $r < R$ ) y  $R$  el radio de la zona sensora. Así, para los escáneres utilizados en modo de transflectancia: ScanMaker i700 a 48 bits-300dpi,

HP ScanJet 4100 C a 24 bits-600dpi y ScanMaker i700 a 48 bits-75, los cuadrados fueron de (5x5), (10x10) y (1x1) píxeles cada uno. Para el escáner en modo transmisión, el escáner empleado fue ScanMaker i700 trabajando a 48bits-300dpi, los cuadrados fueron de (5X5).

2) La simetría del color, fue analizada obteniendo los valores medios de círculos concéntricos de radio creciente tomando como origen el centro de la zona sensora, representando la luminosidad de cada círculo concéntrico como función del diámetro de la zona sensora ( $\Phi$ ). Los tamaños más altos de ROI que muestran una buena homogeneidad del color fueron para ScanMaker i700 a 48 bits y 300dpi de 80x80 píxeles (40,69 mm<sup>2</sup>) de un total de 120x120 píxeles (91,6 mm<sup>2</sup>), lo que implica un valor medio del ROI correspondiente a 5024 píxeles. Para HP ScanJet 4100 C a 24 bits y 600dpi de 200x200 píxeles (56,18 mm<sup>2</sup>) de un total de (260x260) píxeles (94,95 mm<sup>2</sup>) lo que implica un valor medio del ROI de 31.428 píxeles. Para ScanMaker i700 a 48 bits-75 de 25x25 (56.25 mm<sup>2</sup>) píxeles de un total de 32x32 píxeles (92,16 mm<sup>2</sup>), lo que implica valor medio del ROI de 421 píxeles. Y finalmente trabajando en el modo transmisión, para ScanMaker i700 usando 48bits-300dpi (sin filtros) el ROI resultó de 90x90 píxeles (51,05 mm<sup>2</sup>) de un total de 120x120 píxeles (91,6mm<sup>2</sup>), lo que implica valor medio del ROI de 6376 píxeles.

Este estudio se muestra en la Figura 7.4 para ScanMaker i700 a 48 bits-300dpi, en la Figura 7.5 para HP ScanJet 4100 C a 24 bits-600dpi y en la Figura 7.6 para el escáner en modo transmisión, ScnaMaker i700 trabajando a 48bits-300dpi. El caso ScanMaker i700 a 48 bits-75 no se muestra.

El mismo estudio fue realizado para el resto de posibilidades en modo transmisión, es decir, en escala de grises y con la utilización de filtros, obteniéndose similares resultados. La simetría del color depende de cómo se fabrique la zona sensora. Nosotros preparamos dichas zonas de forma manual y probablemente se incremente el ROI si se realizara la fabricación de forma automática mediante algún

procedimiento de impresión, lo que implicaría un aumento notable en número de píxeles integrados, implicando por consiguiente una mayor fiabilidad en la medida.

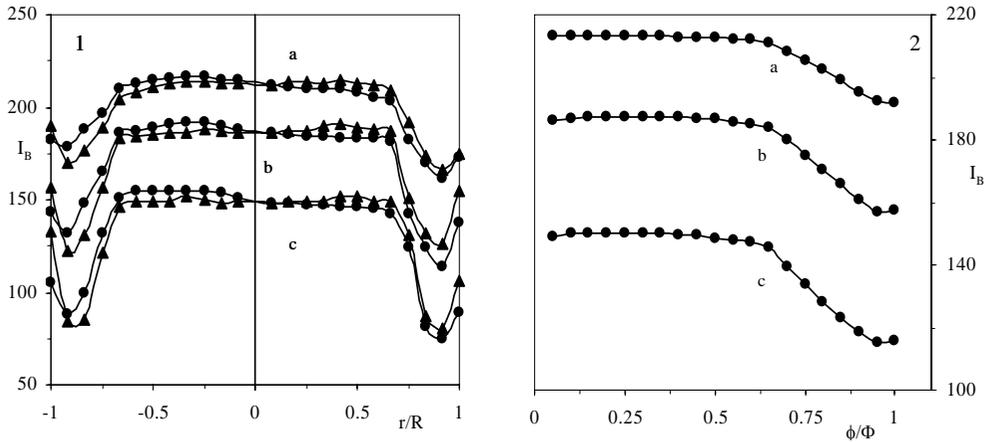


Figura 7.4. Simetría del color del ROI para 48 bits y 300dpi.(1) Simetría del color. Los círculos representan valores a lo largo del eje x, y los cuadrados representan los valores sobre el eje y, empleando en ambos casos las secciones cuadradas.(2) Integración circular. (a)  $1 \cdot 10^{-8}$  M, (b)  $1 \cdot 10^{-4}$  M y (c)  $1 \cdot 10^{-2}$  M.

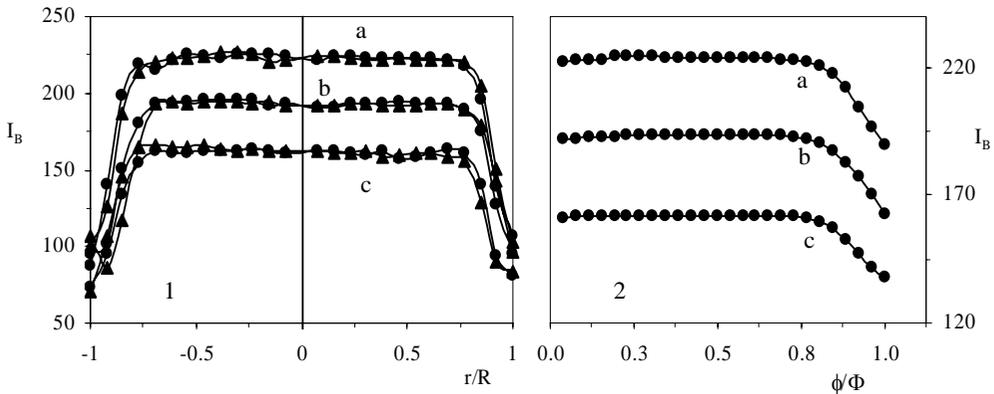


Figura 7.5. Simetría del color del ROI para 24 bits y 600dpi.(1) Simetría del color. Los círculos representan valores a lo largo del eje x, y los cuadrados representan los valores sobre el eje y, empleando en ambos casos las secciones cuadradas.(2) Integración circular. (a)  $1 \cdot 10^{-8}$  M, (b)  $1 \cdot 10^{-4}$  M y (c)  $1 \cdot 10^{-2}$  M.

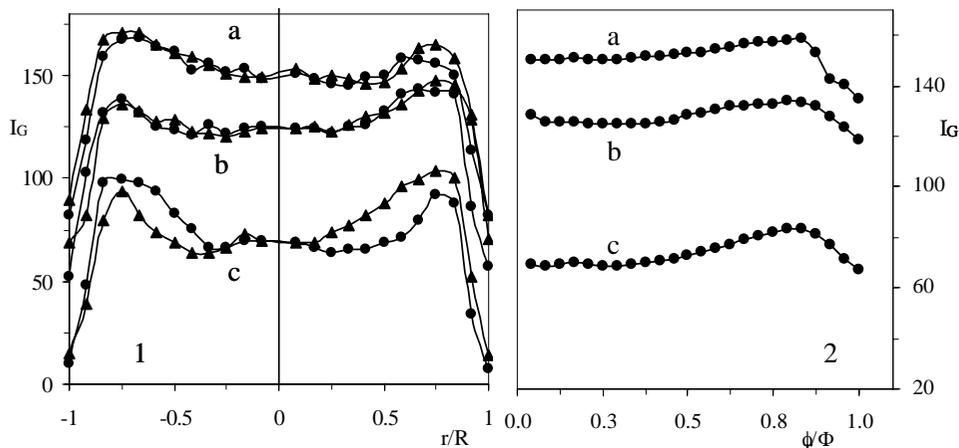


Figura 7.6. Simetría del color del ROI para 48 bits y 300 dpi en modo transmisión sin filtros. (1) Simetría del color. Los círculos representan valores a lo largo del eje x, y los cuadrados representan los valores sobre el eje y, empleando en ambos casos las secciones cuadradas. (2) Integración circular. (a)  $1 \cdot 10^{-8}$  M, (b)  $1 \cdot 10^{-4}$  M y (c)  $1 \cdot 10^{-2}$  M.

### 3.4. Resolución del escáner y profundidad de color

#### 3.4.1. Escáner en modo transreflectancia. Selección del canal

Hay que decir que el caso D.4 seleccionado como modo de digitalización se utilizó exclusivamente con el escáner ScanMaker i700 a 48 bits-300dpi, que son unas condiciones lo suficientemente robustas, esto es, que mantienen una gran información de rango tonal como para soportar este tratamiento de imagen, sin que se produzca una considerable pérdida de información.

Por tanto, la profundidad del color junto con la resolución fue estudiada y optimizada digitalizando las membranas desechables sin aplicar ningún tipo de optimización de imagen y seleccionando el canal azul ya que presenta mejor precisión que el canal verde tal y como de menciona mas arriba.

Así, hemos estudiado dos diferentes profundidades de color, 48 bits y 24 bits (16 bit/canal y 8bit/canal, respectivamente). Usar una profundidad de color alta, 48 bits, implica disponer de un rango mayor de colores, lo que supone una mayor exactitud en la representación digital de los colores reales, trabajar en 48 bits implica 281 billones de colores, mientras que con 24 bits implica 16,7 millones de colores. Con una mayor profundidad de color, mayor cantidad de bits se asignan por píxel.

Además del estudio de la profundidad del color, hemos realizado un estudio de diferentes resoluciones. Se entiende por resolución, el número de elementos de la imagen, es decir, píxeles o puntos, cuando se imprime o visualiza la imagen. Así, la resolución de una imagen se define como píxel por pulgada (dpi) y cuando se imprime se denomina puntos por pulgada (*dots per inch*), aunque estas definiciones son con frecuencia, intercambiables. Para optimizar las condiciones del escáner se ha estudiado como afecta la resolución a los valores numéricos obtenidos del histograma del ROI de la zona sensora de la membrana desechable.

Para ello hemos tenido en cuenta una serie de condiciones. La primera es no exceder de la resolución óptica del escáner. Si se excede de la resolución óptica, implicaría trabajar con resoluciones interpoladas<sup>6</sup>, esto es, una resolución artificial, creada por el escáner o por los programas que se utilicen. Así pues se trata de una interpolación de los puntos capturados por el escáner. Estos nuevos puntos, deben sus características a los puntos reales, de manera que con resoluciones interpoladas se trabajaría con una información no real.

Otra condición ha sido trabajar a resoluciones que sean submúltiplos de la mayor resolución óptica. Así, si un escáner trabaja, por ejemplo, como máximo a 3.200 dpi, es recomendable trabajar a 1.600, 800, o 400, pero no a 2.400 o a 1500<sup>4</sup>.

El rango de resolución que nosotros hemos estudiado está comprendido entre 75 y 9600 dpi, pero en estudios preliminares, encontramos una cierta

fotosensibilidad en este tipo de sensores desechables cuando están sometidos a una iluminación intensa. Además, utilizar altas resoluciones implica altos tiempos de escaneado del ROI, lo que es inviable. De manera que, en nuestro caso, trabajando a 48 bits y 9600 dpi, el escaneado dura 3 minutos y se alcanza una temperatura de 45,3 °C. Así, se observa un decaimiento de la señal para 9600 dpi de un 25%, 4800 dpi de 9%, 2400 dpi de un 6%, 1200 dpi de un 3%. En el caso de 600, 300, 150 y 75 dpi, se observa un decaimiento de la señal inferior al 1% después de 15 escaneados. Por otro lado, el tamaño de una imagen es muy grande si se trabaja a altas resoluciones, por ejemplo con 9600 dpi tendríamos un tamaño de 580 MB (mega bytes) aproximadamente. Por ello, hemos estudiado solo 75, 150, 300 y 600 dpi para una profundidad de color de 48 y 24 bits.

Así, trabajando *sin aplicar ningún tipo de optimización* de la imagen, el caso A estudiado con anterioridad en el apartado 3.2, se prepararon 11 disoluciones patrón de potasio conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y  $7,5 \cdot 10^{-2}$  M en actividades, ( $1 \cdot 10^{-8}$  y 0,1 M en concentración) a pH 9,0. Las disoluciones patrón ensayadas fueron:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1M. Se analizaron 4 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental (sección 2.4) obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  (ec. 7.2).

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7.5, donde se observa que trabajando a 24 bits, en todas las resoluciones ensayadas, los valores de  $1 - \alpha_{ef}$  para  $5 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-4}$  M, son más bajos de lo esperado siendo además más cercanos entre ellos que utilizando 48 bits. Además, aparecen fracturas en el histograma. Por tanto, se seleccionó una profundidad de color de 48 bits. Dentro de esta profundidad de color, el escaneado a altas resoluciones, implica mejor calidad de imagen junto con un mayor tamaño de archivo, tiempo de escaneo y tiempo de trabajo cuando se intenta abrir con algún programa o se inserta en algún

documento. De manera, que la mejor opción es escanear a la menor resolución lo que es apropiada para nuestro propósito<sup>34</sup>.

Tabla 7.5, Comparación del parámetro analítico  $1 - \alpha_{ef}$  a distintas resoluciones de escaneo en diferentes profundidades de color.

[K <sup>+</sup> ] M 24 Bits	75 dpi		150 dpi		300 dpi		600 dpi	
	$1 - \alpha_{ef}$	DER%	$1 - \alpha_{ef}$	DER%	$1 - \alpha_{ef}$	DER%	$1 - \alpha_{ef}$	DER%
$1 \cdot 10^{-8}$	1,01	2,03	1,00	0,64	1,01	0,15	1,01	0,55
$5 \cdot 10^{-8}$	0,99	1,36	0,97	1,12	0,98	0,57	0,98	0,94
$1 \cdot 10^{-7}$	0,99	2,51	0,98	2,60	1,00	2,11	1,00	2,17
$1 \cdot 10^{-6}$	0,95	0,40	0,93	2,01	0,94	1,60	0,96	1,37
$5 \cdot 10^{-6}$	0,91	3,27	0,91	2,98	0,92	2,72	0,92	3,10
$5 \cdot 10^{-5}$	0,58	2,78	0,55	5,14	0,56	2,12	0,58	3,86
$1 \cdot 10^{-4}$	0,53	4,51	0,50	5,67	0,51	4,17	0,51	5,08
$5 \cdot 10^{-4}$	0,46	4,97	0,43	7,16	0,43	4,65	0,44	5,95
$1 \cdot 10^{-3}$	0,31	8,15	0,31	8,57	0,33	6,38	0,30	5,94
$1 \cdot 10^{-2}$	0,04	56,40	0,04	57,60	0,05	37,84	0,02	96,74
$5 \cdot 10^{-2}$	0,06	46,15	0,05	55,26	0,01	224,71	0,03	53,83
0,1	0,02	138,27	0,03	69,58	0,04	46,02	0,02	51,67
[K <sup>+</sup> ] M 48 Bits	$1 - \alpha_{ef}$	DER%	$1 - \alpha_{ef}$	DER%	$1 - \alpha_{ef}$	DER%	$1 - \alpha_{ef}$	DER%
$1 \cdot 10^{-8}$	0,98	1,46	0,99	1,75	0,99	1,54	1,00	1,53
$5 \cdot 10^{-8}$	1,00	0,82	0,99	1,25	1,00	0,42	0,99	1,08
$1 \cdot 10^{-7}$	0,99	1,46	0,98	1,91	0,99	1,88	1,00	1,80
$1 \cdot 10^{-6}$	0,98	1,44	0,98	1,62	0,98	0,38	0,98	1,37
$5 \cdot 10^{-6}$	0,94	1,33	0,92	1,14	0,92	0,79	0,93	0,86
$5 \cdot 10^{-5}$	0,87	2,96	0,83	3,46	0,83	2,49	0,85	3,29
$1 \cdot 10^{-4}$	0,62	4,08	0,55	4,15	0,57	2,54	0,62	3,37
$5 \cdot 10^{-4}$	0,43	8,24	0,32	11,76	0,31	10,49	0,41	7,04
$1 \cdot 10^{-3}$	0,34	9,26	0,20	14,47	0,22	13,49	0,30	8,73
$1 \cdot 10^{-2}$	0,10	17,14	-0,03	23,85	-0,02	28,26	0,07	30,08
$5 \cdot 10^{-2}$	0,08	27,08	-0,04	56,86	-0,02	11,04	0,08	18,96
0,1	0,02	24,10	-0,18	5,93	-0,13	5,34	-0,03	74,76

Por lo tanto, seleccionamos 75 dpi, debido a que ofrece las mismas posibilidades que trabajando con 600 dpi, y presenta una precisión similar al resto.

A la resolución seleccionada, se procedió a elegir el mejor espacio de color, estudiando la precisión para el canal azul en RGB y para el magenta en CMYK y P&PCMYK, a tres niveles de concentración,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  y  $1 \cdot 10^{-3}$  M, usando 10 réplicas distintas cada vez. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 7.6 observando que la mejor precisión expresada como DER del parámetro analítico  $1 - \alpha_{ef}$  se correspondió con el canal azul para el espacio de color RGB.

Tabla 7.6, Precisión para 10 réplicas, a tres niveles de concentración para el parámetro analítico  $1 - \alpha_{ef}$ .

[K <sup>+</sup> ] M	RGB 75 dpi	CMYK 75 dpi	P&P CMKY 75 dpi
$1 \cdot 10^{-5}$	1,024	1,434	1,734
$1 \cdot 10^{-4}$	2,905	4,598	5,163
$1 \cdot 10^{-3}$	4,397	26,393	12,32

El segundo escáner utilizado en modo de transfectancia (HP ScanJet 4100 C), se estudió en los tres canales RGB además de en el canal luminosidad y la escala de grises. Escala de grises obtenida directamente del escáner y no mediante el cambio en un editor gráfico. Para este estudio, se trabajaron a 7 diferentes niveles de concentración  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$  y 0,1M. (entre  $7,74 \cdot 10^{-8}$  y  $7,6 \cdot 10^{-2}$  M en actividades) realizando 4 réplicas diferentes cada vez y usando 24 bits y 600dpi como condiciones de escaneado. No se encontró relación con el modelo teórico sigmoidal utilizando escala de grises y el canal luminosidad. Con el canal rojo si hay relación, pero el sigmoide experimental se desplaza hacia actividades mas altas, implicando un peor límite de detección. El canal verde y el azul, si muestran correspondencia con el modelo teórico, pero estudiando los datos experimentales que resultan, observamos que en términos de precisión del parámetro analítico  $1 - \alpha_{ef}$ , el canal azul presenta mejor precisión, aproximadamente un 10% mejor. Por tanto, el canal elegido fue el canal azul.

Finalmente, se seleccionó 24bits como profundidad de color ya que este escáner no presenta la posibilidad de 48 bits, y 600 dpi de resolución. Dado que este escáner no se calibró con una tarjeta IT-8, ni se realizó gestión del color, se eligió una alta resolución para comparar si altas resoluciones en un escáner sin calibrar ofrece resultados similares con los obtenidos en el escáner calibrado y con gestión del color.

#### 3.4.2. **Escáner en modo transmisión. Selección del canal.**

Para el modo de transmisión no se aplicó ningún tipo de tratamiento de imagen. Inicialmente, se hizo un estudio previo, donde se escanearon las membranas desechables sin utilizar ningún tipo de filtros a 48 bis y 300 dpi, con objeto de seleccionar con estas condiciones el canal más apropiado. Este estudio se realizó a 12 diferentes niveles de concentración de potasio:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1M. Encontramos que, sin utilizar filtros, no hay relación del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  con el modelo teórico sigmoidal para el canal luminosidad ni en escala de grises. El canal rojo presentó altos valores de DER, alrededor de un 20% y el canal azul, por su parte, se desestimó debido a que el rango de aplicación es menor a bajas concentraciones. En conclusión, se seleccionó el canal verde.

Para optimizar las condiciones de adquisición de la imagen en modo transmisión, se adquirieron las imágenes de las membranas desechables sin emplear ninguno de los filtros y utilizando el canal verde para obtener el parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$ . Fueron estudiados 24 y 48 bits como profundidad de color y 75, 150, y 300 dpi como resolución. No fueron ensayadas mayores resoluciones para evitar la caída de señal por fotooxidación cuando se somete a luz intensa la membrana desechable. Tampoco se estudio 600 dpi ya que ofrecía las mismas características que resoluciones más pequeñas. El canal utilizado fue el canal verde sin utilizar ningún tipo de filtros.

Este estudio se realizó a 12 diferentes niveles de concentración de potasio:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1M. Encontrando los siguientes resultados: a 24 bits y utilizando las resoluciones de 75 y 150 dpi, la calidad de la imagen es muy pobre, haciendo incluso difícil la elección del ROI, debido a que la definición de los bordes de la zona sensora es muy baja y, además, aparecen fracturas en el histograma, con lo que se pierde información. Lo mismo ocurre a 48 bits con las mismas resoluciones, aunque es menos marcada la presencia de fracturas en el histograma.

Trabajando a 24 bits y 300 dpi, se produce una mejora a bajas concentraciones en términos de sensibilidad y precisión, aunque insuficiente comparando con la misma resolución a 48 bits, que finalmente fue la seleccionada.

### 3.5. Selección de los filtros para el modo transmisión

Con las condiciones optimizadas en 48 bits y 300 dpi, se llevó a cabo esta selección, preparando 6 sensores desechables medidos a 12 niveles de concentración de potasio diferentes:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $5 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1M. Para seleccionar la mejor opción, como

parámetro analítico se utilizó el  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right)$ , que es el parámetro que permite

linealizar las funciones de calibrado, en lugar de  $1-\alpha_{ef}$ , ya que pequeñas variaciones en éste último parámetro, son más sensibles en el parámetro linealizado, en términos de capacidad de diferenciar concentraciones. Los filtros ensayados se caracterizan en la Tabla 7.1 y en la Figura 7.1.

Trabajando en escala de grises (lo que implica trabajar e 8 bit, esto es 256 niveles de grises) no se encontró relación de los datos experimentales con el modelo teórico si no se trabaja con los filtros, Ahora bien, con todos los filtros

probados, a excepción del filtro 18-19, mostraron un ajuste del parámetro analítico con el modelo teórico, pero se seleccionó el filtro 15-05 debido a que el filtro 16-30, generaba una pendiente de la función lineal (pendiente 0,34) muy inferior a la teórica (pendiente 0,5). Con el filtro 16-16 el rango de aplicación es menor a bajas concentraciones y el filtro 18-08 presenta a bajas concentraciones unas DER del parámetro analítico más grandes, del orden de un 8 % más, que usando el filtro 15-05, lo que implica un peor límite de detección.

Tabla 7.7, Mejores opciones usando filtros, escala de grises y sin filtros para el modelo lineal y sigmoidal.

[K <sup>+</sup> ]M 48 Bits 300dpi	Filtro 15-05 Canal verde		Escala de grises (15-05)		Sin filtro Canal verde	
	$1-\alpha_{\text{eff}} \pm s^{(1)}$	$\log\left(\frac{\alpha_{\text{eff}}}{1-\alpha_{\text{eff}}}\right) \pm s$	$1-\alpha_{\text{eff}} \pm s^{(1)}$	$\log\left(\frac{\alpha_{\text{eff}}}{1-\alpha_{\text{eff}}}\right) \pm s$	$1-\alpha_{\text{eff}} \pm s^{(1)}$	$\log\left(\frac{\alpha_{\text{eff}}}{1-\alpha_{\text{eff}}}\right) \pm s$
$1 \cdot 10^{-8}$	1,01±0,022	-2,02±0,616	1,01±0,026	-2,34±0,659	1,01±0,014	-
$5 \cdot 10^{-8}$	0,99±0,020	-1,91±0,465	0,98±0,024	-1,74±0,332	1,00±0,011	-
$1 \cdot 10^{-7}$	0,94±0,022	-1,24±0,181	0,94±0,022	-1,21±0,203	0,99±0,008	-1,86±0,191
$1 \cdot 10^{-6}$	0,91±0,013	-1,03±0,072	0,90±0,013	-0,97±0,066	0,96±0,005	-1,34±0,054
$5 \cdot 10^{-6}$	0,87±0,006	-0,82±0,022	0,86±0,007	-0,79±0,025	0,93±0,007	-1,13±0,050
$1 \cdot 10^{-5}$	0,83±0,009	-0,70±0,027	0,82±0,007	-0,67±0,021	0,90±0,006	-0,94±0,026
$1 \cdot 10^{-4}$	0,59±0,010	-0,17±0,018	0,58±0,011	-0,14±0,019	0,68±0,015	-0,34±0,031
$5 \cdot 10^{-4}$	0,45±0,010	0,08±0,018	0,44±0,018	0,11±0,032	0,55±0,016	-0,08±0,028
$1 \cdot 10^{-3}$	0,35±0,015	0,27±0,029	0,34±0,022	0,30±0,042	0,46±0,018	0,06±0,031
$1 \cdot 10^{-2}$	0,13±0,019	0,82±0,062	0,12±0,020	0,87±0,079	0,25±0,015	0,48±0,034
$5 \cdot 10^{-2}$	0,10±0,010	0,95±0,047	0,10±0,027	0,98±0,123	0,13±0,016	0,81±0,061
0,1	0,05±0,008	1,25±0,066	0,05±0,021	0,153	0,09±0,007	0,99±0,037

(1) Desviación estándar de 6 réplicas

Haciendo las medidas con los filtros, encontramos los siguientes resultados empleando los canales azul rojo y verde. Solo correspondencia con el modelo teórico en el canal azul el filtro 18-19, aunque sin mostrar una función lineal clara. Con los filtros 16-16 y 16-30, sólo el canal rojo resultó viable, pero el rango de aplicación es menor a bajas concentraciones para los dos. Para el filtro 18-08, se observó correspondencia para el canal verde y azul, aunque el canal verde

presenta a bajas concentraciones una elevada DER, en torno a un 15%, lo que implica un peor límite de detección y para el canal azul el rango de aplicación es menor a bajas concentraciones presentando a 0,1 M una alta dispersión (23 % DER). Finalmente usando el filtro 15-05, encontramos dos posibilidades, usar el canal verde y el canal azul, pero el canal azul genera un valor del parámetro analítico a la concentración  $5 \cdot 10^{-2}$  M menor a la señal para NaOH, implicando que la transformación a logaritmos no sea posible, además presenta altos valores de dispersión a 0.1 M (20,6 % DER).

La otra posibilidad, el canal verde, resulto ser la mejor de todas en términos de precisión, junto con la mejor capacidad de discriminación entre concentraciones próximas entre si, presentando además la función lineal, una pendiente similar a la pendiente teórica. Las mejores opciones encontradas se muestran en la Tabla 7.7

### 3.6. Caracterización analítica del método

Las condiciones optimizadas, que vamos a utilizar para establecer las características analíticas utilizando un escáner como instrumento de medida para el modo transreflectancia son:

- a) ScanMaker i700: 48 bits y 300 dpi con el tipo de adquisición D.4 en el canal azul.
- b) ScanMaker i700: 48 bits y 75dpi. Canal azul.
- c) HP ScanJet 4100C: 24 bits y 600dpi. Canal azul.

Y haciendo uso del escáner en modo transmisión:

- a) ScanMaker i700: 48 bits y 300dpi. Sin filtros. Canal verde.

- b) ScanMaker i700: 48 bits y 300dpi. Con el filtro 15-05. Canal verde.
- c) ScanMaker i700: 48 bits y 300dpi. Con el filtro 15-05. Escala de grises.

### 3.6.1. Modelo Sigmoidal

#### 3.6.1.1. Escáner en modo transreflectancia

Para verificar la relación sigmoidal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ) y la actividad del potasio, en modo transreflectancia y utilizando el escáner ScanMaker i700, se prepararon 11 disoluciones patrón de potasio conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y  $7,5 \cdot 10^{-2}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-8}$  y 0,1 M en concentración) a pH 9,0. Las disoluciones patrón probadas fueron:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0,1M. Haciendo uso del escáner Scanjet 4110 C, se prepararon y estudiaron 7 disoluciones patrón de potasio conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $7,5 \cdot 10^{-2}$  M en actividades, ( $1 \cdot 10^{-7}$  y 0,1 M en concentración) a pH 9,0. Las disoluciones patrón probadas fueron:  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ , y 0,1M.

Se analizaron 4 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$ . La Figura 7.7 muestra los valores experimentales obtenidos junto con la ecuación sigmoidal teórica en las condiciones de 48 bits y 300 dpi.

Los datos experimentales siguen el modelo teórico, aunque se observa un aparente cambio en la estequiometría complejo ionóforo:potasio que es  $1:1^{26}$ . Este comportamiento puede ser atribuido a la incapacidad del escáner en discriminar

longitudes de onda, dando información de la luminosidad de un ancho amplio de longitudes de onda, que cubren en este caso un área espectral correspondiente, total o parcialmente a las formas ácidas y básicas del cromoionóforo y no sólo de la forma protonada del cromoionóforo tal y como un espectrofotómetro de diodos en fila es capaz de hacer.

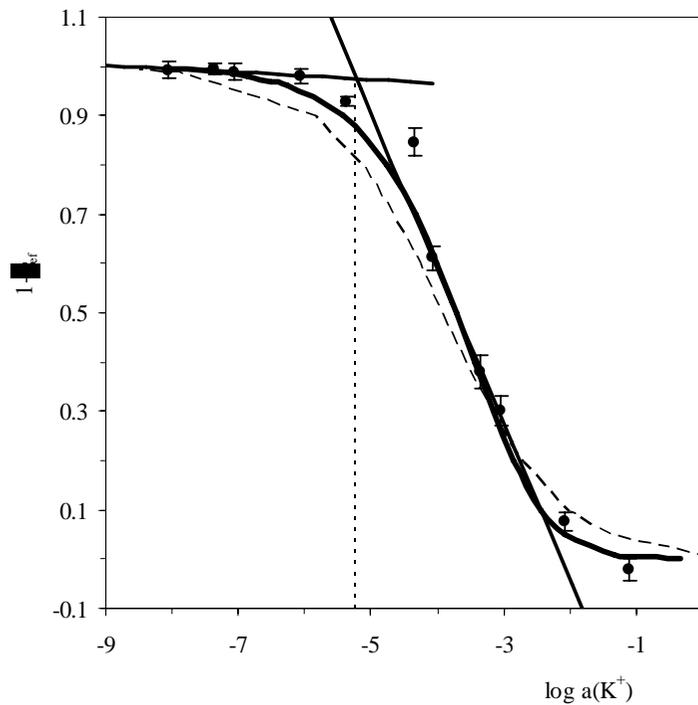


Figura 7.7. Curva de respuesta del sensor desechable y datos experimentales. La línea discontinua corresponde a un sigmoide teórico con  $p=1$ . Los datos experimentales confirman  $p=0,5$ .

De esta manera, se observa cómo los datos experimentales obtenidos por escáner, se ajustan mejor a una aparente estequiometría 0,5 en lugar de 1, lo que puede ser debido a que el modelo teórico, basado en la ley de Beer, exige que se pueda obtener información de una sola de las formas del cromoionóforo, y esto no es

así al usar la señal de luminosidad del canal escogido del escáner que de ninguna manera es monocromática.

Las Figuras 7.9 y 7.10 muestran los valores experimentales del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  para el escáner ScanMaker i700 a 48 bits-300dpi y para ScanMaker i700 a 48 bits-75dpi y para el escáner Scanjet 4100 C a 24 bits y 600 dpi se muestran en la Figura 7.11.

Para definir el rango de medida, se prepararon dos series de disoluciones patrón. Una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal y otra en la zona de mínima pendiente a bajas actividades (4 patrones, 4 réplicas de cada uno). Así, para **48bits y 75dpi**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  y  $8,72 \cdot 10^{-4}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-3}$  M en concentraciones), y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,74 \cdot 10^{-9}$  y  $8,75 \cdot 10^{-7}$  en actividades ( $10^{-8}$  y  $1 \cdot 10^{-6}$  M en concentración). Para **48bits y 300dpi**, la zona de máxima pendiente se encuentra entre  $4,37 \cdot 10^{-6}$  y  $8,72 \cdot 10^{-4}$  M en actividades ( $5 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-3}$  M en concentraciones), y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,74 \cdot 10^{-9}$  y  $8,75 \cdot 10^{-7}$  en actividades ( $10^{-8}$  y  $1 \cdot 10^{-6}$  M en concentración). Finalmente para **Scanjet 4100 C a 24bits y 600dpi**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  y  $8,72 \cdot 10^{-4}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-3}$  M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,75 \cdot 10^{-8}$  y  $8,75 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $10^{-7}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M en concentración) La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste<sup>35</sup>.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, las siguientes:

A.- **48bits y 75dpi:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,6875 - 0,3216 \log a_{K^+} \quad \text{Máxima pendiente} \quad (\text{ec.7.3})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,8224 - 0,0219 \log a_{K^+} \quad \text{Mínima actividad} \quad (\text{ec.7.4})$$

**B.- 48bits y 300dpi:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,6050 - 0,3146 \log a_{K^+} \quad \text{Máxima pendiente} \quad (\text{ec.7.5})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,9526 - 0,0055 \log a_{K^+} \quad \text{Mínima actividad} \quad (\text{ec.7.6})$$

**C.- Scanjet 4100 C a 24bits y 600dpi:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,6992 - 0,3062 \log a_{K^+} \quad \text{Máxima pendiente} \quad (\text{ec.7.7})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,6161 - 0,053 \log a_{K^+} \quad \text{Mínima actividad} \quad (\text{ec.7.8})$$

Tabla7.8, Parámetros analíticos del sensor desechable de potasio utilizando un escáner convencional y aplicando el modelo sigmoidal.

Parámetro	Modelo Sigmoidal		
	75 dpi (ScanMaker)	300 dpi (ScanMaker)	HP scanjet
Ordenada	-0,6875	-0,6050	-0,6992
Desviación estándar de la ordenada	0,0457	0,0609	0,0351
Pendiente	-0,3212	-0,3146	-0,3062
Desviación estándar de la pendiente	0,0115	0,0173	0,0085
Coficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0,9823	0,9706	0,9924
Linealidad on-line	96,41	94,5	97,22
DER(%)	1·10 <sup>-5</sup> M	0,58	0,45
	1·10 <sup>-4</sup> M	1,42	1,52
	1·10 <sup>-3</sup> M	1,24	1,80
Límite de detección (mM)	1,04·10 <sup>-4</sup>	6,58·10 <sup>-3</sup>	9,59·10 <sup>-3</sup>
Rango lineal (mM)	1,04·10 <sup>-4</sup> -10	6,58·10 <sup>-3</sup> -10	9,59·10 <sup>-3</sup> -10

DER% muestran el valor del logaritmo de la actividad de potasio

De la intersección de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD mostrado en la Tabla 7.8. Como límite superior del rango de medida hemos

usado el valor más alto ensayado que cae dentro del rango lineal y que es 10 mM para los tres casos. El valor del límite superior obtenido por el escáner es menor que el obtenido mediante un espectrofotómetro de diodos en fila, 100mM, lo que es debido a la mayor pendiente que tiene la función de calibración (-0,211 frente a -0,3146, respectivamente) a consecuencia del cambio aparente en la estequiometría resultando una de 0,5.

La precisión de las medidas mediante el escáner (expresada como la desviación estándar relativa) se estudió a 3 niveles de concentración:  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 10 veces. Obteniendo DER expresadas como logaritmo de la actividad del potasio (Tabla 7.8). En dicha tabla aparecen además los valores obtenidos en los mismos parámetros analíticos utilizando un escáner.

### 3.6.1.2. Escáner en modo transmisión

En primer lugar se debe comentar que trabajando en modo transmisión no se observa el cambio aparente de en la estequiometría sino que se mantiene la estequiometría 1:1 del complejo ionóforo:potasio. Nosotros supusimos inicialmente que, al igual que en modo transflectancia, el comportamiento iba a seguir el mismo patrón y nos encontraríamos con este cambio de estequiometría. Si embargo, creemos que trabajando en transmisión con este canal, el ancho de la banda usada está más centrada en la zona del espectro de absorbancia de una sóla de las formas del cromoionóforo, resultando por consiguiente que el promedio de la señal que utilizamos corresponde más estrechamente a una de las formas del cromoionóforo, lo que implica que se pueda aplicar el modelo de estequiometría igual a 1.

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ), y la actividad del potasio, en modo transmisión, se prepararon 11 disoluciones patrón de potasio conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-9}$  y  $7,5 \cdot 10^{-2}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-8}$  y 0,1 M en concentración) a pH 9,0. Las disoluciones patrón probadas fueron:  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  y 0.1M.

Se analizaron 6 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$ . Las Figuras 7.12, 7.13 y 7.14 muestran los valores experimentales del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  para el escáner ScanMaker i700 a 48 bits y 300 dpi utilizando el filtro 15-05 (Figura 7.12), escala de grises (Figura 7.13) y sin utilizar filtros (Figura 7.14).

Para definir el rango de medida, se prepararon dos series de disoluciones patrón. Una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal y otra en la zona de mínima pendiente a bajas actividades (5 patrones, 6 réplicas de cada uno). Así, para los tres casos estudiados, la zona de máxima pendiente está entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  y  $8,72 \cdot 10^{-4}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-3}$  M en concentraciones), y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,74 \cdot 10^{-9}$  y  $4,37 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $10^{-8}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M en concentración). La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste<sup>35</sup>.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, las siguientes:

#### A.- Canal verde con filtro 15-05:

$$1-\alpha_{ef} = -0,2936 - 0,2335 \log a_{K^+} \text{ .Máxima pendiente (ec.7.9)}$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,6877 - 0,0396 \log a_{K^+} \text{ .Mínima actividad (ec.7.10)}$$

**B.- Escala de grises con filtro 15-05:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,3035 - 0,2350 \log a_{K^+} \quad \text{Máxima pendiente} \quad (\text{ec.7.11})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,6783 - 0,0406 \log a_{K^+} \quad \text{Mínima actividad} \quad (\text{ec.7.12})$$

**C.- Canal verde sin filtros:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,0987 - 0,21615 \log a_{K^+} \quad \text{Máxima pendiente} \quad (\text{ec.7.13})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,8449 - 0,0205 \log a_{K^+} \quad \text{Mínima actividad} \quad (\text{ec.7.14})$$

De la intersección de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD, mostrado en la Tabla 7.9. Como límite superior del rango de medida hemos usado el valor más alto probado que caiga dentro del rango lineal, que es 100 mM para los tres casos.

Tabla 7.9, Parámetros analíticos de la membrana desechable de potasio utilizando un escáner convencional, aplicando el modelo sigmoideal.

Parámetro	Modelo sigmoideal			
	Filtro verde	Escala de grises	Sin filtro	
Ordenada	-0,2936	-0,3035	-0,0987	
Desviación estándar de la ordenada	0,0156	0,0168	0,0294	
Pendiente	-0,2335	-0,2350	-0,2162	
Desviación estándar de la pendiente	0,0043	0,0046	0,0092	
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9908	0,9894	0,9733	
Linealidad on-line	98,18	98,04	95,74	
	$1 \cdot 10^{-5}$ M	0,82	0,79	1,05
DER%	$1 \cdot 10^{-4}$ M	1,93	1,20	1,59
	$1 \cdot 10^{-3}$ M	1,78	1,22	2,14
Límite de detección (mM)	$1,01 \cdot 10^{-2}$	$1,01 \cdot 10^{-2}$	$1,74 \cdot 10^{-2}$	
Rango lineal (mM)	$1,01 \cdot 10^{-2}$ -100	$1,01 \cdot 10^{-2}$ - 100	$1,74 \cdot 10^{-2}$ -100	

DER% muestran el valor del logaritmo de la actividad de potasio

La precisión de las medidas mediante el escáner (RSD) se estableció mediante un estudio a 3 niveles de concentración:  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  ( $7,5 \cdot 10^{-6}$ ,

$8,74 \cdot 10^{-5}$  y  $8,72 \cdot 10^{-4}$  en actividades) que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 10 veces. En la Tabla 7.9 se muestran los resultados obtenidos.

### 3.6.2. Modelo Lineal

#### 3.6.2.1. Escáner en modo transreflectancia

El cambio aparente de la estequiometría, se hace extensible al modelo lineal, de manera que los datos linealizados no siguen un comportamiento según  $p=1$ . Se observa que el comportamiento experimental sigue el modelo teórico con  $p=1$  hasta una concentración de  $1 \cdot 10^{-3}$  M y a partir de ésta concentración hacia menores valores, los puntos experimentales siguen un comportamiento con  $p=0,5$ . Así puede verse en la Figura 7.8.

Por tanto, el uso de  $p=0,5$  en el modelo teórico general no genera una línea recta, sino una función curvada. Esto es debido a que el término disturbador  $D(\alpha_{ef})$ , con una estequiometría de 0,5, si influye sobre la función lineal teórica de la forma  $Y(\alpha_{ef}) = A + B \cdot X + D(\alpha_{ef})$  resultando la siguiente expresión:

$$\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}}\right) + \log\left(\frac{\alpha_{ef}}{\sqrt{2 - 0.5\alpha_{ef}}}\right) = \log\frac{K_{exct}^{K^+}}{a_{H^+} \sqrt{c}} + \log a_{K^+} \quad (\text{ec.7.15})$$

De cualquier manera, podemos incluir éste parámetro disturbador dentro del parámetro analítico como se ve en la expresión de arriba. Consecuentemente, la transformación logarítmica decimal, podría ser aplicada al parámetro analítico, obteniendo ahora sí, una función lineal de pendiente 1 obtenida cuando sustituimos

en la ecuación 5.10 del Capítulo 5 de esta Memoria, la estequiometría  $p=0,5$ , en lugar de obtener una función lineal con pendiente  $\frac{1}{2}$ , si empleamos estequiometría  $p=1$ .

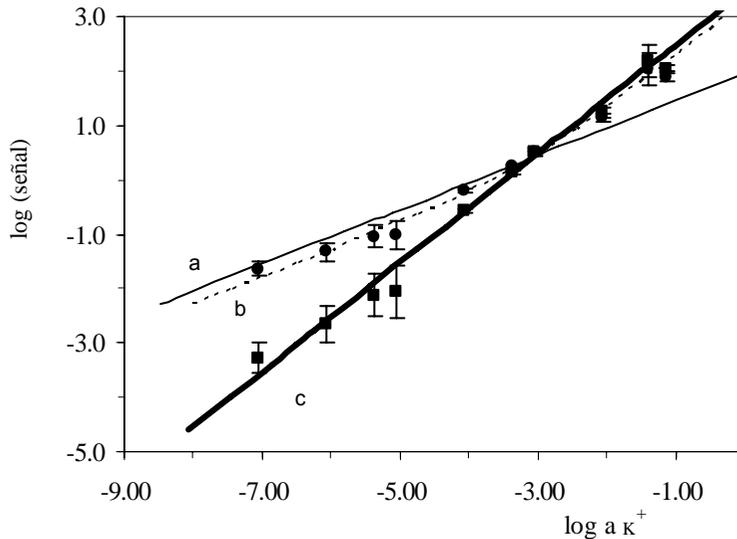


Figura7.8. Linealidad el modelo teórico con estequiometrías 1(a) y 0,5 (b, línea discontinua) La función (c), representa la inclusión del parámetro perturbador en el parámetro analítico, de manera que resultaría  $\log(\alpha/(1-\alpha_{ef})) + D(\alpha_{ef})$ . Los círculos representan los datos experimentales con  $p=0.5$  y los cuadrados, representan la unión de la contribución de  $\log(\alpha/(1-\alpha_{ef}))$  más el término  $D(\alpha_{ef})$  con  $p=0.5$  más. Datos obtenidos a 48 bits y 75 dpi.

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ) y la actividad del potasio, en modo transfectancia, se utilizaron las mismas disoluciones que en la sección 3.6.1.1 de éste Capítulo, según el caso y de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  (ec.7.2) para obtener el parámetro analítico linealizado. Los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados. Las Figuras 7.9, 7.10 y 7.11

muestran tanto los modelos sigmoidales como los lineales operando con un escáner en modo transfectancia.

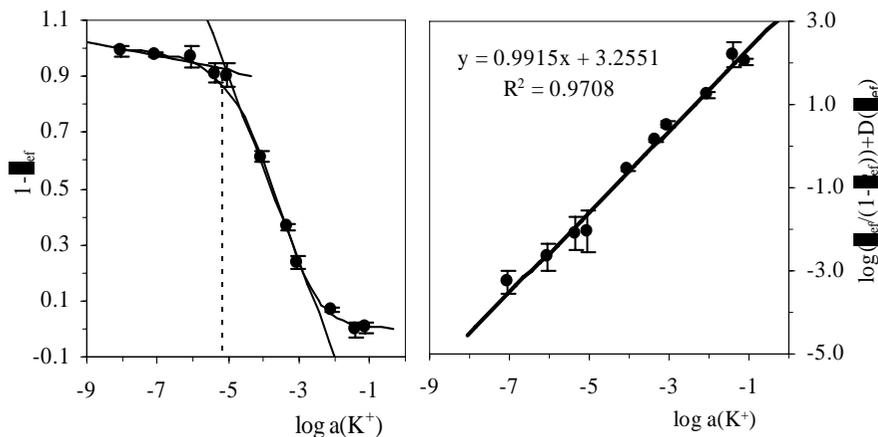


Figura 7.9. Curva de calibración para 48 bits-75 dpi: Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal.

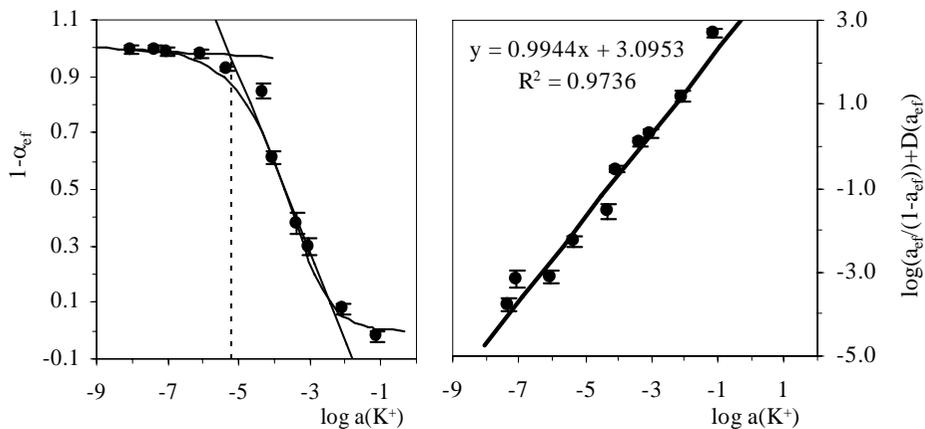


Figura 7.10. Curva de calibración para 48 bits-300dpi: Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal

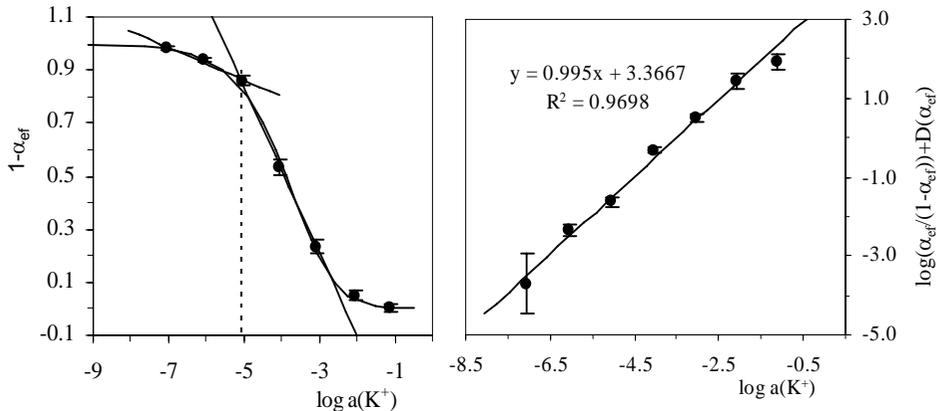


Figura 7.11. Curva de calibración para 24 bits 600 dpi: Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

Tabla 7.10. Parámetros analíticos de la membrana desechable de potasio utilizando un escáner convencional mediante el modelo sigmoideal.

Parámetro	Modelo lineal		
	75 dpi (ScanMaker)	300 dpi (ScanMaker)	HP Scanjet
Ordenada	3,2551	3,0953	3,3667
Desviación estándar de la ordenada	0,1267	0,1689	0,16815
Pendiente	0,9915	0,9944	0,9950
Desviación estándar de la pendiente	0,091	0,0357	0,03587
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9708	0,9617	0,9698
Linealidad on-line	97,07	96,41	96,40
DER%	$1 \cdot 10^{-5}$ M	2,46	2,08
	$1 \cdot 10^{-4}$ M	1,22	1,64
	$1 \cdot 10^{-3}$ M	0,80	0,99
Límite de detección (mM)	$4,23 \cdot 10^{-4}$	$2,79 \cdot 10^{-4}$	$9,8 \cdot 10^{-4}$
Rango lineal (mM)	$4,23 \cdot 10^{-4}$ -100	$2,79 \cdot 10^{-4}$ -100	$9,8 \cdot 10^{-4}$ -100

DER muestran el valor del logaritmo de la actividad de potasio

La precisión de las medidas mediante el escáner en modo transfectancia (expresada como RSD) se realizó a los mismos niveles de concentración que en el

modelo sigmoideal,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ , valores situados en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 10 veces. Obteniendo valores de DER expresadas como logaritmo de la actividad del potasio. (Tabla 7.10). En dicha Tabla aparecen además los valores obtenidos en los mismos parámetros analíticos utilizando un escáner.

El límite de detección en el modelo lineal se calculó mediante la ecuación 5.17 presentada en el Capítulo 5 de esta Memoria.

### 3.6.2.2. Escáner en modo transmisión

Como ocurre con los modelos sigmoideales estudiados más arriba (sección 3.6.2.1) cuando se estudian los modelos lineales asociados, no se observa el cambio aparente de en la estequiometría. Para verificar la relación lineal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ) y la actividad del potasio, en modo transmisión, se prepararon las mismas disoluciones que en la sección 3.6.1.2, realizando 6 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental.

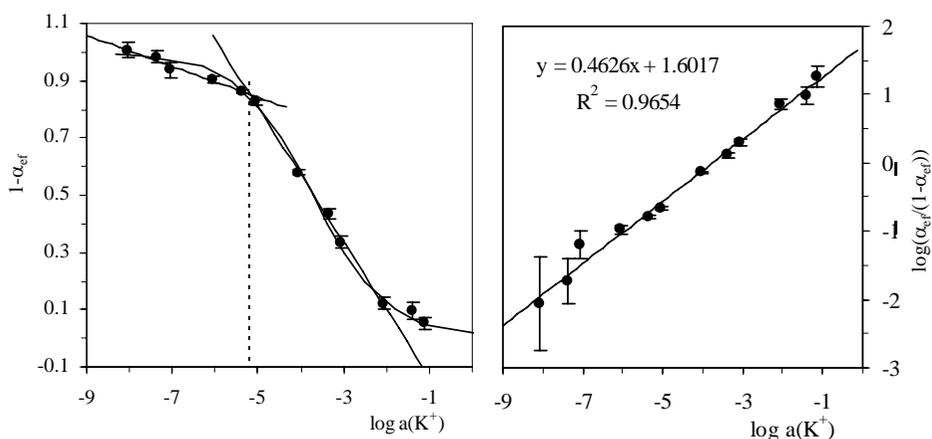


Figura 7.12. Curva de calibración para escala de grises con filtro 15-05. Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

Así se obtuvieron los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  para conseguir el parámetro analítico linealizado,  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right)$ . Los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados, mostrándose en las Figuras 7.12, 7.13 y 7.14 los modelos sigmoidales y linealizados encontrados.

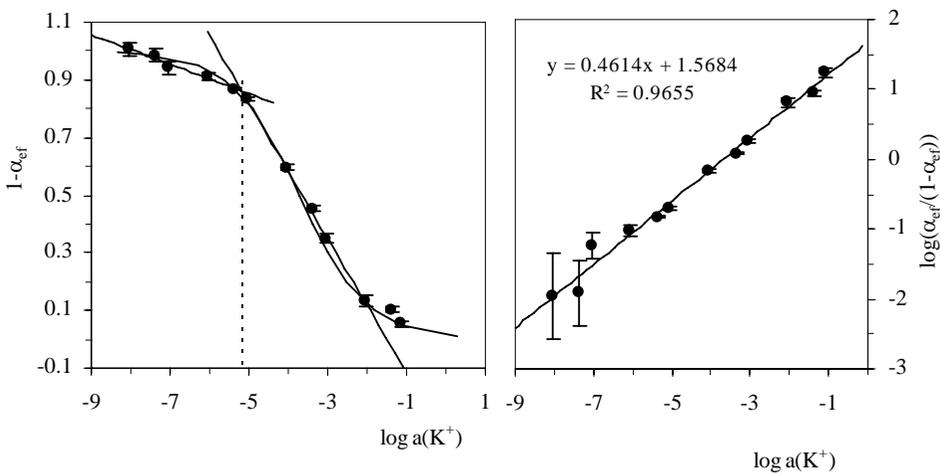


Figura 7.13. Curva de calibración para Filtro 15-05. Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal

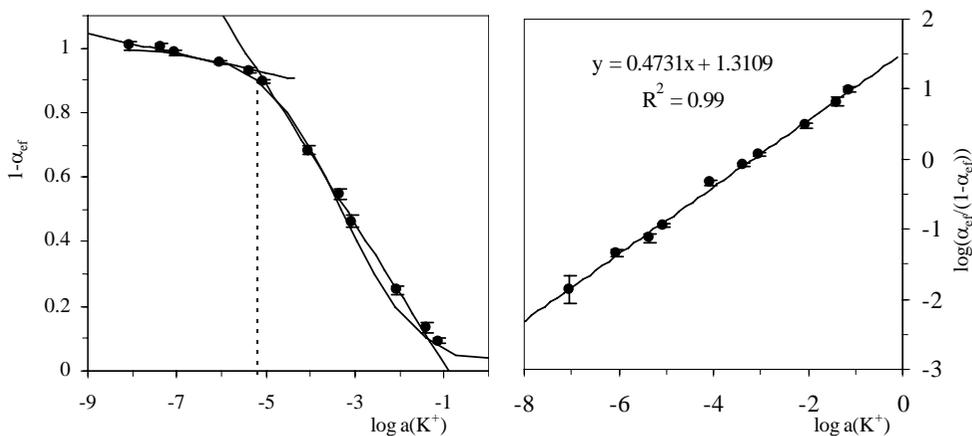


Figura 7.14. Curva de calibración sin utilizar filtros. Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal.

Tabla7.11, Parámetros analíticos de la membrana desechable de potasio utilizando un escáner en modo transmisión utilizando el modelo lineal.

Parámetro	Modelo lineal		
	Filtro 15-05	Escala de grises 15-05	Sin filtro
Ordenada	1,5684	1,6018	1,3101
Desviación estándar de la ordenada	0,0508	0,0531	0,0268
Pendiente	0,4614	0,4626	0,4731
Desviación estándar de la pendiente	0,0120	0,0111	0,0062
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9655	0,9654	0,9900
Linealidad on-line	97,62	97,60	98,68
DER%	$1 \cdot 10^{-5}$ M	1,74	1,47
	$1 \cdot 10^{-4}$ M	1,71	1,04
	$1 \cdot 10^{-3}$ M	1,46	1,04
Límite de detección (mM)	$2,02 \cdot 10^{-4}$	$2,43 \cdot 10^{-4}$	$4,88 \cdot 10^{-4}$
Rango lineal (mM)	$2,02 \cdot 10^{-4}$ -100	$2,43 \cdot 10^{-4}$ -100	$4,88 \cdot 10^{-4}$ -100

DER% muestran el valor del logaritmo de la actividad de potasio

La precisión RSD de las medidas mediante el escáner en modo transmisión se estudio a los mismos niveles de concentración que en el modelo sigmoidal,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$ , replicando 10 veces cada nivel de concentración (Tabla7.11). En dicha Tabla aparecen además los parámetros analíticos restantes. Como antes el límite de detección en el modelo lineal se calculo mediante la ecuación 5.17.

### 3.7. Veracidad

Con el objeto de demostrar la veracidad de los resultados obtenidos mediante el sistema de medida propuesto utilizando dos escáneres en modo transfectancia y transmisión, respectivamente, se preparó un experimento con 10 membranas diferentes trabajando a 3 niveles de concentración  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-3}$  M para los escáneres ScanMaker i700 y Scanjet 4100 C. Los sensores se midieron además mediante un espectrofotómetro de diodos en fila, usado como método de referencia. En cada caso se uso su propio parámetro analítico junto con su función

de calibración. El estudio de veracidad se realizó entre (a) datos con modelo sigmoideal (espectrofotómetro y escáner); (b) modelo sigmoideal (escáner) y modelo lineal (escáner) y (c) datos con modelo sigmoideal (espectrofotómetro) y con modelo lineal (escáner). Los resultados, expresados en  $\log a_{(k)^+}$ , del escáner fueron representados frente a los resultantes de la medida con el espectrofotómetro de diodos en fila, esperando obtener una línea recta de pendiente la unidad y ordenada en el origen de cero. Esta línea de regresión fue comprobada usando el test de la  $F^{36}$ , con el que se comprobó que la pendiente no difiere significativamente de 1 y la ordenada en el origen no presenta diferencias significativas con cero. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla.7.12 para transfectancia y en la Tabla 7.13 para transmisión.

Tabla 7.12. Estudio estadístico para demostrar la veracidad de los datos del escáner en nodo transfectancia usando el test de la ordenada y la pendiente.  $F_{teo}$  ScanMaker: 3,34;  $\alpha$ : 0,05; Grados de libertad: 28,  $F_{teo}$  HP: 4,1;  $\alpha$ : 0,05; Grados de libertad: 10. En todos los casos resultó  $F_{cal} < F_{teo}$ .

		<b>ScanMaker i 700</b>		<b>Scanjet 4100C</b>
		75 dpi	300 dpi	
<b>Sigmoideal (diodos)</b>	Ordenada	-0,13	-0,063	-0,11
	Pendiente	0,97	0,98	0,99
<b>vs</b>				
<b>Sigmoideal (escáner)</b>	Fcal	1,56	0,30	0,02
	R <sup>2</sup> (%)	99,4	97,0	99,9
<b>Sigmoideal (scanner)</b>	Ordenada	-0,13	-0,29	0,28
	Pendiente	0,97	0,93	1,05
<b>vs</b>				
<b>Modelo lineal (escáner)</b>	Fcal	$2,1 \cdot 10^{-3}$	$8,3 \cdot 10^{-6}$	1,33
	R <sup>2</sup> (%)	94,5	92,5	98,9
<b>Sigmoideal (diodos)</b>	Ordenada	-0,25	-0,20	0,16
	Pendiente	0,95	0,96	1,03
<b>vs</b>				
<b>Modelo lineal (escáner)</b>	Fcal	0,21	0,38	1,11
	R <sup>2</sup> (%)	95,4	97,5	98,1

Tabla 7.13. Estudio estadístico para demostrar la veracidad de los datos del escáner en modo transmisión usando el test de la ordenada y la pendiente.  $F_{\text{teo}}$  ScanMaker: 3,34;  $\alpha$ : 0,05; Grados de libertad: 28,  $F_{\text{teo}}$  HP: 4,1;  $\alpha$ : 0,05; Grados de libertad: 10. En todos los casos resultó  $F_{\text{cal}} < F_{\text{teo}}$ .

		Filtro 15-05	Escala de grises	Sin filtro
<b>Sigmoidal (diodos)</b>	Ordenada	0,1247	0,1384	-0,1050
	Pendiente	1,0302	1,0340	0,9761
<b>vs</b>	Fcal	0,010	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,190
<b>Sigmoidal (escáner)</b>	R <sup>2</sup> (%)	97,54	99,72	99,28
<b>Sigmoidal (scanner)</b>	Ordenada	-0,1702	-0,2657	-0,0741
	Pendiente	0,9577	0,9357	0,9819
<b>vs</b>	Fcal	$5,5 \cdot 10^{-4}$	0,029	$2,0 \cdot 10^{-5}$
<b>Modelo lineal (escáner)</b>	R <sup>2</sup> (%)	98,38	99,04	96,02
<b>Sigmoidal (diodos)</b>	Ordenada	-0,0305	-0,1254	-0,1296
	Pendiente	0,9917	0,9702	0,9701
<b>vs</b>	Fcal	0,013	0,034	0,033
<b>Modelo lineal (escáner)</b>	R <sup>2</sup> (%)	98,97	99,31	97,67

### 3.8. Validación y aplicaciones

El presente procedimiento fue aplicado a la determinación de potasio en muestras reales para demostrar su utilidad.

Tabla 7.14 Determinación de potasio en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando escáneres en modo transfectancia. Método de referencia: espectrofotometría de absorción atómica.

Muestra	EAA	75 dpi (ScanMaker)		300 dpi (ScanMaker)		HP scanjet	
	K <sup>+</sup> (mM) ± s	K <sup>+</sup> (mM) ± s	P <sub>val</sub> (%)	K <sup>+</sup> (mM) ± s	P <sub>val</sub> (%)	K <sup>+</sup> (mM) ± s	P <sub>val</sub> (%)
Sidra	23±0,31	23±2,9	95,3	23±3,3	8,2	24±1,1	48,5
Agua mineral Vichy Catalán	1,6±0,020	1,7±,071	8,3	1,7±0,064	10,1	1,9±0,21	9,5
Agua mineral Mondariz	0,13±8,4·10 <sup>-4</sup>	0,14±0,008	7,2	0,14±0,008	7,1	0,13±0,054	16,9
Nieve Sierra Nevada	9,4·10 <sup>-3</sup> ±1,9·10 <sup>-4</sup>	7,5·10 <sup>-3</sup> ±2,2·10 <sup>-3</sup>	21	9,8·10 <sup>-3</sup> ±4,2·10 <sup>-4</sup>	16,3	8,7·10 <sup>-3</sup> ±8,0·10 <sup>-4</sup>	22,2
Lluvia Granada	1,7·10 <sup>-3</sup> ±5,4·10 <sup>-5</sup>	1,5·10 <sup>-3</sup> ±7,3·10 <sup>-4</sup>	69,6	2,1·10 <sup>-3</sup> ±9,1·10 <sup>-4</sup>	39,8	1,3·10 <sup>-3</sup> ±5,7·10 <sup>-4</sup>	40
Zumo tomate	73±0,39	77±12	10,6	75±12	8,6	77±20	35,5
Mar							
Almuñecar, Granada	24±0,094	26±2,3	16,5	23±1,4	36,9	24±3,8	18,0

Para hacer esto, se seleccionaron muestras de aguas de diferente procedencia (grifo, pozo, río, nieve, mar) cuya concentración en dureza y potasio está en las nuevas zonas del rango dinámico lineal obtenido en el método de linealización propuesto.

En la Tabla 7.14 y 7.15 se muestran los resultados obtenidos empleando el procedimiento descrito para potasio usando el escáner en modo transfectancia y en transmisión, respectivamente, comparados con un método de espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia. Ambas Tablas incluye también los valores medios para tres determinaciones de cada muestra y la desviación estandar de estas medidas y el nivel de probabilidad ( $P_{val}$ ) del test de comparación de medias empleado. Como se observa, no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando los sensores y el método de referencia. Para cada muestra se le realizaron 3 réplicas.

Tabla 7.15. Determinación de potasio en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando un escáner en modo transmisión. Se empleó espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia. Los resultados se obtuvieron a partir de tres réplicas del análisis.

Muestra	EAA	Filtro 15-05	Escala de Grises 15-05		Sin Filtros		
	$K^+(mM) \pm s$	$K^+(mM) \pm s$	$P_{val}$ (%)	$K^+(mM) \pm s$	$P_{val}$ (%)	$K^+(mM) \pm s$	$P_{val}$ (%)
Sidra	23±0,31	21 ±4,2	48,1	23±1,6	58,0	24 ±1,3	28,2
Agua mineral Vichy Catalán	1,6±0,020	1,5±0,32	60,4	1,4±0,36	28,5	1,5 ±1,3	39,9
Agua mineral Mondariz	0,13±8,4·10 <sup>-4</sup>	0,14±0,013	7,8	0,14 ±0,012	16,0	0,19 ±0,045	6,5
Nieve							
Sierra Nevada Granada	9,4·10 <sup>-3</sup> ±1,9·10 <sup>-4</sup>	5,5·10 <sup>-3</sup> ±9,9·10 <sup>-4</sup>	47,6	9,2·10 <sup>-3</sup> ±3,4·10 <sup>-3</sup>	19,1	6,2·10 <sup>-3</sup> ±2,4·10 <sup>-4</sup>	8
Lluvia Granada	1,7·10 <sup>-3</sup> ±5,4·10 <sup>-5</sup>	1,2·10 <sup>-3</sup> ±8,7·10 <sup>-4</sup>	19,1	1,3·10 <sup>-3</sup> ±6,2·10 <sup>-4</sup>	35,4	1,3·10 <sup>-3</sup> ±4,1·10 <sup>-4</sup>	5,1
Zumo de tomate	73±0,39	79±7,4	6	75 ±12	73,3	70 ±8,4	64,3
Mar							
Almuñecar, Granada	24±0,094	24±2,1	67,7	23 ±2,4	61,8	25 ±1,5	31,8

Dado el amplio intervalo de concentraciones estudiado en la validación, se ha empleado el error relativo cuadrático medio (RMSRE) como estadístico para evaluar la capacidad de predicción de la calibración propuesta en relación con las concentraciones de referencia. El RMSRE fue calculado de mediante la expresión:

$$\text{RMSRE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left( \frac{\text{CONC}_{\text{estimada}} - \text{CONC}_{\text{referencia}}}{\text{CONC}_{\text{referencia}}} \right)^2} \quad (7.23)$$

donde N es el número de referencias (número de muestras que se utilizan en la validación) en el conjunto del ensayo. Los valores que se obtuvieron para el conjunto de datos de la Tabla 7.14 son para Scanjet 4100 C 0,11, y para ScanMaker i700, en 300dpi es de 0,15 y para 75dpi es de 0,12 para el sistema analítico de potasio. Con el escáner en modo transmisión tenemos que usando el filtro 15-05, el valor de RMSRE es de 0,12 con escala de grises en filtro 15-05 es de 0,14 y sin filtros es de 0,17. (Tabla 7.15). Siendo estos valores de RMSRE sensiblemente inferiores a los obtenidos en las muestras utilizadas en el Capítulo 5 de esta Memoria.

#### 4. Conclusiones

Hemos aplicado y demostrado la viabilidad de uso de un escáner óptico convencional para cuantificar potasio en disoluciones acuosas usando sensores desechables. Haciendo uso de un protocolo de análisis para las imágenes digitales se han optimizado las variables del escáner. Este protocolo consta de tres aspectos diferentes: i) Gestión del color, relaciona los colores reales con los colores generados, y permite un descenso de la influencia de usar un escáner u otro: ii) Calibración del escáner para verificar la veracidad de los colores generados y iii) adquisición de la imagen a través del estudio de diferentes variables relacionadas para conseguir la máxima información de la imagen.

Con esta metodología se intentan establecer unas condiciones consideradas como óptimas para utilizarlas sobre cualquier escáner, de manera que la medida no esté afectada o en su defecto lo mínimo posible por el estado del escáner.

La luminosidad promedio de un canal cogido del histograma de la imagen digitalizada del sensor se usa para obtener el parámetro analítico, que es una luminosidad relativa, relacionada a través de la función sigmoïdal con el logaritmo de la actividad del potasio. Con el procedimiento descrito, basado en un escáner de sobremesa, es posible conseguir simultáneamente la imagen de diferentes membranas desechables, acortando de esta manera el tiempo de análisis y reduciendo el posible costo del análisis utilizando un aparato barato y de uso común.

## 5. Bibliografía.

1. C.A.Poynton Introduction to Digital video, Wiley: 1996; Chapter 6.
2. IEC 61966-2-1 (1999-10) International Electrotechnical Commission 1999.
3. Bassignani, Matthew J.; Bubash-Faust, Lori; Ciambotti, Jonathan; Moran, Ruth; McIlhenny, Joan Acad Radiol 2003, 10, 536-42.
4. Rodriguez, Hugo. Curso de Escaner. [www.hugorodriguez.com](http://www.hugorodriguez.com) 2004.
5. Marty, Stephanie; Baker, Ken; bildox-Alvarado, Elena; Rodrigues, Juliana Neves; Marangoni, Alejandro G. Food Res.Intern. 2005, 38, 1189-97.
6. Porta, Paulo. Mejorar el enfoque. <http://www.quesabesde.com/camdig/articulos.asp?articulo=120> 15-3-2005.
7. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. Anal.Chim.Acta 2003, 481, 139-48.
8. Meier, P. C. Anal.Chim.Acta 1982, 136, 363-68.
9. MacDonald, Lindsay W. Displays 1996, 16, 203-11.
10. Gruber, Michael; Leberl, Franz J.Photog.Rem.Sens. 2001, 55, 313-29.

11. Hatcher, D. W.; Symons, S. J.; Manivannan, U. J. *Food Eng.* 2004, 61, 109-17.
12. von Olleschik-Elbheim, Lars; el Baya, Ali; Schmidt, M. Alexander *J. Immunol. Methods* 1996, 197, 181-86.
13. Shishkin, Yu; Dmitrienko, S. G.; Medvedeva, O. M.; Badakova, S. A.; Pyatkova, L. N. *J. Anal. Chem.* 2004, 59, 102-06.
14. Kompany-Zareh, Mohsen; Mirzaei, Siavash *Anal. Chim. Acta* 2004, 521, 231-36.
15. Finlayson, Graham; Hordley, Steven; Schaefer, Gerald; Tian, Gui Yun *Patt. Recog.* 2005, 38, 179-90.
16. Silverfast SilverFast Manual, 2004; Chapter 5.
17. Yu, Longjiang; Niu, Xiamu; Sun, Shenghe *Imag. Vis. Comp.* 2005, 1-8.
18. Porta, Paulo. Curvas de ajuste: Ejemplos Prácticos. <http://www.quesabesde.com/camdig/articulos.asp?articulo=114> 2005.
19. Fernández, R. Retoque digital. Ajuste de color usando Curvas. <http://www.virtual-sub.org/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=29> 2007.
20. Canon INC. Image-quality Improvement Technologies. [http://www.canon.com/technology/canon\\_tech/explanation/image\\_processing.html](http://www.canon.com/technology/canon_tech/explanation/image_processing.html) 2007.
21. Kompany-Zareh, Mohsen; Mansourian, Mahboubeh; Ravaee, Fariba *Anal. Chim. Acta* 2002, 471, 97-104.
22. Abbaspour, Abdolkarim; Mehrgardi, Masoud A.; Noori, Abolhasan; Kamyabi, Mohammad Ali; Khalafi-Nezhad, Ali; Soltani Rad, Mohammad Navid *Sens. Actuators B* 2006, B113, 857-65.
23. Birch, Nathan C.; Stickle, Douglas F. *Clin. Chim. Acta* 2003, 333, 95-96.
24. Goodey, A. P.; Lavigne, J. J.; Savoy, S. M.; Rodriguez, M. D.; Curey, T.; Tsao, A.; Simmons, G.; Wright, J.; Yoo, S. J.; Sohn, Y.; Anslyn, E. V.; Shear, J. B.; Neikirk, D. P.; McDevitt, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 2559-70.
25. Lancaster, Michael; Goodall, David M.; Bergstroem, Edmund T.; McCrossen, Sean; Myers, Peter *Anal. Chem.* 2006, 78, 905-11.

26. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernandez Ramos, M. D.; Al Natsheh, Muneer Sens.Actuators B 2003, B88, 217-22.
27. Huertas, R.; Melgosa, M.; Martinez-Verdu, F.; Lapresta-Fernandez, A.; Fernandez-Ramos, M. D.; Capitan-Vallvey, L. F. 2006 45-51.
28. Schroder, William B. Curr Surg 2002, 59, 581-87.
29. Marschallinger, R.; Johnson, S. E. Computers & Geosciences 2001, 27, 467-76.
30. Muñoz, G. S. and Reichmann, M. H. Enfocar con el filtro de paso alto. [http://www.gusgsm.com/enfocar\\_paso\\_alto](http://www.gusgsm.com/enfocar_paso_alto) 2001.
31. Reichmann, M. H. High pass sharpening. <http://www.luminous-landscape.com/> 2007.
32. Bleic, Paul. Digital photographs: From camera to Photoshop. <http://home.comcast.net/~bleicher/> 2007.
33. Yam, Kit L.; Papadakis, Spyridon E. J.Food Eng. 2004, 61, 137-42.
34. Halazonetis, Demetrios J. Am J Orthod Dentofacial Orthop 2004, 125, 117-18.
35. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. Anal.Chim.Acta 2002, 451, 231-41.
36. Massart, D. L.; Dijkstra, A.; Kaufman, L. Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures : a survey of statistical and mathematical techniques, Elsevier: Amsterdam, 1978.

## **CAPÍTULO 8**

# **EMPLEO DE UNA CÁMARA CCD PARA LA MEDIDA DE SENSORES DESECHABLES**



## **EMPLEO DE UNA CÁMARA CCD PARA LA MEDIDA DE SENSORES DESECHABLES**

### **Resumen**

Los avances en la captura de la imagen haciendo uso de una cámara CCD, han experimentado un gran incremento tanto en la investigación del color en áreas muy diferentes como en Química Analítica. En esta última mediante su incorporación en instrumentación analítica y el desarrollo de procedimientos para cuantificar simultáneamente multitud de analitos de interés o para hacer screening de alto rendimiento (High-throughput screening). En el presenta Capítulo de esta Memoria de Doctorado, describimos cómo la captura de imagen mediante una cámara CCD, permite determinar y cuantificar simultáneamente diferentes especies como pueden ser potasio, magnesio y dureza mediante el uso de sensores desechables basados en una química ionóforo-cromoionóforo. La principal ventaja del empleo de la captura de imagen, es que permite monitorizar simultáneamente gran cantidad de sensores, siendo también importante la versatilidad y la flexibilidad de este método y el uso de una instrumentación no excesivamente cara o de dispositivos específicos. El sistema se equipa con una lámpara halógena como fuente de luz, la cual proporciona suficiente iluminación para nuestra área de medida. Dicha lámpara dispuesta sobre una plataforma rotacional y traslacional, para poder dirigir el haz de luz bajo el ángulo conveniente sobre la zona de detección. En la cámara CCD provista de un objetivo adecuado, se coloca un filtro de paso de banda de unos pocos nanómetros para seleccionar la longitud de onda de trabajo, que es 482 nm. Con este dispositivo es posible una determinación adecuada de las especies arriba mencionadas y permite obtener unos buenos resultados comparables a los obtenidos usando una instrumentación convencional como es un espectrofotómetro de diodos en fila.

## 1. Introducción

El principal objetivo de este trabajo se centra en el desarrollo y puesta a punto de una cámara CCD que adquiere imágenes en blanco y negro, para su empleo en sensores desechables que responden a K(I), Mg(II) y a dureza de forma simultánea. La cámara CCD ha sido ampliamente utilizada en Química Analítica debido a las posibilidades que presenta para la detección simultánea de analitos, siendo las imágenes obtenidas utilizadas con diferentes propósitos.

En el Capítulo precedente se ha utilizado para la determinación de K(I) el cambio de color que sufre la zona sensora de la membrana desechable que se mide mediante un escáner. No obstante, el uso de una cámara CCD conectada a un ordenador, permiten una adquisición de la imagen digital más rápida que utilizando un escáner. Así, en este Capítulo 8 hemos desarrollado un nuevo método para la determinación simultánea de K(I), Mg(II) y dureza, mediante la medida de la luz reflejada por la zona sensora de la membranas desechables dispuestas sobre una lámina de papel mate de color blanco usado para realzar el contraste. Se ha intentado seleccionar la luz que llega al sensor CCD, haciendo uso de un filtro de paso de banda centrado a 480 nm, aunque reduce la intensidad causando problemas en la sensibilidad. Además, cambiando los filtros ópticos en el sistema, se puede alterar el camino óptico del haz de luz que llega al detector, aspecto este que hay que cuidar especialmente.

La sensibilidad de un detector CCD es alta cuando se utilizan cámaras refrigeradas o se trabaja en el modo "binning" es decir, agrupando los píxeles para formar un superpíxel, de manera que se aumente la sensibilidad<sup>1</sup>. Nosotros en este trabajo hemos empleado una cámara CCD sin refrigerar, y sin hacer uso del modo binning, demostrando que no es necesario para esta aplicación. Las imágenes CCD, son digitalizadas, procesadas, y visualizadas en un ordenador personal de donde se obtiene la información de cada canal, la cual es utilizada para construir las funciones de calibrado.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentación y software

Para llevar a cabo las medidas mediante la cámara CCD hemos utilizado un portamuestras de diseño propio (ver Capítulo anterior) fabricado en poliestireno blanco (Evergreen, Woodinville, EE.UU.). Para obtener las imágenes digitales se ha usado una cámara digital Pixelfly qe, de 12 Bits en blanco y negro (PCO, Kelheim, Alemania) conectada a una tarjeta PCI de un ordenador personal. La visualización y adquisición de las imágenes digitales y el control de la cámara, fue realizado utilizando el programa Camware ver 2.03 suministrado por PCO. El programa utilizado para obtener del color de la zona sensora de la membrana desechable fue el Adobe Photoshop CS ver 8.0.1. (Adobe System Inc., San Jose, CA, EE.UU.) y Paint Shop Pro ver 7.04 (Jasc software, Ottawa, Canada). Otros materials necesarios fueron los siguientes: filtro de paso de banda de referencia 480FS10-25 suministrado por Andover Corporation (Andover, Salem, EE.UU.); objetivo CCTV con montura convencional C suministrado por Tamron (Omiya, Saitama, Japón); lámpara halógena comercial de CEIEC (Shenzhen, China) y luxómetro digital DigiPro F de PCE Group Ibérica (Tobarra, Murcia).

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila (Nortwalk, CT, EE.UU.) conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200. Dicho espectrofotómetro está equipado con un soporte metálico de 44 mm de alto y 12 de fondo, pintado en negro mate que se coloca en el compartimiento de cubetas<sup>2</sup>. La adquisición y la manipulación de los datos espectrales fueron realizadas usando el programa Chemstation suministrado por HP para las medidas de absorbancia.

Los programas utilizados para el tratamiento de datos y el ajuste de datos experimentales y cálculos estadísticos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC.

Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU., 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzner y adaptado por J. Garrido. Mathematica ver. 5.0, 1988-2003 (Wolfram Research) y Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE.UU.) para cálculos generales junto con OriginPro 7.5 (Northampton, MA, EE.UU.).

## 2.2. Reactivos y materiales

Los reactivos químicos y materiales empleados para realizar las membranas de potasio y dureza han sido descritos en el Capítulo 4 de esta Memoria en la sección 2.1 y en el Capítulo 5 sección 3.1, respectivamente.

La disolución patrón de magnesio (1,0 M) se preparó en agua, por pesada de  $MgCO_3$  (Merck, Darmstadt, Alemania) y disolución en HCl. Disoluciones de menor concentración se prepararon por dilución con agua. Tampones: 0,2 M de pH 9,0 a partir de tris(hidroximetil)amino metano (Tris) (Sigma-Aldrich) y HCl (Merk).

En la preparación de las membranas sensoras para magnesio, se utilizó cloruro de polivinilo de alto peso molecular (PVC), tributil fosfato (TBP), y tetrahidrofurano (THF), todos ellos adquiridos a Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid), potasio tetrakis (4-clorofenil)borato sódico (TCPB) suministrado por Fluka (Fluka, Madrid). El siguiente ionóforo y el cromoióforo fueron sintetizados, purificados y caracterizados por nosotros de acuerdo con la bibliografía: 4,13-[bis(N-adamantilcarbamoil)acetil]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13,-diazaciclooctadecano (K22B5)<sup>2,3</sup>; N,N' diheptil-N,N'-dimetil-aspartamida<sup>4</sup>, y 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina<sup>5</sup>. Como soporte se utilizaron láminas de poliéster tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, UK).

### 2.3. Preparación de la membrana sensora

Las membranas se fabricaron sobre un soporte de poliéster empleando la técnica de recubrimiento giratorio<sup>6</sup>. Las mezclas para la preparación de las membranas sensibles a potasio y dureza se describen en el capítulo 4 sección 2.2 y en el capítulo 5 sección 3.2 respectivamente. Las membranas sensibles a magnesio se hicieron a partir de una disolución que contenía: 25,00 mg (27,5 % p/p) de PVC, 63,00 mg (69,2 % p/p) de tributilfosfato (TBP), 0,95 mg (1,0 % p/p) de N,N' diheptil-N,N'-dimetil-aspartamida, 0,78 mg (0,9 % p/p) de ionóforo 1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxacina y 1,33 mg (1,5 % p/p) de tetrakis(7-clorofenil)borato potásico. Las tres mezclas, se disuelven de forma separada en 1,0 mL de tetrahidrofurano en un vial de vidrio recientemente destilado. Los sensores desechables fueron preparados depositando 20  $\mu\text{L}$  de esta mezcla sobre una lámina de poliéster de 14 mm  $\times$  40 mm  $\times$  0,5 mm de espesor con ayuda de un sistema centrífugo de preparación de membranas rotando a 180 rpm<sup>6</sup>. Tras dejar girando durante 30 segundos, se extrajo la membrana del sistema centrífugo de preparación de membranas y se dejaron secar en un desecador con atmósfera saturada de tetrahidrofurano durante 1 minuto a temperatura ambiente. La zona sensora del sensor desechable es una película circular de 12 mm de diámetro, transparente, de color rojo, con un espesor calculado de 7  $\mu\text{m}$  para magnesio. La concentración para el cóctel de potasio de ionóforo, cromoionóforo y anión lipofílico en el sensor seco para la membrana sensible a magnesio son de 29,34, 14,67, y 29,43  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ , respectivamente.

### 2.4. Condiciones de medida

La respuesta del sensor desechable para potasio fue evaluada por adición de 9 mL de la disolución a ensayar en un tubo de plástico de polietileno junto con 1 mL de disolución tampón 0,2 M de Tris de pH 9,0. A continuación, se introduce el sensor desechable en el tubo durante 5 minutos sin agitación. Tras alcanzar el

equilibrio, se saca la membrana de la disolución, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar y se introduce en un porta muestras de fabricación propia para el escáner cubriéndolo con una lámina de color blanco para realzar el contraste. La información del color, en cada sensor desechable, fue descompuesta en los colores rojo, verde y azul provenientes del espacio de color RGB, esta información fue obtenida de un área de la zona sensora del sensor desechable, denominada región del interés (ROI), para cada canal, como un valor medio, usando la opción histograma de Photoshop. Finalmente, estos valores fueron transferidos a una hoja de cálculo para el análisis de los datos. Para comparar el procedimiento de la medida y evaluar el funcionamiento de la cámara CCD, las membranas desechables para potasio también fueron medidas usando un espectrofotómetro de diodos en fila.

La metodología a seguir con dicho espectrofotómetro de diodos en fila es la siguiente, tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución, se sacude para eliminar las gotas de disolución que la puedan mojar y se mide su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro de diodos en línea Hewlett-Packard (modelo 8453; Nortwalk, CT) provisto de un soporte de cubeta para el sensor desechable fabricado en hierro y pintado de negro mate<sup>2</sup>. Los valores de absorbancia, correspondientes a la especie completamente protonada ( $A_{HC}$ ) y desprotonada ( $A_C$ ) del cromoforo necesarios para calcular los valores de  $\alpha_{ef}$ , se midieron acondicionando los sensores desechables en tampón Tris  $2 \cdot 10^{-2}$  M y NaOH  $10^{-2}$  M. Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-Hückel<sup>7</sup>. Para corregir la absorbancia del fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar, además para las medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila, la precisión mejora una media de un 2% cuyo valor de la línea base, medido a 800 nm, es sustraído en todos los casos. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no necesitaron ser acondicionadas antes de su uso.

### 3. Teoría

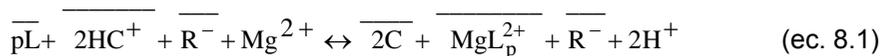
#### 3.1. Modelo general

Los modelos teóricos sigmoidales y lineales utilizados para los sensores de potasio y dureza, han sido descritos ampliamente en el Capítulo 5 de esta Memoria. A continuación se detallan los modelos teóricos para las membranas de magnesio.

#### 3.2. Modelo para magnesio

Esta tira reactiva se basa, al igual que las dos anteriores, en un mecanismo de intercambio iónico entre una membrana orgánica de PVC plastificado y una fase acuosa que contiene el analito, tal como se ha descrito en el Capítulo 5 de esta Memoria de Doctorado. La zona sensora de la tira reactiva contendrá un ionóforo selectivo para magnesio L y un cromoionóforo selectivo para protones C, que originan las especies  $MgL_p^{2+}$  y  $HC^+$ , respectivamente, y además una sal de anión lipofílico que permite ese intercambio iónico.

En la zona sensora en contacto con una disolución acuosa que contiene el analito tendrá lugar, suponiendo que la estequiometría del proceso es 1:p (Mg:L), la siguiente reacción:



Como consecuencia de esa reacción tendrá lugar una transferencia de magnesio desde la disolución a la membrana, en razón al cociente de actividades de alcalinotérreo a protones en disolución. La medida de la absorbancia de la forma

protonada del cromoióforo permitirá el cálculo del grado de protonación  $1-\alpha$ , que será el parámetro analítico, tal como hemos visto con anterioridad en los modelos sigmoidales. Sin embargo, por las razones ya comentadas, nosotros usaremos el grado de protonación en nuestras condiciones de trabajo; esto es, el grado de protonación efectivo  $1-\alpha_{\text{ef}}$ .

La actividad en magnesio en fase acuosa se relaciona con la constante de equilibrio del proceso  $K_e^{\text{MgL}^{2+}}$ ,  $\alpha_{\text{ef}}$  y la actividad en protones  $a_{\text{H}^+}$ , según la ecuación:

$$a_{\text{Mg}^{2+}} = \frac{1}{K_e^{\text{MgL}^{2+}}} \left( \frac{a_{\text{H}^+} \alpha_{\text{ef}}}{1 - \alpha_{\text{ef}}} \right)^2 \frac{C_R - (1 - \alpha_{\text{ef}}) C_C}{2 \left( C_L - \frac{p}{2} (C_R - (1 - \alpha_{\text{ef}}) C_C) \right)^p} \quad (\text{ec. 8.2})$$

En ella,  $C_L$  es la concentración analítica de ionóforo,  $C_C$  de cromoióforo y  $C_R$  de sal lipofílica. El ajuste del pH con una disolución reguladora de pH conocido permitirá la determinación de la actividad en magnesio.

Las concentraciones analíticas de ionóforo, cromoióforo y sal lipofílica cumplen la condición para el modelo de magnesio:  $C_L = C_R = (1/2) C_R = C$ , y,  $v = 2$  y  $p = 0.5^2$ , así, la ecuación 8.2 resulta:

$$a_{\text{M}^{2+}} = \frac{a_{\text{H}^+}^2}{K_{\text{exch}}^{\text{M}^{2+}}} \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right)^2 \cdot \left( \frac{2\alpha_{\text{eff}} - 1}{\sqrt{5 - 2\alpha_{\text{eff}}}} \right) \cdot \sqrt{C} \quad (\text{ec. 8.3})$$

Tomando logaritmos decimales en la ecuación 8.3 resulta:

$$\log\left(\frac{\alpha_{\text{eff}}}{1-\alpha_{\text{eff}}}\right) + \frac{1}{2} \log\left(\frac{2\alpha_{\text{eff}}-1}{\sqrt{5-2\alpha_{\text{eff}}}}\right) = \frac{1}{2} \log\frac{K_{\text{exch}}^{M^{2+}}}{a_{H^+}^2 \sqrt{C}} + \frac{1}{2} \log a_{M^{2+}} \quad (\text{ec. 8.4})$$

En este caso y análogamente al caso de dureza, el parámetro disturbador  $D(\alpha_{\text{ef}})$  no presenta una dependencia lineal con el logaritmo de la actividad, lo cual produce una perturbación en el modelo lineal. Como se muestra en la Figura 8.1, el término disturbador muestra un comportamiento casi nulo en relación con  $X$  y, por esta razón, cuyo  $Y(\alpha_{\text{ef}})$  se representa frente a  $X$ , se obtiene un línea recta, aunque muestra una pendiente menor que el valor teórico  $1/2$ .

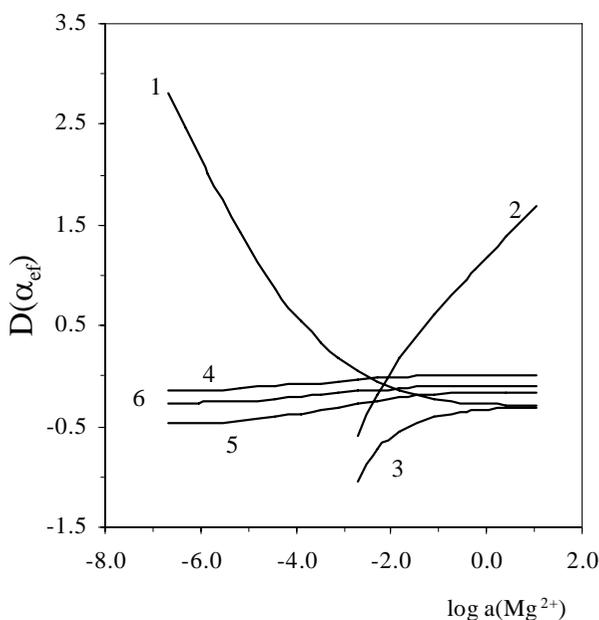


Figura 8.1. Variación del logit decimal  $D(\alpha)$  como una función del logaritmo decimal para magnesio: 1:  $\nu=1$ ,  $p=2$ ; 2:  $\nu=1$ ,  $p=1$ ; 3:  $\nu=1$ ,  $p=0,5$ ; 4:  $\nu=2$ ,  $p=0,5$ ; 5:  $\nu=2$ ,  $p=2$ ; 6:  $\nu=2$ ,  $p=1$ .

El límite de detección en los modelos lineales se calculó de la misma forma como se ha empleado en esta Memoria de tesis para el modelo lineal. (Véase el Capítulo 5, ecuación 5.17).

### 3.3. Sistema de análisis de imagen

Todas las medidas, empleando la cámara CCD, han sido realizadas dentro de una habitación mantenida a temperatura constante, por precaución, para mantener, bajo y constante, el ruido generado por la temperatura en el sensor CCD, en ausencia de luz ambiental, con el propósito de evitar interferencias y reflexiones de la luz exterior. Así, la cámara CCD usada que no dispone de un sistema de refrigeración termoeléctrico o de Peltier, ha operado a una temperatura interna constante de 37 °C.

**Sistema de Iluminación:** las membranas desechables han sido iluminadas usando una lámpara halógena con 150 W de potencia y 230 V como fuente de luz. La fuente de luz fue montada sobre una plataforma rotacional y traslacional con el objetivo de dirigir el haz de luz con un ángulo conveniente sobre el área de detección, donde son dispuestas las membranas desechables. Dicha lámpara fue alineada de forma paralela a la cámara CCD, y situada a 30 cm de longitud de la zona de detección y dispuesta a 25 cm de altura y con un ángulo de 45° con respecto a la normal (plano con las membranas desechables). El tiempo de estabilización para la lámpara fue establecido en 5 min, hasta alcanzar 1600 Lux medidos con un luxómetro digital.

**Adquisición de la imagen:** La luz transmitida es detectada por el sistema de imagen basado en una cámara CCD, situada sobre el plano físico del fondo (lámina blanca de poliestireno sobre un tablero óptico) a una distancia de 15 cm del área de detección. La cámara CCD se situó sobre una plataforma similar a la utilizada para la fuente de luz, con un ángulo de 8 grados con la normal, del área de detección, para evitar medidas directas de reflexiones especulares provenientes de las muestras hacia el objetivo empleado. Así, hemos intentado usar una geometría 45/8. La zona de detección, es una zona rectangular de la lámina de poliestireno con unas dimensiones de 8x6,5 cm y situada sobre el tablero óptico. Esta configuración permite la medida simultánea de un amplio número de membranas

desechables. Estas membranas se disponen sobre la lámina blanca para conseguir una iluminación uniforme y reducir los reflejos y las reflexiones especulares<sup>8</sup>. Para obtener la mayor resolución de la imagen, la cámara CCD se situó tan cerca como fue posible de las membranas desechables<sup>9</sup>, con el propósito de abarcar un ROI circular de 12 mm de diámetro dentro de un área de detección de 8x6,5 cm. Así es posible colocar la cámara CCD a una altura de 15 cm.

Los parámetros de captura, fueron estudiados y optimizados, resultando las siguientes condiciones: 0,3 segundos de tiempo de exposición, en modo manual. La cámara CCD fue utilizada con un sensor en blanco y negro. De dos tercios de pulgada con 1392x1024 píxeles y 12 bits de resolución, equivalente a 4096 valores distintos de escala de grises, por lo tanto una intensificación de la imagen no ha sido requerida. Se eligió una cámara monocromática en lugar de una cámara en color para alcanzar la resolución espacial más alta posible, debido al uso simultáneo de los fotodiodos del sensor CCD para la adquisición de la imagen sin mosaicos de color y la extrapolación de la información del color.

**Filtros y objetivos:** Se colocó un objetivo delante de la cámara CCD, de manera que la luz transmitida pasa a través de un CCTV (*close circuit television*) objetivo con función macro y montura convencional C, con una longitud focal de  $f=8-16$  (la apertura fue ajustada para aumentar la profundidad del enfoque), y una apertura de objetivo de  $F=1,6$ -cerrado. A continuación el haz de luz pasa a través del filtro de paso de banda centrado a 481,66 nm. Es deseable una alta discriminación en la longitud de onda de interés, para evitar radiaciones no deseables, pero los filtros de paso de banda reducen la sensibilidad en la selección debido a la baja transmisión del filtro. Como una restricción, con el filtro de paso de banda, la señal viene a ser atenuada y la sensibilidad global decrece porque una menor cantidad de luz es recogida por el detector. La cantidad de luz transmitida que deja pasar el filtro fue medida en un 60% del total de la luz medida sin filtro. Así, finalmente la luz alcanza el detector CCD. En resumen, la luz transmitida es

recogida por el detector CCD en combinación de un objetivo y un filtro de paso de banda centrado a 481,66 nm.

**Procesamiento de la imagen:** Una vez la imagen es capturada, la señal de salida de la CCD, debe de estar conectada a un ordenador para su evaluación. Esto es, las cargas de los correspondientes grupos de píxeles, son transferidos dentro del registrador interlineal del sensor CCD, donde las cargas son acumuladas. Después de la exposición, la integración de las cargas es convertida con una resolución de 12 Bits, dentro de señales digitales y transferidas al ordenador mediante una tarjeta PCI.

**Evaluación de los datos:** Los diferentes valores generados en la escala de grises, provenientes de la imagen son grabados en formato de archivo TIFF, con la intención de no comprimir la imagen con la consiguiente pérdida de información. Para procesar todos los valores numéricos de interés, se utilizaron los siguientes programas: Adobe Photoshop y Paint Shop Pro.

**Región de interés (ROI):** Una vez la imagen digital es almacenada, seleccionamos el ROI de la zona sensora del sensor desechable dentro de la imagen capturada usando el programa Adobe Photoshop. El ROI se define como un círculo de color homogéneo de diámetro fijo, consiguiendo el promedio de los píxeles de dicha región. Para analizar la distribución de los valores de la escala de grises entro del ROI<sup>10</sup>, se dividió tanto el diámetro vertical como el horizontal en cuadrados de 5x5 píxeles y para seleccionar el ROI se emplearon círculos de diámetro creciente 6x6, 12x12, etc. hasta un total de 190x190 píxeles. Se realizó representando los valores de luminosidad de la escala de grises en función del radio de la zona sensora como se realizó en el capítulo anterior de esta Memoria. Así resultó una ROI circular de 140x140 píxeles de 190x190 píxeles en total, lo que supone un promedio de 15380 píxeles.

#### 4. Resultados y discusión

Para optimizar la metodología analítica hemos estudiado algunos factores que influyen en el sistema de medida. Esos factores son el tiempo de exposición, la transmisión de la luz, el color del fondo y el tipo de fuente de luz. Estos estudios se han realizado usando sensores desechables equilibrados a dos niveles de concentración para los tres analitos,  $1 \cdot 10^{-2}$  y  $1 \cdot 10^{-4}$ M, usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez con tres zonas sensoras.

Lo primero de todo, es comentar que se estableció como óptimo pH 9 para realizar esta determinación simultánea debido a que es a éste pH al cual se determina dureza, debido a que los coeficientes de selectividad que presenta para el Ca(II) y para el Mg(II) son similares a este pH. Para la determinación de potasio, el óptimo es también pH 9, pero para magnesio, el pH de trabajo es de 8,5. Cambiando el pH de 8,5 a 9, produce un cambio en los coeficientes de selectividad del sensor para magnesio, así  $\log K_{Mg,Ca}$ ,  $\log K_{Mg,Na}$  y  $\log K_{Mg,K}$  al pH óptimo de 8,5 son -1,104 -1,283 y -1,512 y cambiando a pH 9, los valores son -0,904, -0,725 y -0,957 respectivamente, por lo tanto, aún mantiene buena selectividad ante cationes de usual presencia en aguas.

**Tiempo de exposición:** La cámara CCD fue estudiada a 7 diferentes tiempos de exposición 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5s (el sensor CCD puede ser puede trabajar hasta un límite de 10  $\mu$ s), siendo colocadas las membranas desechables sobre la lámina de poliestireno blanco, para realzar el contraste. Así, para optimizar este parámetro, hemos trabajado para las siete posibilidades en estudio, con un valor de intensidad del píxel de 3000, sobre la lámina blanca (estando el rango comprendido entre 1, negro absoluto y 4096, blanco puro con saturación de luz), variando el obturador del objetivo<sup>11</sup>. Para el sensor de potasio, el valor del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$ , permanece constante para todos los tiempos de exposición, al igual que su precisión expresada en términos de DER, presentando valores entre un 2-5%. Aunque en términos de precisión todos los tiempos de

exposición, para dureza y magnesio, son bastante similares variando entre 2,5 y un 7%, los mejores resultados fueron obtenidos para un tiempo de 0,3 segundos, porque a dicho tiempo nos encontramos con la mejor correlación con el modelo experimental obtenido utilizando un espectrofotómetro de diodos en fila.

**Transmisión de luz:** Una vez seleccionado 0.3 s, las intensidades deben de ser ajustadas al rango dinámico del detector CCD. Así, hemos cambiado los niveles de la intensidad de la luz, proveniente de la fuente de iluminación reflejado sobre la lámina de poliestireno blanco y que alcanza el detector CCD, variando el obturador de forma manual. Los valores probados fueron 3800, 3000, 2000 y 1000. Ninguno de los valores altos que se han estudiado, han quemado la imagen, es decir, han saturado la carga del detector. Para potasio, A bajas intensidades, (1000-2000), al señal para  $1 \cdot 10^{-2}$  M, casi es inapreciable, por lo tanto el rango de aplicación de vería reducido. Y para magnesio, al igual que para dureza, se obtuvo la mejor relación con el modelo teórico a un valor de 3000.

**Color del fondo:** El color del campo de la imagen donde situamos las membranas desechables, ha sido estudiado. 5 diferentes láminas de papel de distintos colores fueron ensayadas, gris, rojo, azul, verde, y blanco. Nos encontramos que para dureza sería posible utilizar las láminas roja y blanca, al igual que para magnesio, mientras que para el potasio, podrían servir los colores rojo verde y blanco. Pero usando un fondo diferente al color blanco, las DER del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$ , incrementan con respecto al color blanco, según el caso, siendo de hasta un 20% en el caso del color rojo. De manera que el color del fondo empleado para situar las membranas desechables fue el color blanco. En la Figura 8.2 mostramos los espectros de reflectancia de los fondos empleados.

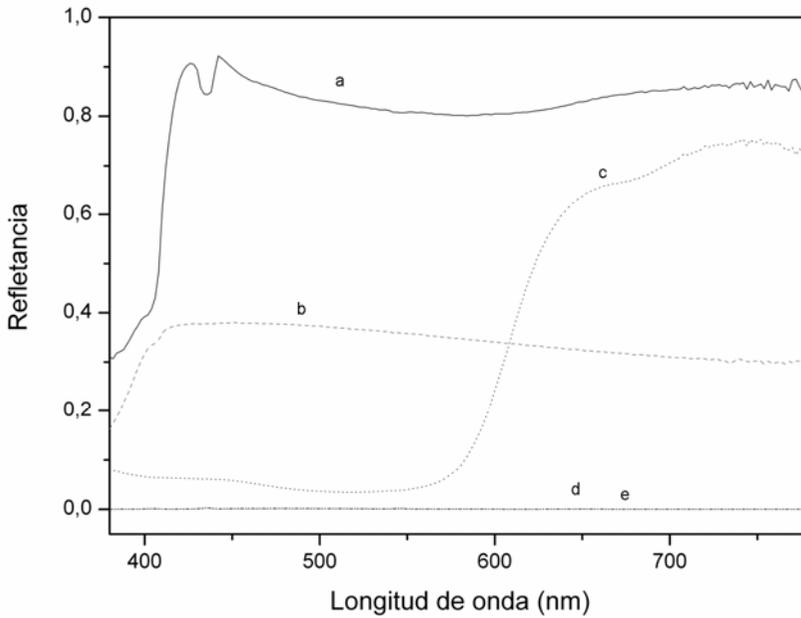


Figura 8.2. Espectros de reflectancia de los fondos empleados. a) Fondo blanco, b) fondo gris, c) fondo rojo, d) fondo azul, e) fondo verde.

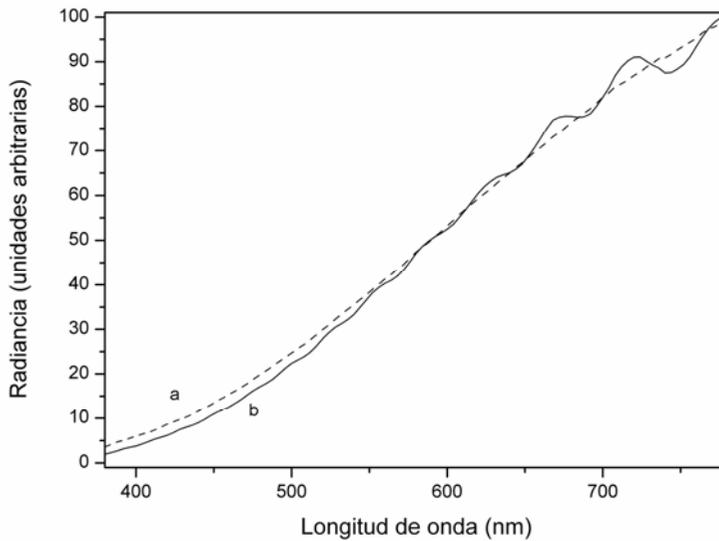


Figura 8.3. Espectros de radiancia de las fuentes de luz utilizadas. a) fluorescente, b) halógena.

**Fuente de luz:** Hemos comparado los resultados obtenidos haciendo uso de una lámpara halógena con una lámpara fluorescente. Esta última lámpara fue encendida 10 minutos antes de empezar a medir hasta que alcanzó un valor estable de 1600Lux. La lámpara fluorescente podría ser utilizada para la determinación de potasio y dureza, pero no para magnesio debido a que no hay correspondencia entre los valores experimentales y el modelo teórico, incrementando de manera notable la pendiente experimental en el modelo lineal. En la figura 8.3 se muestran las radiancias de ambas lámparas.

La luz es un parámetro crítico en la medida de la luz reflejada usando una cámara CCD. Es posible que la fuente de luz genere un campo de iluminación no uniforme sobre el área de detección debido a variaciones en la irradiancia con el tiempo, debido a la inestabilidad de la lámpara, siendo necesaria una corrección<sup>12;13</sup>. Esto se puede hacer controlando la calidad de los componentes ópticos empleados o sustituyendo un difusor de luz enfrente de la fuente de luz o utilizó programas informáticos, esto es, haciendo una *corrección del blanco*: Se realiza una captura del fondo, en el cual no hay situados aún ninguna membrana desechable, siendo la imagen capturada de igual tamaño que el resto y utilizada dicha imagen como referencia para el resto de imágenes capturadas cuando se realice el proceso de sustracción.. Otro importante factor es el ruido producido por la corriente oscura de la cámara<sup>14-16</sup>. Así se ha de realizar una *corrección oscura*: La corriente oscura es generada por la energía térmica interna que se genera en el detector CCD, e implica un flujo de electrones independiente cuyo ninguna luz alcanza al detector CCD. Así, la captura de la imagen se realiza simplemente con el obturador cerrado, de manera el el ruido de fondo generado por la corriente oscura<sup>17;18</sup>, puede ser evaluado.

De manera que hemos estudiado cómo afecta a la señal, la sustracción<sup>19</sup> en cada membrana desechable medida, de la imagen que se ha capturado representando campo de iluminación no uniforme sobre el área de detección y la corriente oscura, así las diferencias de señales fueron calculadas para cada ROI.

Idénticos tiempos de exposición fueron calculados para cada imagen. Pero realizando estas dos sustracciones<sup>20</sup>, haciendo uso de un editor gráfico, hemos encontrado resultados aleatorios para los distintos niveles de concentración y para los tres analitos. Pero, en términos de DER del parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  para los tres sensores, hemos observado un mayor incremento en torno a un 7% más, haciendo las dos sustracciones, campo de iluminación no uniforme y corriente oscura, que haciendo sólo la corrección del blanco. Y por ejemplo el valor de  $1-\alpha_{ef}$  para  $1 \cdot 10^{-4}$  M (para Mg(II)), aumenta, de manera que empeora el límite de detección. Nosotros recomendamos realizar este estudio siempre, debido a que es posible mejorar las señales aunque en nuestro caso hemos demostrado que no ha sido efectivo.

#### **4.1. Parámetro analítico**

Habitualmente, el parámetro analítico para medidas de absorbancias, es el mostrado en el Capítulo 4 sección 3.1, ecuación 4.4. El parámetro analítico utilizado en esta Memoria para imágenes digitales ya se ha explicado en el Capítulo 7 sección 3 ecuación 7.2.

#### **4.2. Caracterización analítica**

##### **4.2.1. Modelo Sigmoidal**

Lo primero de todo es comentar que utilizando la cámara CCD, encontramos el mismo fenómeno para el potasio, en lo referente a la estequiometría ya comentada en el capítulo anterior. De manera que hemos trabajado con una estequiometría aparente de 0,5. Para el caso de dureza y magnesio no se observa dicho comportamiento.

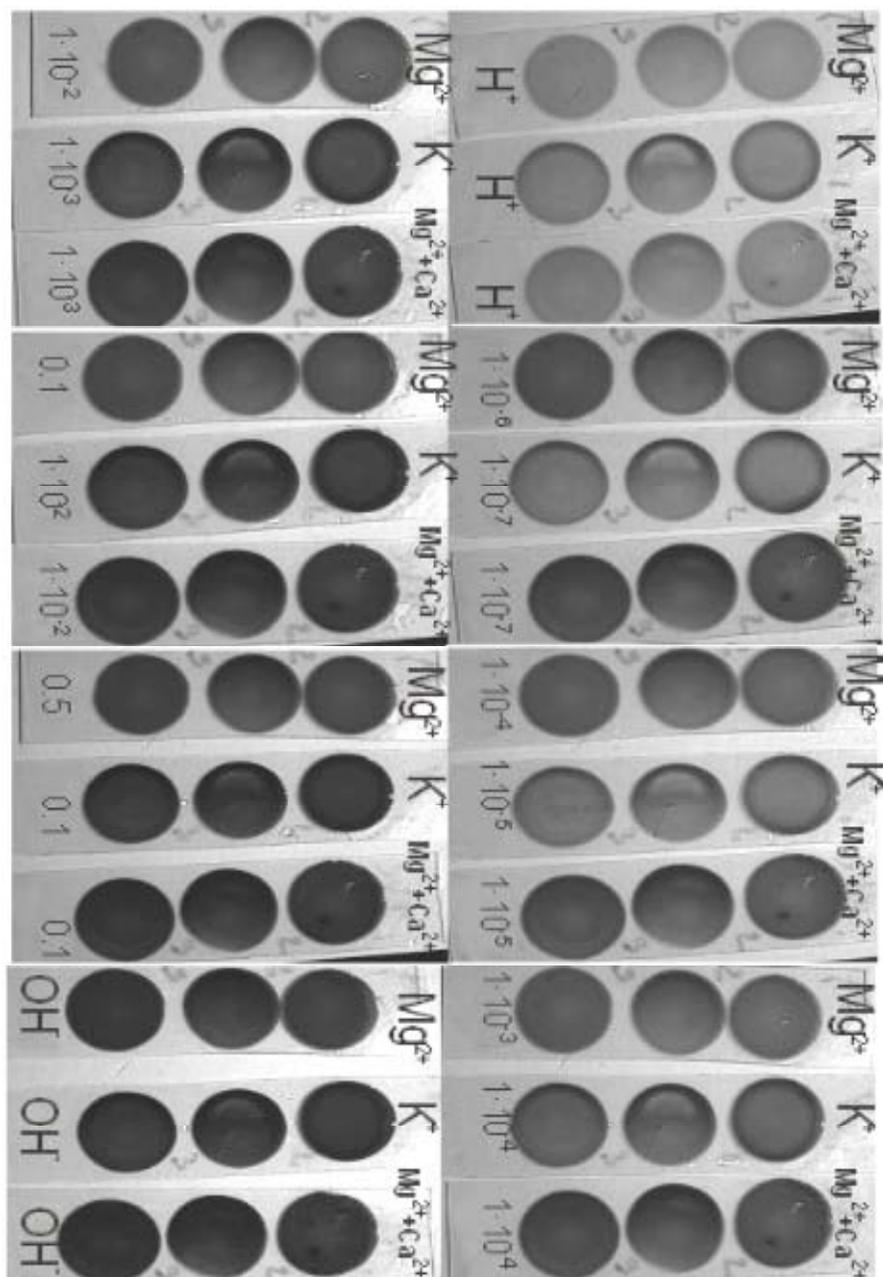


Figura 8.4. Ejemplos de puntos de calibración para las tres membranas. Las concentraciones están en M. La secuencia de las capturas de las imágenes va desde la forma ácida  $H^+$  hasta la forma básica  $OH^-$ :

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ), y la actividad de K(I), Mg(II) y dureza, se prepararon 14 disoluciones patrón conteniendo entre  $4,4 \cdot 10^{-8}$  y  $7,6 \cdot 10^{-2}$  M en actividades,  $5 \cdot 10^{-8}$  y 0.1 M en concentración para potasio,  $3,9 \cdot 10^{-7}$  y 0,52 M en actividades,  $5 \cdot 10^{-7}$  y 1 M en concentración para magnesio y entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $7,4 \cdot 10^{-2}$  M en actividades,  $1 \cdot 10^{-7}$  y 0,1 M en concentración para dureza, trabajando en todos los casos a pH 9,0.

Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$  (véase Capítulo 4, ecuación 4.4). La Figura 8.4 muestra una secuencia de las capturas de las imágenes de las tres membranas desechables de pues del equilibrado con la disolución patrón.

Las Figuras 8.5, 8.6 y 8.7 muestran los valores experimentales obtenidos junto con la ecuación sigmoideal teórica para los tres analitos.

Para definir el rango de medida, se prepararon dos series de disoluciones patrón. Una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal y otra en la zona de mínima pendiente a bajas actividades (para potasio: 5 patrones en la zona de máxima pendiente, 6 en la de mínima pendiente, 4 y 10 respectivamente para los dos casos restantes, magnesio y dureza). Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental para el magnesio y en el Capítulo 5 de esta Memoria para dureza y potasio. Así, para **potasio**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  y  $4,3 \cdot 10^{-3}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $5 \cdot 10^{-3}$  M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $,4 \cdot 10^{-8}$  y  $4,37 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $10^{-8}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M en concentración). Para **magnesio**, la zona de máxima pendiente está entre  $3,9 \cdot 10^{-5}$  y 0,52 M en actividades ( $5 \cdot 10^{-5}$  y 1 M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $3,9 \cdot 10^{-7}$  y  $7,8 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $5 \cdot 10^{-7}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M en concentración). Y finalmente para **dureza**, la zona de máxima pendiente está

entre  $8,8 \cdot 10^{-6}$  y  $7,4 \cdot 10^{-2}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y 0,1 en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $4,4 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $1 \cdot 10^{-7}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M en concentraciones) La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste<sup>21</sup>.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, las siguientes:

**A.- Potasio:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,6912 - 0,3057 \log a_{K^+} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 8.5})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,6221 - 0,0505 \log a_{K^+}, \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 8.6})$$

**B.- Magnesio:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,0242 - 0,2222 \log a_{Mg^{2+}} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 8.7})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,0929 - 0,0104 \log a_{Mg^{2+}} \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 8.8})$$

**C.- Dureza:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,0326 - 0,1918 \log a_{M^{2+}} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 8.9})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,7797 - 0,0289 \log a_{M^{2+}} \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 8.10})$$

De la intercepción de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD, mostrado en la Tabla 8.1. El límite superior del rango de medida usado, se corresponde con la última concentración que cae dentro del rango lineal de cada analito.

Tabla 8.1, Parámetros analíticos de la membrana desechable de potasio, dureza y magnesio utilizó una cámara CCD. Modelo sigmoidal.

Parámetro	Modelo sigmoidal					
	Potasio		Magnesio		Dureza	
Ordenada	-0,6912		0,02424		-0,0326	
Desviación estándar de la ordenada	0,0334		0,0113		0,0115	
Pendiente	-0,3057		-0,2222		-0,1918	
Desviación estándar de la pendiente	0,0087		0,0042		0,0035	
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0,9591		0,9714		0,9730	
Linealidad on-line(%)	97,2		98,1		98,2	
DER(%) log a	5·10 <sup>-5</sup> M	2,49	5·10 <sup>-4</sup> M	5,35	5 mg/l	3,88
	1·10 <sup>-4</sup> M	3,75	5·10 <sup>-3</sup> M	6,23	100 mg/l	7,71
	1·10 <sup>-3</sup> M	2,27	0,1 M	6,81	10000 mg/l	4,49
Límite de detección (mM)	8,17·10 <sup>-3</sup>		6,89·10 <sup>-2</sup>		1,17	
Rango lineal (mM)	8,17·10 <sup>-3</sup> -10		6,89·10 <sup>-2</sup> -1000		1,17-20000	

Las unidades de concentración están en mM para potasio y magnesio y mg·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para dureza.

La precisión para las diferentes membranas desechables (expresada como la desviación estándar relativa) se realizó con un estudio a 3 niveles de concentración para cada sensor que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 10 veces. Obteniendo DER expresadas como logaritmo de la actividad del potasio. (Tabla 8.1). En dicha Tabla 8.1 aparecen además los valores obtenidos de los diferentes parámetros analíticos.

#### 4.2.2. Modelo lineal

Para verificar la relación sigmoidal entre el parámetro analítico  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right)$ , para magnesio y dureza y  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right) + D(\alpha_{ef})$  para potasio, se prepararon las mismas 14 disoluciones patrón que las utilizadas en el modelo sigmoidal. Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado antes en la Sección Experimental para el magnesio y en el capítulo cinco de esta

Memoria para dureza y potasio. los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados. Las Figuras 8.5, 8.6 y 8.7 muestran tanto los modelos sigmoidales como los lineales.

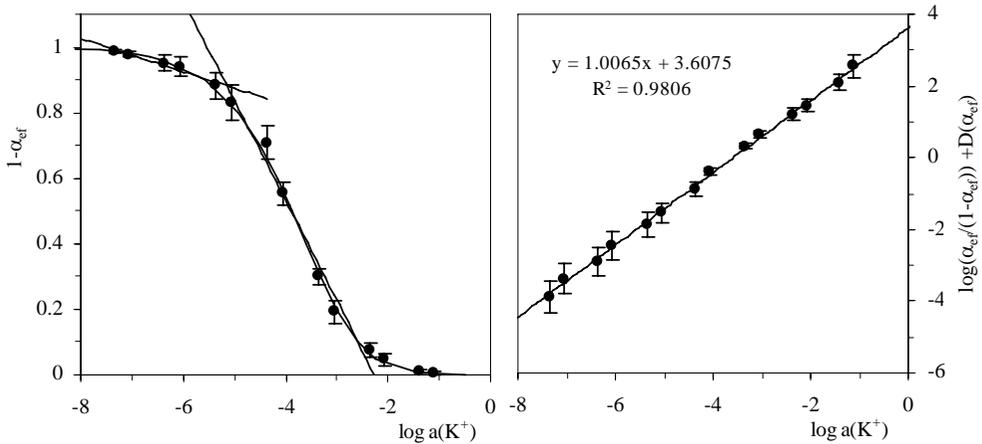


Figura 8.5. Curva de calibración para *potasio*: Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal.

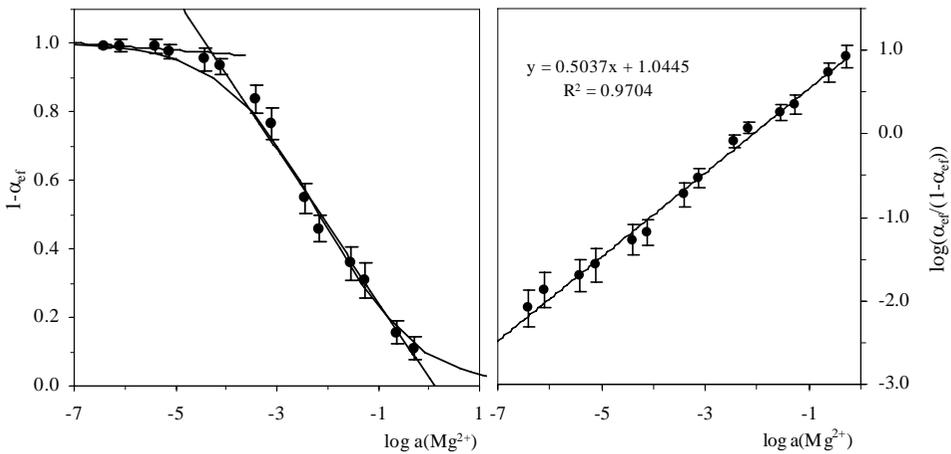


Figura 8.6. Curva de calibración para *magnesio*: Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal.

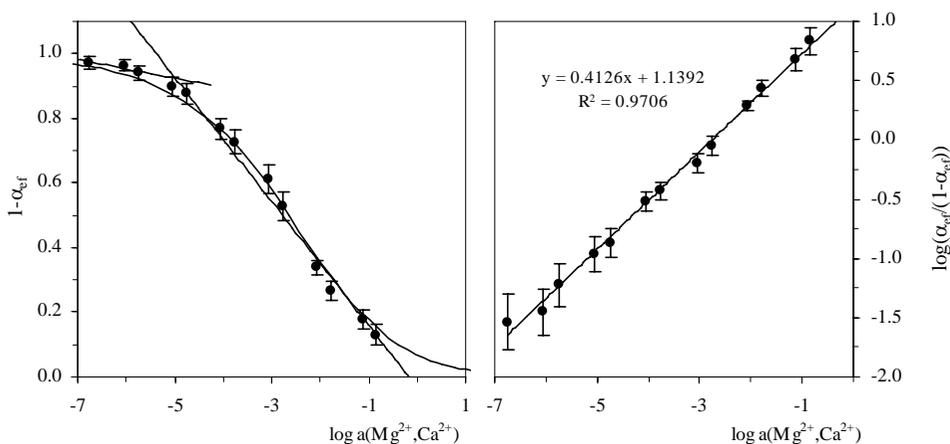


Figura 8.7. Curva de calibración para dureza: Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

Tabla8.2, Parámetros analíticos de la membrana desechable de potasio, magnesio y dureza utilizó un escáner en modo transmisión. Modelo lineal.

Parámetro	Modelo lineal					
	Potasio		Magnesio		Dureza	
Ordenada	3,6075		1,0445		1,1392	
Desviación estándar de la ordenada	0,0594		0,0306		0,02854	
Pendiente	1,0065		0,5037		0,4126	
Desviación estándar de la pendiente	0,0129		0,0084		0,0069	
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0,9806		0,9704		0,9707	
Linealidad on-line(%)	98,7		98,3		98,3	
DER(%) log a	5·10 <sup>-5</sup> M	3,63	5·10 <sup>-4</sup> M	6,83	5 mg/l	5,88
	1·10 <sup>-4</sup> M	3,83	5·10 <sup>-3</sup> M	5,01	100 mg/l	5,74
	1·10 <sup>-3</sup> M	2,35	0,1 M	5,20	10000 mg/l	5,41
Límite de detección (mM)	9,92·10 <sup>-5</sup>		1,86·10 <sup>-3</sup>		0,013	
Rango lineal (mM)	9,92·10 <sup>-5</sup> -100		1,86·10 <sup>-3</sup> -1000		0,013-20000	

Las unidades de concentración están en mM para potasio y magnesio y mg·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para dureza.

La precisión para las diferentes membranas desechables (expresada como la desviación estándar relativa) se realizó con un estudio a 3 niveles de concentración para cada sensor que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 9 veces. Obteniendo DER expresadas como logaritmo de la actividad del potasio (Tabla 8.2). Los niveles de concentración fueron los mismos que los empleados en el modelo sigmoidal. El límite de detección se calculó de acuerdo con la ecuación 5.17 del Capítulo 5 de esta Memoria.

### **4.3. Validación y aplicaciones**

El presente procedimiento fue aplicado para la determinación de potasio, magnesio y dureza en muestras reales para establecer su utilidad. Para hacer esto, se seleccionaron muestras de aguas de diferente procedencia (grifo, pozo, río, nieve, mar) cuya concentración de dureza y potasio y magnesio está en las nuevas zonas del rango dinámico lineal obtenido en el método de linealización propuesto. En las Tablas 8.3, 8.4 y 8.5 se muestran los resultados obtenidos empleando el procedimiento descrito utilizo una cámara CCD, para los tres sensores, comparados con un método de espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia. Las tres tablas incluye también los valores medios para tres determinaciones de cada muestra y la desviación estyar de estas medidas y el nivel de probabilidad ( $P_{val}$ ) del test de comparación de medias empleado. Como se observa no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando los sensores y el método de referencia. Se realizaron tres réplicas distintas para cada muestra analizada.

Tabla 8.3 Determinación de *potasio* en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando una cámara CCD como sistema detector. Se empleó espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	K(mM)	s	K(mM)	s	
Agua mineral (San Vicente)	0,0098	0,0024	0,012	0,00040	26,1
Agua mineral (Mondariz)	0,15	0,055	0,15	0,0011	5,3
Agua mineral (Lanjarón)	0,018	0,0050	0,019	0,00029	90,3
Agua mineral (Fuente Liviana)	0,011	0,00087	0,010	0,00037	43,0
Agua de grifo (Almuñecar, Granada)	0,14	0,034	0,12	0,00019	7,4
Agua de grifo (Ogijares, Granada)	0,046	0,018	0,036	0,00033	10,3
Agua de grifo (Granada)	0,017	0,0020	0,018	0,00029	19,8
Agua de grifo (Viznar, Granada)	0,0098	0,0028	0,0090	0,00027	73,6
Agua de río (Chauchina, Granada)	0,17	0,051	0,15	0,0041	56,8
Agua de río (Lachar, Granada)	0,20	0,051	0,25	0,0041	13,5
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,012	0,0042	0,011	0,00018	71,2
Lluvia (Granada)	$1,9 \cdot 10^{-3}$	$6,2 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-5}$	32,4
Agua de pozo (Otura, Granada)	0,17	0,051	0,20	0,035	45,1
Agua de mar (Almería)	13	3,0	12	0,074	36,6
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	11	1,7	11	0,13	6,2
Agua de aljibe (Granada)	0,015	0,0030	0,014	0,00040	62,8
Sidra	26	5,6	27	0,13	60,0
Zumo de frutas	50	6,7	51	0,11	82,3
Zumo de tomate	92	4,9	95	0,41	34,4
Cerveza	10	3,2	10	0,099	26,8
Vino tinto	31	3,5	33	0,099	25,9

Tabla 8.4 Determinación de *magnesio* en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando una cámara CCD como sistema detector. Se empleó espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	Mg (mM)	s	Mg (mM)	s	
Agua mineral (San Vicente)	0,35	0,058	0,28	0,0037	21,9
Agua mineral (Lanjarón)	0,24	0,050	0,30	0,0018	10,9
Agua mineral (Bezoya)	0,032	0,013	0,027	0,00019	38,8
Agua de grifo (Granada)	0,51	0,084	0,53	0,0071	70,5
Agua de grifo (Ogijares, Granada)	0,96	0,13	0,98	0,014	46,7
Agua de pozo (Otura, Granada)	2,1	0,14	2,0	0,040	17,8
Agua de pozo (Valderrubio, Granada)	1,4	0,18	1,5	0,077	73,4
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$6,7 \cdot 10^{-4}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	$6,3 \cdot 10^{-5}$	20,8
Lluvia (Granada)	$5,4 \cdot 10^{-3}$	$7,7 \cdot 10^{-3}$	$5,6 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	55,7
Cerveza	2,9	0,44	2,6	0,026	25,6
Sidra	1,4	0,83	1,2	0,017	34,2
Zumo de melocotón y albaricoque	2,4	0,29	2,5	0,025	60,6

Tabla 8.5 Determinación de *dureza* en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando una cámara CCD como sistema detector. Se empleó espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	CaCO <sub>3</sub> mg·L <sup>-1</sup>	s	CaCO <sub>3</sub> mg·L <sup>-1</sup>	s	
Agua mineral (San Vicente)	70,8	6,73	74,2	0,513	43,2
Agua mineral (Mondariz)	32,1	3,30	37,0	0,479	6,1
Agua mineral (Lanjarón)	80,1	10,8	88,3	0,251	26,4
Agua mineral (Fuente Liviana)	194	44,9	178	1,06	37,4
Agua mineral (Solán de Cabras)	236	6,71	236	1,44	11,4
Agua mineral (Bezoya)	11,5	2,33	13,3	0,0451	24,7
Agua mineral (Vichy Catalán)	77,5	15,7	75,7	0,676	85,3
Agua de grifo (Ogijares, Granada)	271	17,8	274	3,73	74,7
Agua de grifo (Granada)	155	6,03	159	1,87	36,9
Agua de grifo (Monachil, Granada)	255	49,2	227	8,41	38,4
Agua de río (Chauchina, Granada)	1079	337,1	739,4	14,82	15,6
Agua de pozo (Colomera, Granada)	204	64,6	186	0,872	20,2
Agua de pozo (Valderrubio, Granada)	475	115,0	383	9,74	23,8
Agua de pozo (Otura, Granada)	422	17,1	421	10,7	88,9
Agua de mar (Almería)	10250	3963,2	8659,0	143,3	52,5
Agua de mar (Almuñecar, Granada)	8909	883,6	8379	77,32	39,1
Agua de aljibe (Granada)	455	76,4	418	6,80	45,0
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,83	0,13	0,80	0,061	82,8
Lluvia (Granada)	2,3	0,22	2,3	0,015	69,3

Dado el amplio intervalo de concentraciones estudiado en la validación, se ha empleado el error relativo cuadrático medio (RMSRE) (ver ecuación 7.23 en el Capítulo 7 de esta Memoria) como característica para evaluar la capacidad de predicción de la calibración propuesta en relación con las concentraciones de referencia. Los valores que se obtuvieron para el conjunto de datos de las tres validaciones son para potasio 0,13, para magnesio 0,14 y para dureza 0,15.

## 5. Conclusiones

Se ha estudiado una nueva forma de medir sensores desechables basados en la química ionóforo-cromoionóforo, usando una cámara CCD de 12 bits como sistema detector. Hemos medido el cambio de color que se produce en la zona sensora del sensor desechable debido a la presencia de analito usando una cámara

CCD en blanco y negro en lugar del tradicional espectrofotómetro de diodos en fila. Así, tres analitos, magnesio potasio y dureza, han sido determinados simultáneamente. El uso de una cámara CCD sin sistema de refrigeración incorporado, implica una cámara CCD más barata. Con este dispositivo de medida y procedimiento es posible reducir el tiempo de análisis pudiendo medirse de manera simultánea múltiples detectores.

Finalmente, el uso de una cámara CCD fue efectiva para la detección y cuantificación de potasio magnesio y dureza en una amplia variedad de aguas y bebidas, con el uso de una fuente de luz convencional y sin necesidad de materiales ópticos adicionales. Por ello, podría ser una opción de interés para medir sensores desechables mediante una cámara CCD de forma rápida especialmente para el caso de sensores multinálito que están en fase de desarrollo por nuestro grupo de investigación.

## 6. Bibliografía

1. Giles, J. H.; Ridder, T. D.; Williams, R. H.; Jones, D. A.; Denton, M. B. *Anal.Chem.* **1998**, *70*, 663A-8A.
2. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Santoyo-Gonzalez, F. *Anal.Chim.Acta* **2003**, *481*, 139-48.
3. Suzuki, K.; Watanabe, K.; Matsumoto, Y.; Kobayashi, M.; Sato, S.; Siswanta, D.; Hisamoto, H. *Anal.Chem.* **1995**, *67*, 324-34.
4. Capitán-Vallvey, L. F.; Ramos, M. D. F.; Alvarez de Cienfuegos, P.; Gomez, J. *Talanta* **2005**, *65*, 239-45.
5. Morf, W. E.; Seiler, K.; Rusterholz, B.; Simon, W. *Anal.Chem.* **1990**, *62*, 738-42.
6. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *266*, 73-87.
7. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* **1982**, *136*, 363-68.

8. Gaiao, E. d. N.; Martins, V. L.; Lyra, W. d. S.; Farias de Almeida, L.; Cirino da Silva, E.; Araujo, M. C. U. *Anal.Chim.Acta* **2006**, *570*, 283-90.
9. Angenendt, P.; Gloekler, J.; Konthur, Z.; Lehrach, H.; Cahill, D. J. *Anal.Chem.* **2003**, *75*, 4368-72.
10. Yam, K. L.; Papadakis, S. E. *J.Food Eng.* **2004**, *61*, 137-42.
11. Healey, G.; Kondepudy, R. *Pattern Analysis and Machine Intelligence, IEEE Transactions on* **1994**, *16*, 267-76.
12. Bergstroem, E. T.; Goodall, D. M.; Pokric, B.; Allinson, N. M. *Anal.Chem.* **1999**, *71*, 4376-84.
13. Surugiu, I.; Svitel, J.; Ye, L.; Haupt, K.; Danielsson, B. *Anal.Chem.* **2001**, *73*, 4388-92.
14. Boecker, D.; Zybin, A.; Horvatic, V.; Grunwald, C.; Niemax, K. *Anal.Chem.* **2007**, *79*, 702-09.
15. Weller, M. G.; Schuetz, A. J.; Winklmair, M.; Niessner, R. *Anal.Chim.Acta* **1999**, *393*, 29-41.
16. Lancaster, M.; Goodall, D. M.; Bergstroem, E. T.; McCrossen, S.; Myers, P. *Anal.Chem.* **2006**, *78*, 905-11.
17. Holst, G.; Kohls, O.; Klimant, I.; Konig, B.; Kuhl, M.; Richter, T. *Sens.Actuators B* **1998**, *51*, 163-70.
18. Liebsch, G.; Klimant, I.; Frank, B.; Holst, G.; Wolfbeis, O. S. *Appl.Spec.* **2000**, *54*, 548-59.
19. Scrivener, E.; Boghigian, B. A.; Golenko, E.; Bogdanova, A.; Jackson, P.; Mikulskis, A.; Denoyer, E.; Courtney, P.; Lopez, M. F.; Patton, W. F. *Proteomics* **2005**, *5*, 4354-66.
20. McLean, J. A.; Minnich, M. G.; Montaser, A.; Su, J.; Lai, W. *Anal.Chem.* **2000**, *72*, 4796-804.
21. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.

## **CAPÍTULO 9**

# **EMPLEO DE UNA CÁMARA DE FOTOGRAFÍA DIGITAL DE COLOR PARA MEDIR MEMBRANAS DESECHABLES**



## EMPLEO DE UNA CÁMARA DE FOTOGRAFÍA DIGITAL DE COLOR PARA MEDIR MEMBRANAS DESECHABLES

### Resumen

En este último Capítulo de la Memoria de Doctorado se aborda un nuevo procedimiento para la medida de membranas desechables donde se utiliza como sistema detector una cámara de fotografía digital convencional. Describimos cómo la captura de imagen mediante una cámara de color digital convencional, puede determinar y cuantificar simultáneamente, potasio, magnesio y dureza con sensores desechables que se basan en una química ionóforo-cromoionóforo. La principal ventaja del empleo de la captura de imagen es que permite monitorizar simultáneamente gran cantidad de sensores, siendo también importante la versatilidad y la flexibilidad de este método y el uso de una instrumentación no excesivamente cara o de dispositivos específicos. Se han determinado mediante membranas desechables potasio, magnesio y dureza en aguas y en distinto tipo de bebidas. También ha dado buenos resultados para determinar el pH de disoluciones utilizando tiras de pH comerciales. Para realizar éste estudio, se utilizó como fuente de iluminación una lámpara halógena, similar a la utilizada en el capítulo anterior e incluso se ha conseguido hacer análisis cuantitativos utilizando el propio sistema de iluminación que lleva incorporado la cámara, esto es el flash. De manera que usando una cámara fotográfica digital a color, tenemos intrínsecamente una instrumentación portátil para realizar los análisis *in situ*, siempre y cuando se hagan dentro de un compartimiento en ausencia de luz ambiental y que éste sea portátil. La cámara utilizada fue una SONY Cybershot DSC-T9 de 6,0 megapíxeles. Así se da un paso más en la puesta a punto de procedimientos que usan instrumentación portátil fácil de manejar y sin necesidad de personal especializado.

## 1. Introducción

El principal esfuerzo de este trabajo es el desarrollo y puesta a punto de un método basado en una cámara de fotografía digital de color convencional para la medida de sensores desechables que responden a  $K(I)$ ,  $Mg(II)$  y a dureza de forma simultánea. Además se demuestra su aplicabilidad para la determinación de pH haciendo uso de papel de pH comercial. El uso de cámaras con respecto a escáneres para la captura de imágenes lleva consigo una serie de ventajas como es menor tiempo en lectura, además muchos escáneres operan con fuentes de luz con un ángulo de incidencia fijo, de manera que si se quiere modificar dicho ángulo, habría que modificar todo el instrumento, hecho que no ocurre con una cámara donde el uso de un sistema con iluminación externa le otorga más posibilidades de configuración. Ya en 1996 se publicó un estudio general para caracterizar escáneres y cámaras<sup>1</sup> existiendo diversos estudios dedicados a su uso en Química Analítica<sup>2</sup> como ya hemos puesto de manifiesto en la Introducción. Aquí tratamos de verificar la posibilidad de uso de una cámara fotográfica digital como instrumento analítico para sensores desechables basados en química ionoforo-cromoionoforo que como hemos visto a lo largo de esta Memoria exigen usar un parámetro analítico algo más complejo que una simple absorbancia.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentación y software

Para llevar a cabo las medidas, mediante la cámara fotográfica digital, hemos utilizado un porta muestras de diseño propio (Ver Capítulo anterior) hecho en poliestireno blanco (Evergreen, Woodinville, EE.UU.). Para obtener las imágenes digitales hemos usado una cámara de color digital Sony Cyber-shot DSC-T9 de 6,0 megapíxeles (Sony Corporation, New York, EE.UU.) provisto de una tarjeta de

memoria PRO Duo de 512 Mb. Un lector de tarjetas genérico OvisLink (OvisLink corp, Taiwan) fue utilizado para conectar la tarjeta de memoria al ordenador personal. El programa utilizado para obtener del color de la zona sensora de la membrana desechable se ha utilizado Adobe Photoshop CS ver 8.0.1 (Adobe System Inc., San José, California, EE.UU.) y Paint Shop Pro ver 7.04 (Jasc software, Ottawa, Canadá). La lámpara halógena comercial era de CEIEC (Shenzhen, China). Los papeles indicadores de pH de décimas fueron de Merck (Darmstadt, Alemania).

Para llevar a cabo las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Hewlett-Packard HP-8453 de diodos en fila (Nortwalk, CT, los EE.UU.) conectado a un ordenador personal Pentium MMX 200. Dicho espectrofotómetro está equipado con un soporte metálico de fabricación propia antes reseñado. La adquisición y la manipulación de los datos espectrales fueron realizados usando el programa Chemstation suministrado por HP para las medidas de absorbancia.

Los programas utilizados para el tratamiento de datos y el ajuste de datos experimentales y cálculos estadísticos fueron: Statgraphics Plus Versión 6.0, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corp., EE.UU., 1993 y GraphMatica para Win32 v1.60d, 1998 editado por K. Hertzler y adaptado por J. Garrido. Mathematica ver. 5.0, 1988-2003 (Wolfram Research) y Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, EE.UU.) para cálculos generales junto con OriginPro 7.5 (Northampton, MA, EE.UU.).

## **2.2. Reactivos y materiales**

Los reactivos químicos y materiales empleados para realizar las membranas de potasio, dureza y magnesio han sido descritos en el Capítulo 4 de esta Memoria en la sección 2.1, en el Capítulo 5 sección 3.1 y en el Capítulo 8 sección 2.2, respectivamente.

### **2.3. Preparación de la membrana sensora**

Las membranas se fabricaron sobre un soporte de poliéster empleando la técnica de recubrimiento giratorio<sup>3</sup>. Las mezclas para la preparación de las membranas sensibles a potasio, dureza y magnesio se describen en el Capítulo 4 sección 2.2, en el Capítulo 5 sección 3.2 y en el Capítulo 8 sección 2.3, respectivamente.

### **2.4. Condiciones de medida**

La respuesta del sensor desechable para potasio fue evaluada por adición de 9 mL de la disolución a ensayar en un tubo de plástico de polietileno junto con 1 mL de disolución tampón 0,2 M de Tris de pH 9,0. A continuación, se introduce el sensor desechable en el tubo durante 5 minutos sin agitación. Tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución y se introduce en un portamuestras de fabricación propia cubriéndolo con una lámina de color blanco para realzar el contraste. La información del color, en cada sensor desechable, fue descompuesta en los colores rojo, verde y azul provenientes del espacio de color RGB. Esta información fue obtenida de un área de la zona sensora del sensor desechable, denominada región del interés (ROI), para cada canal, como un valor medio, usando la opción histograma de Photoshop. Finalmente, estos valores de la imagen almacenada en formato de archivo jpeg fueron transferidos a una hoja de cálculo para el análisis de los datos. Las membranas fueron medidas utilizando dos fuentes de luz distintas y por separado, una fuente de luz halógena y la otra fue utilizando el flash de la propia cámara. Para comparar el procedimiento de la medida y evaluar el funcionamiento de la cámara fotográfica digital de color, las membranas desechables para potasio también fueron medidas usando un espectrofotómetro de diodos en fila.

Tras alcanzar el equilibrio, se saca la membrana de la disolución, se eliminan las gotas de disolución que la puedan mojar y se mide su absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro de diodos en línea Hewlett-Packard (modelo 8453; Nortwalk, CT) provisto de un soporte de cubeta de diseño propio. Los valores de absorbancia, correspondientes a la especie completamente protonada ( $A_{HC}$ ) y desprotonada ( $A_C$ ) del cromoióforo necesarios para calcular los valores de  $\alpha_{ef}$ , se midieron acondicionando los sensores desechables en tampón Tris  $2 \cdot 10^{-2}$  M y NaOH  $10^{-2}$  M. Las actividades se calcularon de acuerdo con el formalismo de Debye-Hückel<sup>4</sup>. Para corregir la absorbancia del fondo, las medidas se realizaron frente a una tira de poliéster tipo Mylar, además para las medidas con el espectrofotómetro de diodos en fila, la precisión mejora una media de un 2% cuyo el valor de la línea base, medido a 800 nm, es sustraído en todos los casos. Todas las medidas fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente y las membranas no fueron acondicionadas antes de su uso.

### **3. Teoría**

#### **3.1. Modelo general**

Los modelos teóricos sigmoidales y lineales utilizados para los sensores de potasio y dureza, han sido descritos ampliamente en el Capítulo 5 y los modelos sigmoidal y lineal para magnesio han sido descritos en el Capítulo 8 de esta Memoria. Se aplicaron dichos modelos utilizando los mismos parámetros analíticos utilizados con un espectrofotómetro de diodos en fila (véase el Capítulo 4, ecuación 4.4) e igualmente los parámetros analíticos utilizados en el escáner y en la cámara CCD (véase Capítulo 7, ecuación 7.2) han sido utilizados para el uso de la cámara fotográfica digital en ambos modelos para los tres analitos, según cada caso.

### 3.2. Sistema de análisis de imagen

Todas las medidas, empleando la cámara fotográfica digital, han sido realizadas dentro de una habitación termostataada, esto es mantenida a temperatura constante por precaución para mantener bajo y constante el ruido generado por la temperatura en el sensor CCD. Así la cámara se uso operado a una temperatura ambiental de 22 °C. Además se operó en ausencia de luz ambiental con el propósito de evitar interferencias y reflexiones de la luz exterior.

**Sistema de Iluminación:** las membranas desechables han sido iluminadas usando el flash interno de la cámara fotográfica digital y alternativamente utilizando una lámpara halógena con 150 W de potencia y 230 V como fuente de luz. La fuente de luz fue montada sobre una plataforma rotacional y traslacional con el objeto de dirigir el haz de luz con un ángulo conveniente sobre el área de detección, donde se disponen las membranas desechables. Dicha lámpara fue alineada de forma paralela a la cámara fotográfica digital, y situada a 30 cm de distancia de la zona de detección y a una altura de 25 cm de la misma y con un ángulo de 45° con respecto a la normal (el plano con las membranas desechables). El tiempo de estabilización para la lámpara fue establecido en 5 min, hasta alcanzar 1600 Lux medidos por un luxómetro digital.

**Adquisición de la imagen:** La luz transmitida es detectada por el sistema de imagen basado en una cámara fotográfica a color digital de 6,0 megapíxeles, situada sobre el plano físico del fondo (lámina blanca de poliestireno sobre un tablero óptico) a una altura de 9 cm. La cámara fotográfica digital se situó sobre una plataforma similar a la utilizada para la fuente de luz halógena, con un ángulo de 8 grados con la normal, del área de detección, para evitar medidas directas de reflexiones especulares provenientes de las muestras hacia el objetivo empleado. Así, hemos intentado usar una geometría 45/8. La zona de detección, es una zona rectangular de la lámina de poliestireno con unas dimensiones de 11x 8 cm y situada sobre el tablero óptico. Esta configuración permite la medida simultánea de un amplio número de membranas desechables. Estas membranas se disponen

sobre la lámina blanca para conseguir una iluminación uniforme y reducir los reflejos y las reflexiones especulares<sup>5</sup>. Para obtener la mayor resolución de la imagen, la cámara fotográfica digital se situó tan cerca como fue posible de las membranas desechables<sup>6</sup>, con el propósito de abarcar un ROI circular de 12 mm de diámetro dentro de un área de detección de 11x8 cm. Así, es posible colocar la cámara fotográfica digital a una distancia de 9 cm. Las condiciones de captura fueron estudiadas y optimizadas resultando una sensibilidad ISO 80 cuando se utiliza la lámpara halógena y una ISO 400 cuando se utiliza el flash.

**Filtros y objetivos:** El objetivo montado en la cámara fotográfica digital, tiene una longitud focal de 3,5. No se han utilizado ningún tipo de filtro adicional. Para obtener la máxima resolución de la imagen, la cámara fotográfica digital se situó lo más cerca posible de las membranas desechables usando la función macro, con el propósito de conseguir el mejor enfoque de la zona sensora de las membranas desechables (círculo de 12 mm de diámetro) dentro de la zona de detección (rectángulo de 11x8 cm).

**Procesamiento de la imagen:** Una vez la imagen es capturada y almacenada dentro de la tarjeta de memoria Pro Duo de 542 Mb de capacidad, todas las imágenes son llevadas a un ordenador personal para su evaluación mediante el lector convencional multitarjeta vía USB.

**Evaluación de los datos:** Las imagen digitales capturadas son grabadas en formato de archivo jpeg. Para procesar todos los valores numéricos de interés, se utilizaron los programas Adobe Photoshop y Paint Shop Pro.

**ROI (región de interés):** Una vez la imagen digital es almacenada, seleccionamos el ROI de la zona sensora del sensor desechable dentro de la imagen capturada usando el programa Adobe Photoshop. El ROI, se define como un círculo de color homogéneo de diámetro fijo, consiguiendo el promedio de los píxeles de dicha región. Para analizar la distribución de los valores de la escala de

grises dentro del ROI<sup>7</sup>, se dividió tanto el diámetro vertical como el horizontal en cuadrados de 10x10 píxeles y para seleccionar el ROI se emplearon círculos concéntricos de diámetro creciente (15x15, 30x30, etc.) hasta un total de 300x300 píxeles. Se representaron los valores de luminosidad del canal seleccionado en cada caso en función del radio de la zona sensora como se realizó en los Capítulos 7 y 8 de esta Memoria. Así resultó para todos un ROI circular de 240x240 píxeles de 300x300 píxeles en total, lo que implica un promedio de 45.244 píxeles.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Medida de Potasio, Dureza y Magnesio

Para optimizar la metodología analítica hemos estudiado dos factores que influyen en el sistema de medida. Esos factores son el tipo de fuente de luz y la sensibilidad del sensor CCD. Estos estudios se han realizado para dureza a 12 niveles de concentración distintos estando comprendidos entre  $8,8 \cdot 10^{-6}$  y 0,87 M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y 1,5 M en concentraciones), para potasio fueron 9 los niveles de concentración, entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  y 0,076 M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y 0,1 M en concentraciones) y para magnesio de prepararon 11 niveles de concentración entre  $3,89 \cdot 10^{-5}$  y 0,89 M en actividades ( $5 \cdot 10^{-5}$  y 1,5 M en concentraciones) con tres, en todos los casos, réplicas realizadas con sensores distintos para cada nivel de concentración. Se estableció como óptimo pH 9 como se indica en la sección 4 del Capítulo 8 de esta Memoria.

**Fuente de luz:** Hemos comparado los resultados obtenidos con una lámpara halógena, una lámpara fluorescente y con el propio flash de la cámara. La lámpara halógena necesitó un tiempo de 5 min hasta estabilizarse en 1600 Lux. La lámpara fluorescente necesitó 10 min hasta alcanzar un valor estable de 1600 Lux. Para la lámpara fluorescente no se encontró relación entre los datos experimentales

y los modelos teóricos de ningún analito, haciendo el estudio para los tres canales, rojo, verde y azul, usando una sensibilidad ISO 80.

Con la lámpara halógena se encontró relación con la concentración para dureza en el canal rojo, al igual que para magnesio, mientras que para el potasio fue el canal verde el elegido. Usando el flash, se eligieron los mismos canales debido a que iluminando con luz halógena, para el caso de potasio, el canal rojo y el azul presentan un modelo teórico desplazado a altas actividades. Y para magnesio y dureza el único canal que presentaba correspondencia con el modelo teórico fue el rojo.

Utilizando el flash, observamos que con el canal azul no hay variación con la concentración para los tres analitos. Ahora bien, para magnesio y dureza se seleccionó el canal rojo debido a que el canal verde no daba señal para las membranas introducidas en medio básico. Para el potasio se seleccionó el canal verde ya que con el rojo no hay señal para la membrana una vez equilibrada en disolución tampón.

**Perímetro de aplicación del flash:** Se ha estudiado el rango de acción del flash para determinar el área de la zona de detección útil, donde colocaremos las membranas desechables. La zona de detección se define como un rectángulo cuyo centro geométrico coincide con la incidencia del flash, resultando una zona de detección de 11x8 cm.

Así, dividimos el área total de detección en 7 zonas distintas, disponiendo en cada una de ellas una membrana desechable que fueron medidas. Se encontró que todos resultados son estadísticamente aceptables, menos los obtenidos en la posición central, debido a que en esa zona central era donde se alineaba el flash con la normal, saturando por consiguiente al detector CCD y originando un valor del parámetro analítico fuera de rango (Figura 9.2)

Para comprobar la utilidad de esas 7 zonas antes comentadas, se estableció un intervalo de confianza en torno al parámetro analítico  $1-\alpha_{ef}$  medido a una concentración de potasio de  $1 \cdot 10^{-3}$  M. Los resultados obtenidos para potasio, fueron extrapolados para magnesio y dureza. El intervalo de confianza se calculó del siguiente modo: respuesta predicha  $\pm \left( \frac{t \cdot S_R}{\sqrt{n}} \right)$ , donde  $S_R$  es la desviación estándar de 4 réplicas al nivel de concentración de potasio ensayado,  $1 \cdot 10^{-3}$  M, y que es 0,0814, siendo  $t$  de student para este caso (grados de libertad:  $n-2$ ,  $\alpha=0,05$ ) 2,920. Así pues y como la respuesta predicha en la recta de calibrado fue de 0,3692, resultó un intervalo de confianza:  $0,3692 \pm 0,11886$ . Todos aquellos valores del parámetro analítico que resultaron fuera de este intervalo, se rechazaron como zona útil de medida. De manera que se rechazó la zona central.

**Sensibilidad: (ISO).** Una vez elegida la fuente de luz, se estudian los diferentes canales bajo diferentes tipos de ISO. Así, la cámara fotográfica digital fue configurada a 4 diferentes sensibilidades ISO: 80, 200, 400 y 640. Siendo dispuestas las membranas desechables sobre la lámina blanca de poliestireno, con el propósito de aumentar el contraste de la imagen. 1) *Iluminando con luz halógena*, encontramos que para el caso:

(a) Magnesio: en términos de reproducibilidad; DER de  $1-\alpha_{ef}$ , la mejor ISO se correspondió con ISO 80; siendo la DER entre un 1 y un 10% y siendo superior al 20% en el resto de los valores ISO. Además presenta la pendiente más cercana a la pendiente teórica 0,5 en el modelo lineal, en concreto 0,51, mientras que para el resto de casos es superior a 0,57.

(b) Potasio, igualmente en términos de reproducibilidad; DER de  $1-\alpha_{ef}$  la mejor ISO es la ISO 200 aunque la ISO 80 presenta la mejor correspondencia con la pendiente teórica (0,96) frente a 0,93 (ISO 200) y solo muestra un empeoramiento de entre un 1-2% de la DER de  $1-\alpha_{ef}$ , con respecto a ISO 200. Iso 640 se descartó por su mala precisión, entre un 20-30% mientras que ISO 400 no

distingue tan bien como ISO 80 entre  $1 \cdot 10^{-3}$  y  $5 \cdot 10^{-3}$  M. Se escogió en consecuencia ISO 80.

(c) Dureza, el mejor caso en términos de DER de  $1-\alpha_{ef}$ , correspondió con ISO 200, entre 1-10%, pero a esta sensibilidad y como ocurre con ISO 400, presentan problemas para distinguir entre  $1 \cdot 10^{-4}$  y  $5 \cdot 10^{-4}$  M, hecho que no sucede a ISO 80, aunque a ISO 80 presenta peor discriminación entre  $10^{-2}$  y 0,1 M. Ahora bien, es la sensibilidad ISO 80 quien presenta una pendiente más próxima a 0,5, en concreto de 0,54, mientras que para ISO 200 es de 0,63. Por tanto seleccionamos ISO 80 en el caso de dureza, debido a su mejor correspondencia con el modelo lineal teórico, presentando una pendiente más cercana a 0,5 que ISO 200 y sólo incrementa un 2,5% la DER de  $1-\alpha_{ef}$ , con respecto a ISO 200.

En conclusión, como deseamos realizar una determinación simultánea, se escogió ISO 80 por presentar la mejor sensibilidad utilizando la lámpara halógena.

2) *Iluminando con el flash de la propia cámara*, para los tres analitos se escogió la sensibilidad ISO 400 debido a que fue la que presentaba mejor correspondencia con el modelo teórico lineal, una mejor discriminación entre concentraciones y fue además ISO 400 la que alcanzó el mayor rango de aplicación. La elección de ISO 400 fue debido a que para (a) dureza, con ISO 200 no hubo correspondencia con el modelo teórico, ISO 640 presentó una pendiente mayor a la teórica de 0,5, siendo de 0,61, al igual que ISO 80 (0,56). Para (b) potasio, ISO 200 no presentó correspondencia con el modelo teórico, ISO 640 presentó mayores DER de  $1-\alpha_{ef}$ , entre 15-20%, y finalmente con ISO 80 se empeoraba el límite de detección, pues para el modelo sigmoideal el punto  $10^{-5}$  M se encontraba fuera de rango. Para el caso (c) magnesio, con ISO 200 no hubo correspondencia con el modelo teórico, ISO 640 presentó una mayor pendiente en el modelo lineal que la teórica de 0,5, siendo de 0,62 y con ISO 80 para una concentración 1M la señal se mostró fuera de rango.

#### 4.1.1. **Parámetro analítico**

El parámetro analítico utilizado cuando se mide absorbancia ya se ha señalado en el Capítulo 4, sección 3.1, ecuación 4.4, y el parámetro analítico utilizado en esta Memoria para imágenes digitales indicado en el Capítulo 7, sección 3, ecuación 7.2.

#### 4.1.2. **Caracterización analítica**

##### 4.1.2.1. Modelo Sigmoidal

##### 4.1.2.1.1. *Iluminando con lámpara halógena*

En primer lugar hay que comentar que utilizando la cámara fotográfica digital, encontramos el mismo fenómeno para el potasio, en lo referente a la estequiometría, ya comentada en los Capítulos 7 y 8 de esta Memoria. De manera que hemos trabajado con una estequiometría aparente de 0,5. Para el caso de dureza y magnesio no se observa dicho comportamiento.

Para verificar la relación sigmoidal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ), y la actividad de K(I), Mg(II) y dureza, se prepararon 13 disoluciones patrón conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $7,6 \cdot 10^{-2}$  M en actividades,  $1 \cdot 10^{-7}$  y 0.1 M en concentración para potasio; 15 disoluciones patrón conteniendo entre  $3,9 \cdot 10^{-7}$  y 0,52 M en actividades,  $5 \cdot 10^{-7}$  y 1 M en concentración para magnesio; y 16 disoluciones patrón conteniendo entre  $4,4 \cdot 10^{-8}$  y 0,52 M en actividades,  $1 \cdot 10^{-7}$  y 1 M en concentración para dureza, trabajando en todos los casos a pH 9,0.

Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado en el Capítulo 5 para potasio y dureza y en el Capítulo 8 para magnesio, obteniéndose

los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$ . La Figura 9.1 muestra una secuencia de las capturas de las imágenes de las tres membranas desechables después del equilibrado con la disolución patrón.

Las Figuras 9.3, 9.4 y 9.5 muestran los valores experimentales obtenidos junto con la ecuación sigmoideal teórica para los tres analitos

Para definir el rango de medida, se prepararon dos series de disoluciones patrón. Una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal y otra en la zona de mínima pendiente a bajas actividades (para potasio: 6 patrones en la zona de máxima pendiente, 4 en la de mínima pendiente, 11 y 4 respectivamente para magnesio y 12 y 4 para el caso de dureza, respectivamente). Se usaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez. Así, para **potasio**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  y  $4,3 \cdot 10^{-3}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $5 \cdot 10^{-3}$  M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $4,37 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $10^{-7}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M en concentración).

Para **magnesio**, la zona de máxima pendiente está entre  $3,9 \cdot 10^{-5}$  y 0,89 M en actividades ( $5 \cdot 10^{-5}$  y 1,5 M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $3,9 \cdot 10^{-7}$  y  $7,8 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $5 \cdot 10^{-7}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M en concentración).

Y, finalmente, para **dureza**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,8 \cdot 10^{-7}$  y 0,52 M en actividades ( $1 \cdot 10^{-6}$  y 1 M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $4,4 \cdot 10^{-8}$  y  $8,8 \cdot 10^{-7}$  en actividades ( $5 \cdot 10^{-8}$  y  $1 \cdot 10^{-6}$  M en concentraciones).

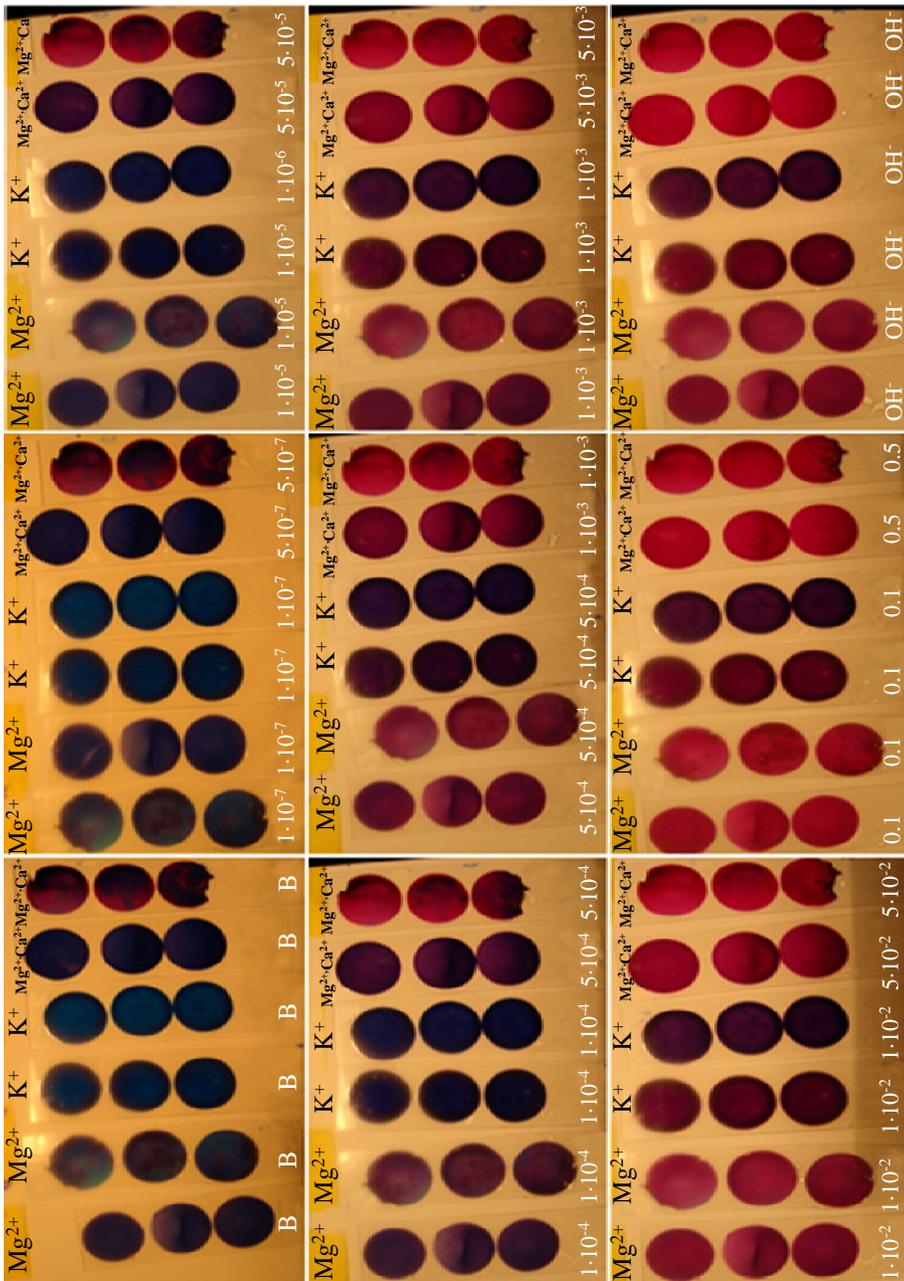


Figura 9.1. Ejemplos de puntos de calibración para las tres membranas. Las concentraciones están en M. La secuencia de las capturas de las imágenes van desde B: equilibradas en tampón hasta la forma básica. Iluminación con luz halógena

La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste<sup>8</sup>.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron, las siguientes:

**A.- Potasio:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,6696 - 0,2952 \log a_{K^+} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 9.1})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,6196 - 0,0535 \log a_{K^+}, \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 9.2})$$

**B.- Magnesio:**

$$1-\alpha_{ef} = 0,3153 - 0,1761 \log a_{Mg^{2+}} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 9.3})$$

$$1-\alpha_{ef} = 1,0318 + 0,0052 \log a_{Mg^{2+}} \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 9.4})$$

**C.- Dureza:**

$$1-\alpha_{ef} = 0,0164 - 0,1879 \log a_{M^{2+}} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 9.5})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,7984 - 0,0263 \log a_{M^{2+}} \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 9.6})$$

Tabla 9.1. El límite superior del procedimiento para potasio, dureza y magnesio utilizando una cámara fotográfica digital y modelo sigmoideal. Iluminación halógena.

Parámetro	Modelo sigmoideal					
	Potasio		Magnesio		Dureza	
Ordenada	-0,6600		0,3153		0,0163	
Desviación estándar de la ordenada	0,0457		0,0173		0,0201	
Pendiente	-0,2952		-0,1761		-0,1879	
Desviación estándar de la pendiente	0,0119		0,0063		0,0061	
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0,9471		0,9451		0,9434	
Linealidad on-line(%)	96,0		96,4		96,6	
DER(%) log a	5·10 <sup>-5</sup> M	7,16	5·10 <sup>-4</sup> M	4,69	5 mg/l	6,14
	1·10 <sup>-4</sup> M	5,44	5·10 <sup>-3</sup> M	6,84	100 mg/l	4,44
	1·10 <sup>-3</sup> M	2,15	0,1 M	8,70	10000 mg/l	6,69
Límite de detección (mM)	5,42·10 <sup>-3</sup>		1,44·10 <sup>-1</sup>		1,7	
Rango lineal (mM)	5,42·10 <sup>-3</sup> -10		1,44·10 <sup>-1</sup> -1,500		1,7-200,000	

Las unidades de concentración están en mM para potasio y magnesio y mg·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para dureza.

De la intersección de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD, mostrado en la Tabla 9.1. El límite superior del rango de medida

usado, se corresponde con la última concentración que cae dentro del rango lineal de cada analito.

La precisión para las diferentes membranas desechables (expresada como RSD) se realizó con un estudio a 3 niveles de concentración para cada sensor que se encuentran situadas en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 8 veces. La Tabla 9.1 muestra los valores obtenidos.

#### 4.1.2.1.2. Iluminación con flash

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico ( $1-\alpha_{ef}$ ) y la actividad de K(I), Mg(II) y dureza iluminando con el propio flash de la cámara fotográfica digital, se prepararon 12 disoluciones patrón conteniendo entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $7,6 \cdot 10^{-2}$  M en actividades,  $1 \cdot 10^{-7}$  y 0.1 M en concentración para potasio; 13 disoluciones patrón conteniendo entre  $3,9 \cdot 10^{-7}$  y 0,52 M en actividades,  $5 \cdot 10^{-7}$  y 1 M en concentración para magnesio; y 14 disoluciones patrón conteniendo entre  $4,4 \cdot 10^{-8}$  y 0.52 M en actividades,  $1 \cdot 10^{-7}$  y 1 M en concentración para dureza, trabajando en todos los casos a pH 9,0.

Se analizaron 6 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado en el Capítulo 5 para potasio y dureza y en el Capítulo 8 para magnesio, obteniéndose los correspondientes valores de  $\alpha_{ef}$ . La Figura 9.2 muestra una secuencia de las capturas de las imágenes de las tres membranas desechables después del equilibrado con la disolución patrón.

Las Figuras 9.6, 9.7 y 9.8 muestran los valores experimentales obtenidos junto con la ecuación sigmoideal teórica para los tres analitos



Para definir el rango de medida, se prepararon dos series de disoluciones patrón. Una en la zona de máxima pendiente de la respuesta sigmoideal y otra en la zona de mínima pendiente a bajas actividades. Para potasio: 6 patrones en la zona de máxima pendiente, 4 en la de mínima pendiente, 9 y 4, respectivamente, para magnesio y 10 y 4 para el caso de dureza). De cada disolución se midieron 6 réplicas usando un sensor desechable nuevo cada vez.

Así, para **potasio**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,75 \cdot 10^{-6}$  a  $8,5 \cdot 10^{-3}$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $1 \cdot 10^{-2}$  M en concentraciones) y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $4,37 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $10^{-7}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M en concentración). Para **magnesio**, la zona de máxima pendiente está entre  $3,9 \cdot 10^{-5}$  y  $0,52$  M en actividades ( $5 \cdot 10^{-5}$  y  $1$  M en concentraciones); Y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $3,9 \cdot 10^{-7}$  y  $7,8 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $5 \cdot 10^{-7}$  y  $1 \cdot 10^{-5}$  M en concentración). Finalmente para **dureza**, la zona de máxima pendiente está entre  $8,8 \cdot 10^{-6}$  y  $0,52$  M en actividades ( $1 \cdot 10^{-5}$  y  $1$  M en concentraciones); Y la zona de mínima pendiente a bajas actividades entre  $8,8 \cdot 10^{-8}$  y  $4,4 \cdot 10^{-6}$  en actividades ( $1 \cdot 10^{-7}$  y  $5 \cdot 10^{-6}$  M en concentraciones). La linealidad de ambas series, como se ha explicado anteriormente, fue comprobada por aplicación de un test de fallo de ajuste<sup>8</sup>.

Las funciones lineales que se obtuvieron fueron las siguientes:

#### A.- Potasio:

$$1-\alpha_{ef} = -0,4564 - 0,2564 \log a_{K^+} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 9.7})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,6168 - 0,0521 \log a_{K^+}, \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 9.8})$$

#### B.- Magnesio:

$$1-\alpha_{ef} = 0,0756 - 0,2194 \log a_{Mg^{2+}} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 9.9})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,8426 - 0,0268 \log a_{Mg^{2+}} \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 9.10})$$

**C.- Dureza:**

$$1-\alpha_{ef} = -0,0246 - 0,2154 \log a_{M^{2+}} \text{ Máxima pendiente} \quad (\text{ec. 9.11})$$

$$1-\alpha_{ef} = 0,851 - 0,018 \log a_{M^{2+}} \text{ Mínima actividad} \quad (\text{ec. 9.12})$$

De la intersección de ambas funciones lineales se obtiene el límite de detección LD, mostrado en la Tabla 9.2. Como antes, el límite superior se corresponde con la última concentración que se encuentra dentro del rango lineal de cada analito. La precisión para las diferentes membranas desechables (RSD) se estudio a 3 niveles de concentración para cada sensor: baja, media y alta de la función de calibrado, siendo cada nivel de concentración replicado 8 veces. En la Tabla 9.2 se muestra el DER del logaritmo de la actividad del potasio.

Tabla9.2, Parámetros analíticos del procedimiento para potasio, dureza y magnesio utilizando una cámara fotográfica digital y aplicando el modelo sigmoidal. Iluminación con flash.

Parámetro	Modelo sigmoidal					
	Potasio		Magnesio		Dureza	
Ordenada		-0,4564		0,0756		-0,0239
Desviación estándar de la ordenada		0,0205		0,0169		0,0198
Pendiente		-0,2564		-0,2194		-0,2147
Desviación estándar de la pendiente		0,0057		0,0074		0,0073
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )		0,9855		0,9572		0,9541
Linealidad on-line (%)		97,8		96,6		96,6
DER(%) log a	5·10 <sup>-5</sup> M	4,08	5·10 <sup>-4</sup> M	5,45	5 mg/l	3,54
	1·10 <sup>-4</sup> M	3,10	5·10 <sup>-3</sup> M	4,56	100 mg/l	4,37
	1·10 <sup>-3</sup> M	5,03	0,1 M	7,39	10000 mg/l	5,04
Límite de detección (mM)		6,42·10 <sup>-3</sup>		1,38·10 <sup>-1</sup>		4,16
Rango lineal (mM)		6,42·10 <sup>-3</sup> -27,3		1,38·10 <sup>-1</sup> -1,000		1,7-200,000

Las unidades de concentración están en mM para potasio y magnesio y mg·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para dureza.

## 4.1.2.2. Modelo lineal

## 4.1.2.2.1. Iluminando con lámpara halógena

Para verificar la relación sigmoideal entre el parámetro analítico  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right)$ , para magnesio y dureza y  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right) + D(\alpha_{ef})$  para, se prepararon las mismas disoluciones patrón que las utilizadas en el modelo sigmoideal. Se analizaron 9 réplicas de cada disolución patrón usando para ello un sensor desechable nuevo cada vez, de acuerdo con el procedimiento indicado en el Capítulo 5 para potasio y dureza y en el Capítulo 8 para magnesio. Los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados. Las Figuras 9.3, 9.4 y 9.5 muestran tanto los modelos sigmoideales como los lineales.

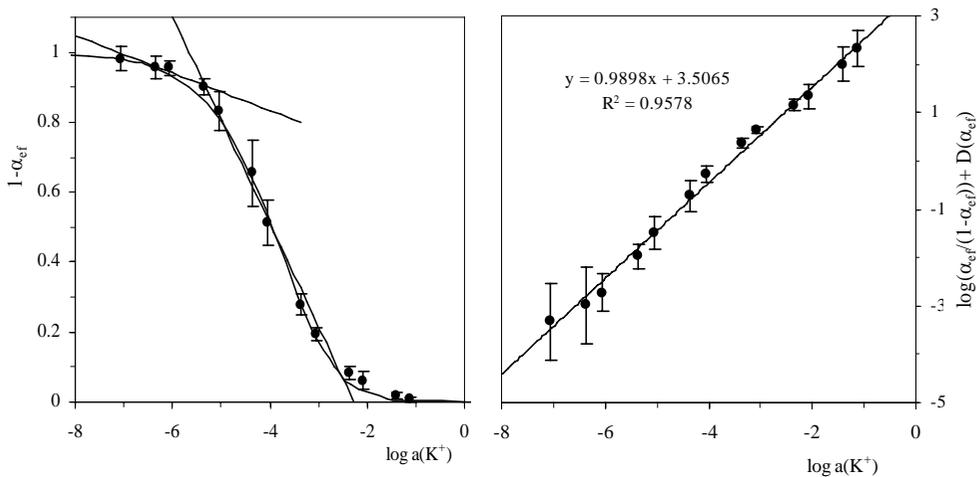


Figura 9.3. Curva de calibración para potasio: Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

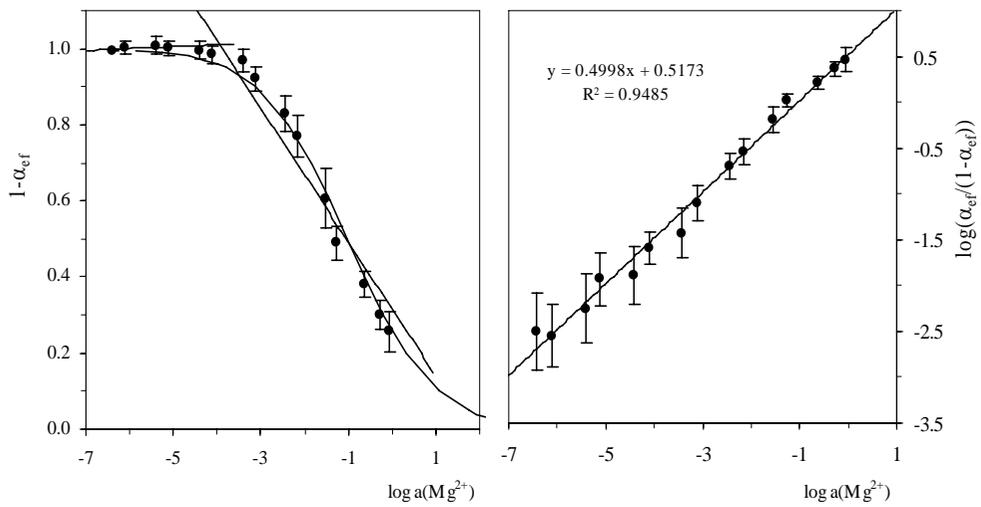


Figura 9.4. Curva de calibración para magnesio: Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

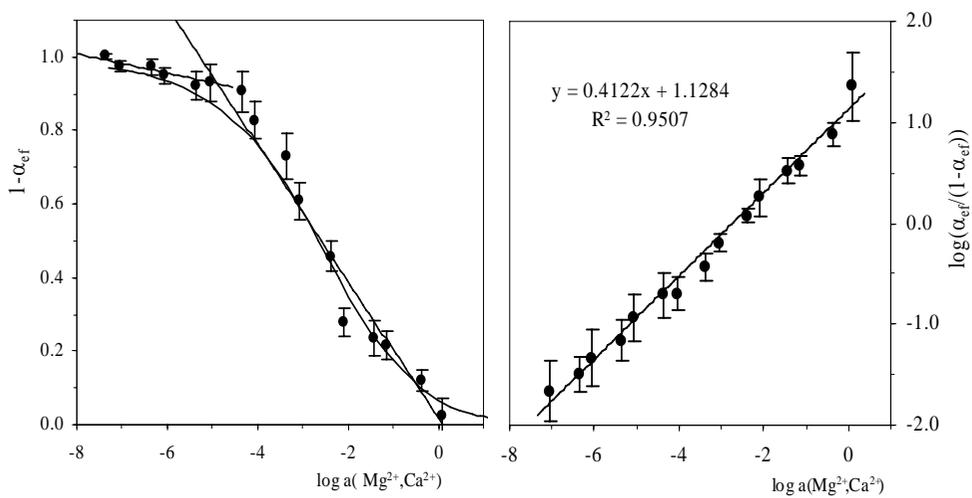


Figura 9.5. Curva de calibración para dureza: Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

La precisión para las diferentes membranas desechables se estudió como siempre a 3 niveles de concentración para cada sensor en la zona baja, media y alta de la función de calibrado. Cada nivel de concentración fue replicado 8 veces (Tabla 9.2). Los niveles de concentración fueron los mismos que los empleados en el modelo sigmoidal. El límite de detección en el modelo lineal se calculó mediante la ecuación 5.17 (véase Capítulo 5).

Tabla9.3. Parámetros analíticos del procedimiento para potasio, magnesio y dureza utilizando una cámara fotográfica digital y aplicando el modelo lineal. Iluminación con lámpara halógena.

Parámetro	Modelo lineal					
	Potasio		Magnesio		Dureza	
Ordenada	3,5065		0,5173		1,12845	
Desviación estándar de la ordenada	0,1043		0,0468		0,0561	
Pendiente	0,9898		0,4998		0,4122	
Desviación estándar de la pendiente	0,0240		0,0127		0,0123	
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0,9578		0,9485		0,9507	
Linealidad on-line(%)	97,6		97,5		97,0	
	5·10 <sup>-5</sup> M	7,62	5·10 <sup>-4</sup> M	6,79	5 mg/l	6,56
DER(%) log a	1·10 <sup>-4</sup> M	4,69	5·10 <sup>-3</sup> M	7,71	100 mg/l	4,28
	1·10 <sup>-3</sup> M	2,36	0,1 M	7,82	10000 mg/l	7,77
Límite de detección (mM)	2,66·10 <sup>-4</sup>		1,99·10 <sup>-3</sup>		0,020	
Rango lineal (mM)	2,66·10 <sup>-4</sup> -100		1,99·10 <sup>-3</sup> -1,500		0,020-200,000	

Las unidades de concentración están en mM para potasio y magnesio y mg·L<sup>-1</sup> de CaCO<sub>3</sub> para dureza.

#### 4.1.2.2.2. Iluminación con flash

Para verificar la relación sigmoidal entre el parámetro analítico  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right)$ ,

para magnesio y dureza y  $\log\left(\frac{\alpha_{ef}}{1-\alpha_{ef}}\right) + D(\alpha_{ef})$  para potasio, se prepararon las

mismas disoluciones patrón que las utilizadas en el modelo sigmoidal. Se analizaron 8 réplicas de cada disolución patrón con un sensor desechable nuevo

cada vez. Los datos experimentales se ajustaron al modelo lineal teórico una regresión lineal ordinaria de mínimos cuadrados (Figuras 9.6, 9.7 y 9.8). La precisión para las diferentes membranas desechables (DER) se estudió como antes ya se ha indicado (Tabla 9.3).

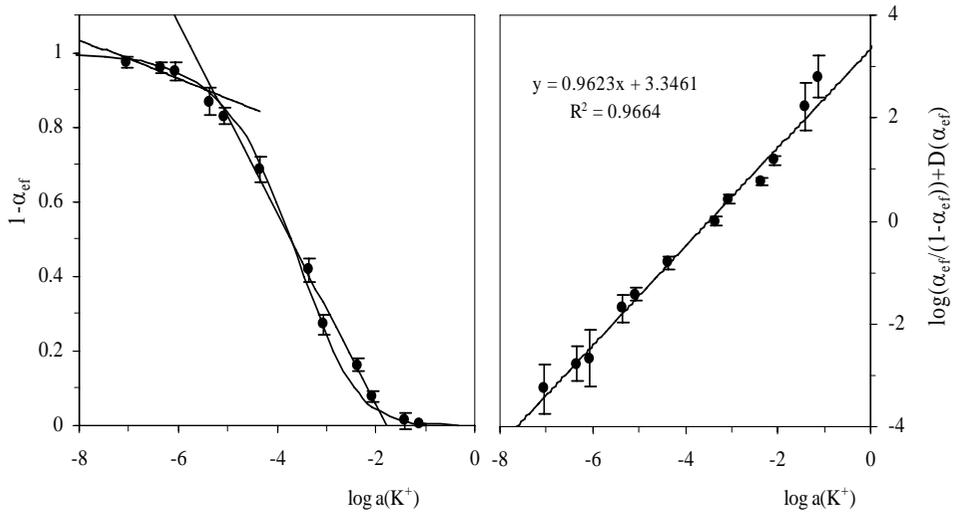


Figura 9.6. Curva de calibración para potasio: Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal.

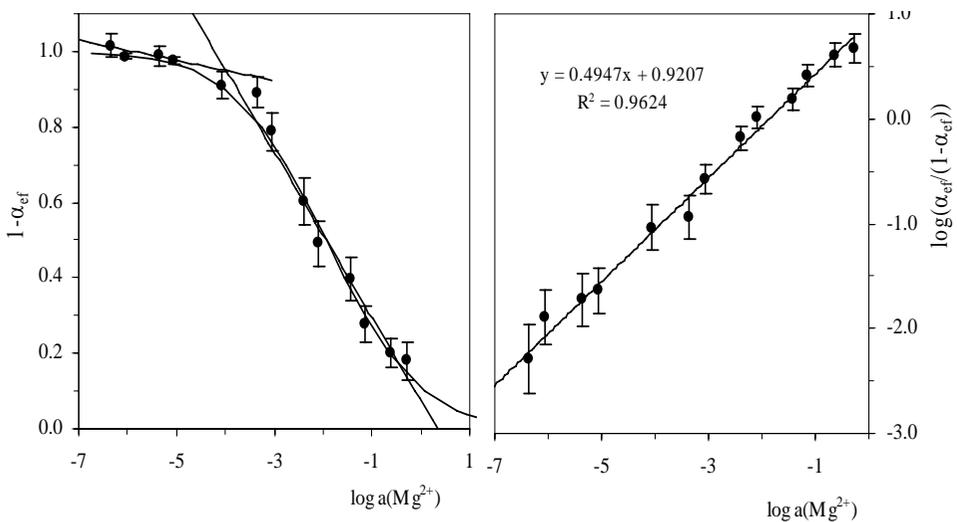


Figura 9.7. Curva de calibración para magnesio: Modelo teórico sigmoidal y función experimental lineal.

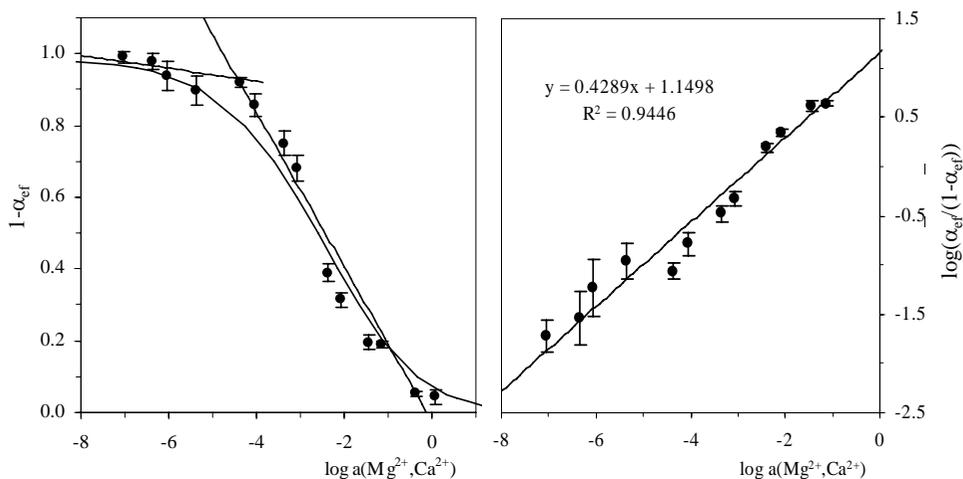


Figura 9.8. Curva de calibración para dureza: Modelo teórico sigmoideal y función experimental lineal.

Tabla 9.4. Parámetros analíticos del procedimiento para potasio, magnesio y dureza utilizando un escáner en modo transmisión y aplicando el modelo lineal. Iluminación con flash.

Parámetro	Modelo lineal					
	Potasio		Magnesio		Dureza	
Ordenada	3,3461		0,9207		1,1499	
Desviación estándar de la ordenada	0,1080		0,0414		0,0544	
Pendiente	0,9623		0,4947		0,4289	
Desviación estándar de la pendiente	0,0236		0,0121		0,0133	
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9664		0,9624		0,9446	
Linealidad on-line(%)	97,55		97,55		96,90	
DER(%) log a	$5 \cdot 10^{-5}$ M	4,01	$5 \cdot 10^{-5}$ M	7,78	5 mg/l	6,97
	$1 \cdot 10^{-4}$ M	3,26	$1 \cdot 10^{-4}$ M	4,73	100 mg/l	5,10
	$1 \cdot 10^{-3}$ M	4,20	$1 \cdot 10^{-3}$ M	6,67	10000 mg/l	4,83
Límite de detección (mM)	$3,19 \cdot 10^{-4}$		$2,7 \cdot 10^{-3}$		0,043	
Rango lineal (mM)	$3,19 \cdot 10^{-4}$ -100		$2,04 \cdot 10^{-3}$ -1,500		0,043-200,000	

Las unidades de concentración están en mM para potasio y magnesio y  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  para dureza.

## 4.2. Medida de pH

Además de estudiar las determinaciones de potasio, magnesio y dureza, se aplicó el empleo de la cámara fotográfica para la determinación de pH de disoluciones. Para ello se utilizó papel indicador de pH del utilizado habitualmente para estimar visualmente el pH de disoluciones. En concreto, se usaron varillas de pH indicadoras de décimas, con un rango de pH de 6,5 hasta 10,0, estando la escala de pH dividida, según el fabricante, en los siguientes niveles pH: 6,5; 6,8; 7,1; 7,4; 7,7; 7,9; 8,1; 8,3; 8,5; 8,7; 9,0 ; 9,5 y 10,0. Para establecer la función de calibrado para pH, se introdujeron las tiras de pH durante 3 minutos en disoluciones tamponadas con tampón Tris del pH adecuado a lo largo de todo el rango de aplicación de las varillas indicadoras. Cada punto fue replicado con 4 tiras distintas. Se realizó este experimento tanto para la iluminación con lámpara halógena como utilizando el flash. Las Figuras 9.9 y 9.10 representan la secuencias de imágenes capturadas por la cámara fotográfica digital bajo los dos tipos de iluminación. En la Figura 9.11 se muestran los valores medios junto con las funciones de calibrado obtenidas.

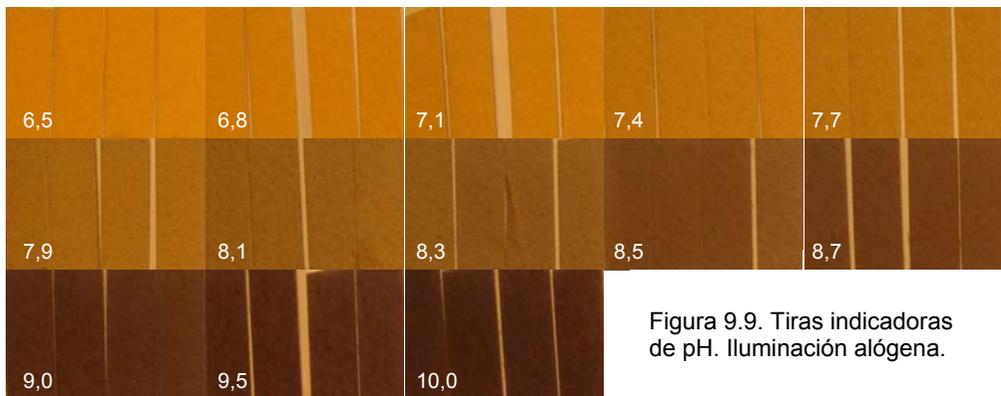


Figura 9.9. Tiras indicadoras de pH. Iluminación alógena.

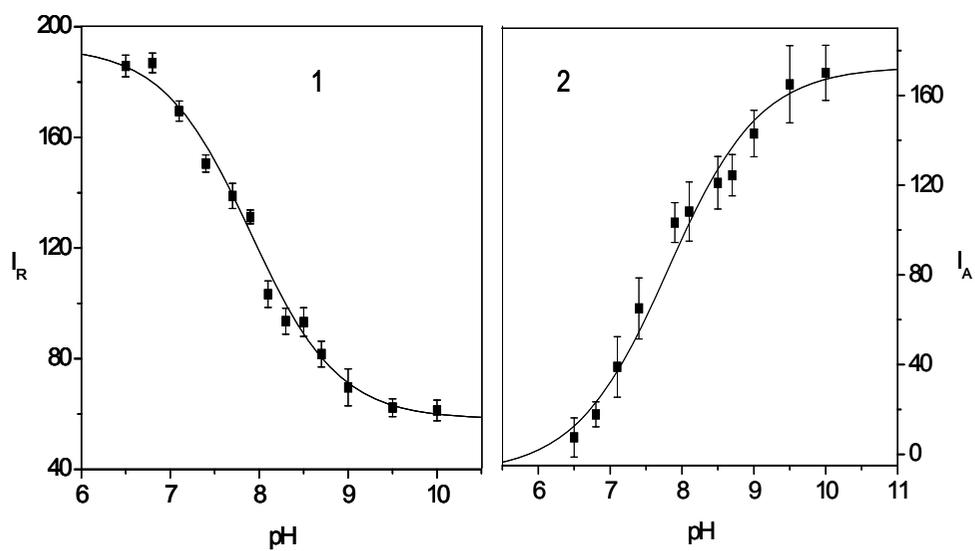
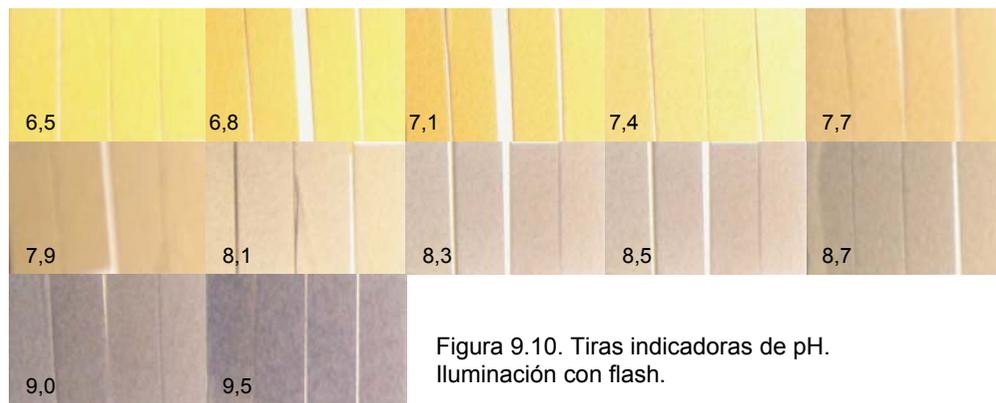


Figura 9.11. Funciones de calibrado junto con los datos experimentales de pH. (1) Iluminación halógena, (2) Iluminación con flash.

La relación entre el canal seleccionado, azul (iluminación con flash) y el canal rojo (iluminación halógena), con el pH es de tipo sigmoideal, de manera que, resultó la siguiente función de calibrado:

$$\frac{A}{A_{HCl}} = a_2 + \frac{a_2 - a_1}{1 + \exp\left(\frac{([K^+] - a_0)}{a_3}\right)} \quad (\text{ec.9.13})$$

siendo  $a_0$  hasta  $a_3$  los parámetros de ajuste.

Las curvas sigmoideales calculadas para pH son opuestas debido a la elección del canal más apropiado en cada caso. Cuando la señal del canal azul aumenta, la del canal rojo disminuye y viceversa.

Tabla 9.5. Caracterización de las funciones de pH

	Halógena	Flash
PARÁMETRO	Valor; S	Valor; S
$a_2$	192,9; 3,224	-5,568; 8,357
$a_1$	58,06; 2,411	172,2; 8,837
$a_0$	7,903; 0,0395	7,823; 0,1261
$a_3$	0,4929; 0,0398	0,6228; 0,0931
$r^2$	0,9912	0,9816
$\chi^2/\text{DoF}$	1,84181	1,03933
Rango pH	6,5-10	6,5-10
	7,1	4,6
DER%	8,1	3,79
	9	2,06

Un total de 4 réplicas distintas fueron analizadas por cada pH para obtener las características del procedimiento indicadas en la Tabla 9.5, la cual muestra un excelente ajuste. La precisión fue estudiada a 4 niveles de pH 7, 8 y 9 mediante 8 réplicas con distintas tiras de pH.

### **4.3. Validación y aplicaciones**

El procedimiento puesto a punto fue aplicado para establecer su utilidad a la determinación de potasio, magnesio y dureza en diferentes muestras reales. Para hacer esto, se seleccionaron muestras de aguas de diferente procedencia (grifo, pozo, río, nieve, mar) cuya concentración de dureza, potasio y magnesio está en la zonas del rango dinámico lineal de cada uno de ellos obtenido en el método de linealización propuesto.

En las Tablas 9.6, 9.7 y 9.8 se muestran los resultados obtenidos empleando el procedimiento descrito utilizando la cámara fotográfica a color digital ya descrita, para los tres sensores, iluminando con lámpara halógena y las Tablas 9.9, 9.10 y 9.11 se muestran los resultados obtenidos empleando el procedimiento descrito utilizando la cámara pero iluminando en el propio flash de la cámara fotográfica digital. Ambos métodos fueron comparados con los encontrados mediante espectrofotometría de absorción atómica como método de referencia.

Las tres tablas incluye también los valores medios para tres determinaciones de cada muestra y la desviación estandar de estas medidas y el nivel de probabilidad ( $P_{val}$ ) del test de comparación de medias empleado. Como se observa no existe diferencia significativa entre las medias obtenidas utilizando los sensores y el método de referencia.

Tabla 9.6 Determinación de potasio en diferentes tipos de aguas y bebidas empleando una cámara fotográfica digital iluminando con una lámpara halógena.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	
Agua mineral (San Vicente)	0,015	0,0075	0,012	0,00040	43,9
Agua mineral (Mondariz)	0,20	0,057	0,15	0,0011	27,4
Agua mineral (Lanjarón)	0,019	0,0047	0,019	0,00029	95,3
Agua mineral (Fuente Liviana)	0,0070	0,0030	0,010	0,00037	16,8
Mineral water (Solán de Cabras)	0,034	0,0087	0,030	0,00047	56,1
Agua de grifo (Almuñecar, Granada)	0,13	0,068	0,12	0,00019	85,3
Agua de grifo (Granada)	0,022	0,0067	0,018	0,00029	9,8
Agua de grifo (Viznar, Granada)	0,0093	0,0024	0,0090	0,00027	15,7
Agua de río (Lachar, Granada)	0,34	0,13	0,25	0,0041	36,24
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,013	0,0024	0,011	0,00018	15,7
Lluvia (Granada)	1,7·10 <sup>-3</sup>	6,7·10 <sup>-4</sup>	1,5·10 <sup>-3</sup>	5,0·10 <sup>-5</sup>	6,4
Agua de pozo (Otura, Granada)	0,19	0,0030	0,20	0,035	28,3
Agua de mar (Almería)	14	3,7	12	0,074	11,8
Agua de aljibe (Granada)	0,015	0,0045	0,014	0,00040	81,5
Sidra	31	7,6	27	0,13	20,0
Zumo de tomate	96	6,6	95	0,41	75,4
Cerveza	8,4	3,9	10	0,099	40,9
Vino blanco	30	10	27	0,099	61,4
Vino tinto	33	6,8	33	0,099	99,8

(1) se realizaron tres réplicas diferentes

Tabla 9.7 Determinación de magnesio en diferentes tipos de aguas empleando una cámara fotográfica digital iluminando con una lámpara halógena.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	
Agua mineral (San Vicente)	0,33	0,055	0,28	0,0037	14,1
Agua mineral (Lanjarón)	0,38	0,096	0,30	0,0018	6,6
Agua mineral (Bezoya)	0,035	0,0092	0,027	0,00019	19,9
Agua mineral (Mondariz)	0,22	0,092	0,18	0,0052	17,7
Agua mineral (Fuente Liviana)	0,62	0,087	0,59	0,0022	48,2
Agua mineral (Solán de Cabras)	0,95	0,35	0,89	0,0088	78,9
Agua de grifo (Granada)	0,67	0,35	0,53	0,0071	52,9
Agua de grifo (Ogijares, Granada)	0,94	0,15	0,98	0,014	72,1
Agua de grifo (Viznar, Granada)	1,03	0,31	0,86	0,0069	17,8
Agua de grifo (Monachil, Granada)	1,08	0,30	0,85	0,012	14,5
Agua de mar (Almería)	60	3,9	62	1,3	52,2
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	2,3·10 <sup>-3</sup>	4,1·10 <sup>-4</sup>	2,2·10 <sup>-3</sup>	6,3·10 <sup>-5</sup>	89,9
Lluvia (Granada)	6,1·10 <sup>-3</sup>	3,9·10 <sup>-3</sup>	5,6·10 <sup>-3</sup>	1,3·10 <sup>-4</sup>	52,3
Agua de aljibe (Granada)	1,9	0,91	1,5	0,038	41,9

(1) se realizaron tres réplicas diferentes

Tabla 9.8 Determinación de dureza en diferentes tipos de aguas empleando una cámara fotográfica digital iluminando con una lámpara halógena.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	CaCO <sub>3</sub> mg·L <sup>-1</sup>	s <sup>(1)</sup>	CaCO <sub>3</sub> mg·L <sup>-1</sup>	s <sup>(1)</sup>	
Agua mineral (Mondariz)	41	12	37	0,48	81,9
Agua mineral (Lanjarón)	90	20	88	0,25	87,5
Agua de grifo (Monachil, Granada)	253	97	227	8,4	67,1
Agua de grifo (Almuñecar, Granada)	204	36	189	2,04	13,6
Agua de río (Chauchina, Granada)	765	39	740	15	33,9
Agua de pozo (Otura, Granada,)	518	114	421	11	21,8
Agua de mar (Almería)	10122	1054	8659	143	7,6
Agua de aljibe (Granada)	496	230	418	6,8	60,0
Nieve (Sierra Nevada, Granada,)	0,87	0,19	0,80	0,061	54,8
Lluvia (Granada)	3,1	1,8	2,3	0,015	42,3

(1) se realizaron tres réplicas diferentes

Tabla 9.9 Determinación de potasio en diferentes tipos de aguas y bebidas, empleando una cámara fotográfica digital iluminando con flash.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	
Agua mineral (San Vicente)	0,011	0,002	0,012	0,00040	62,2
Agua mineral (Mondariz)	0,25	0,07	0,15	0,0011	81,3
Agua de grifo (Monachil, Granada)	0,0086	0,0046	0,012	0,0013	64,7
Agua de grifo (Almuñecar, Granada)	0,10	0,02	0,12	0,00019	28,7
Agua de grifo (Granada)	0,024	0,0080	0,018	0,00029	10,3
Agua de grifo (Viznar, Granada)	0,0095	0,0023	0,0090	0,00027	65,9
Agua de grifo (Ogijares, Granada)	0,031	0,090	0,036	0,00033	45,6
Agua de río (Lachar, Granada)	0,34	0,11	0,25	0,0041	33,2
Agua de río (Chauchinar, Granada)	0,21	0,040	0,15	0,0041	11,2
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	0,0089	0,0029	0,011	0,00018	41,1
Lluvia (Granada)	1,7·10 <sup>-3</sup>	4,4·10 <sup>-4</sup>	1,5·10 <sup>-3</sup>	5,0·10 <sup>-5</sup>	40,0
Agua de pozo (Otura, Granada)	0,25	0,01	0,20	0,035	9,0
Zumo de frutas	54	2,2	51	0,11	9,7
Zumo de tomate	87	25	95	0,41	60,1
Cerveza	9,2	3,1	10	0,099	44,2
Vino tinto	32	10	33	0,099	64,4

(1) se realizaron tres réplicas diferentes

Tabla 9.10 Determinación de magnesio en diferentes tipos de aguas empleando una cámara fotográfica digital iluminando con flash.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	K(mM)	s <sup>(1)</sup>	
Agua mineral (Solán de Cabras)	1,18	0,45	0,89	0,0088	22,6
Agua mineral (Lanjarón)	0,30	0,12	0,30	0,0018	18,0
Agua de aljibe (Granada)	1,9	0,42	1,5	0,038	14,8
Agua mineral (Bezoya)	0,027	0,11	0,027	0,00019	98,7
Agua de grifo (Ogijares, Granada)	1,2	0,61	0,98	0,014	27,7
Nieve (Sierra Nevada, Granada)	2,0·10 <sup>-3</sup>	1,0·10 <sup>-3</sup>	2,2·10 <sup>-3</sup>	6,3·10 <sup>-5</sup>	83,7

(1) se realizaron tres réplicas diferentes

Tabla 9.11 Determinación de dureza en diferentes tipos de aguas empleando una cámara fotográfica digital iluminando con flash.

Muestra	Sensor desechable		EAA		Pval (%)
	CaCO <sub>3</sub> mg-L <sup>-1</sup>	s <sup>(1)</sup>	CaCO <sub>3</sub> mg-L <sup>-1</sup>	s <sup>(1)</sup>	
Agua mineral (Mondariz)	37	3,7	37	0,48	99,6
Agua mineral (Lanjarón)	90	23	88	0,25	14,6
Agua mineral (Bezoya)	12	4,3	13,3	0,045	64,4
Agua mineral (Vichy Catalán)	80	31	76	0,68	82,9
Agua de grifo (Monachil, Granada)	236	36	227	8,41	68,1
Agua de río (Chauchina, Granada)	703	208	739	14,8	77,8
Agua de pozo (Otura, Granada,)	432	49	421	11	71,2
Agua de mar (Almería)	8804	815	8659	143	77,7
Nieve (Sierra Nevada, Granada,)	1,2	0,5	0,80	0,061	25,1
Lluvia (Granada)	2,7	0,36	2,3	0,015	22,1
Agua de pozo (Colomera, Granada)	193	68	186	0,87	85,5
Agua de aljibe (Granada)	409	49	418	6,8	78,5

(1) se realizaron tres réplicas diferentes

Dado el amplio intervalo de concentraciones estudiado en la validación, se ha empleado el error relativo cuadrático medio (RMSRE) como estadístico para evaluar la capacidad de predicción de la calibración propuesta (ver ecuación 7.23 dentro del Capítulo 7 de esta Memoria). Los valores que se obtuvieron para el conjunto de datos utilizando iluminación halógena fue para potasio 0,18, para magnesio es de 0,20 y dureza es de 0,17; Los valores que se obtuvieron para el conjunto de datos

utilizando como iluminación el flash fue para potasio 0,21, para magnesio es de 0,20 y para dureza es de 0,16.

## 5. Conclusiones

Se ha puesto a punto una nueva forma de medir membranas desechables basadas en la química ionóforo-cromoionóforo usando una cámara fotográfica digital comercial SONY Cybershot DSC-T9 con función macro de 6,0 megapíxeles como sistema detector. Hemos medido el cambio que se produce en el color de la zona sensora del sensor desechable debido a la presencia o ausencia de analito de interés usando una imagen digital capturada por la cámara. Así, tres analitos, magnesio potasio y dureza, han sido determinados simultáneamente. Hemos demostrado la viabilidad de utilizar una cámara convencional para realizar análisis cuantitativos sin necesidad de instrumentación más compleja y con un personal sin especial cualificación. El ulterior desarrollo de un software de tratamiento de datos podría permitir establecer un sistema muy sencillo de determinación de concentraciones basado en el empleo de sensores desechables.

## 6. Bibliografía

1. Johnson, T. *Displays* **1996**, 16, 183-91.
2. Byrne, L.; Barker, J.; Pennarun-Thomas, G.; Diamond, D. *TrAC* **2000**, 19, 517.
3. Seiler, K.; Simon, W. *Anal.Chim.Acta* **1992**, 266, 73-87.
4. Meier, P. C. *Anal.Chim.Acta* **1982**, 136, 363-68.
5. Gaiao, E. d. N.; Martins, V. L.; Lyra, W. d. S.; Farias de Almeida, L.; Cirino da Silva, E.; Araujo, M. C. U. *Anal.Chim.Acta* **2006**, 570, 283-90.
6. Lehr, M.; Schmid, W. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* **1993**, 89, 43-45.
7. Yam, K. L.; Papadakis, S. E. *J.Food Eng.* **2004**, 61, 137-42.

8. Capitán-Vallvey, L. F.; Fernández-Ramos, M. D.; Alvarez de Cienfuegos, P. *Anal.Chim.Acta* **2002**, *451*, 231-41.



## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Como resultado del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se ha propuesto un procedimiento basado en un sensor desechable irreversible para la determinación de magnesio en aguas, haciendo uso de una membrana de PVC plastificado empleando como molécula de reconocimiento de magnesio la 7-dietilamino-3-(3,4-etilendioxibenzoil)cumarina que fue sintetizada y purificada por nosotros. La medida del color que se produce en la zona sensora debido a la formación de un complejo cumarina magnesio permite la determinación de magnesio por medidas directa de absorción de radiación. Se ha discutido el

mecanismo de sensado del cromoionóforo en el sensor desechable propuesto. El procedimiento presenta un rango dinámico lineal comprendido entre  $5,18 \cdot 10^{-3}$  y  $0,458$  mM y una desviación estándar relativa para un nivel de concentración medio del 1,3% utilizando membranas diferentes. La membrana tiene suficiente selectividad para la determinación de magnesio en aguas naturales y puede ser aplicada satisfactoriamente a la determinación de este ión en aguas de diferente procedencia.

2. Se ha simplificado el procedimiento de medida de los sensores basados en la química ionóforo – cromoionóforo, el cual exige la realización de tres medidas de absorbancia para la obtención del parámetro analítico. El procedimiento ideado para la medida de absorbancia consiste en utilizar como parámetro analítico un cociente de absorbancias que se puede obtener de forma sencilla. El procedimiento consta de dos pasos: (1) medida directa de la absorbancia del sensor desechable sin tratamiento con ningún reactivo ni disolución y (2) medida de la absorbancia después del proceso de equilibración con la muestra a analizar.
3. Se ha diseñado y desarrollado un fotómetro portátil para la medida de sensores desechables basado en la simplificación del procedimiento de medida en la química ionóforo – cromoionóforo previamente descrita. El instrumento portátil permite calcular directamente el cociente de absorbancias usado como parámetro analítico o bien la concentración de potasio, si se programa la función de calibrado en el microprocesador. La función de calibrado de tipo sigmoideal cubre desde  $5 \cdot 10^{-6}$  M hasta  $0,1$ M en potasio con valores de precisión (DER) en torno a un 1-2%, expresados como logaritmo de concentración de potasio.
4. Se ha desarrollado un modelo matemático lineal simple basado en un modelo logístico que se ha aplicado a sensores desechables para cationes basados en química ionoforo-cromoionoforo, que ha permitido la

linealización de la función respuesta de tipo sigmoideal. Con ello se ha logrado que el rango de aplicación del procedimiento se incremente hasta seis órdenes de magnitud, permitiendo la medida directa de muestras con contenidos de analito extremos, con la ventaja de poder determinar muestras de forma directa y rápida sin la necesidad de operaciones preliminares.

5. Se ha estudiado la posibilidad de usar medidas espectrorradiométricas para la determinación de potasio haciendo uso de sensores desechables, comparando los resultados obtenidos con los originados mediante un espectrofotómetro utilizado como método de referencia. Además, se comprueba que las medidas espectrorradiométricas pueden ser linealizadas, con lo que el límite de detección se ve aumentado en 2 órdenes de magnitud. El estudio de las diferencias de color existentes en la membrana para todo el rango de concentraciones ensayado, permite el análisis semicuantitativo mediante la observación visual de las membranas a través de una carta de color, pudiéndose clasificar la concentración de potasio en siete grupos diferentes.
6. Se ha aplicado y demostrado la viabilidad de uso de un escáner óptico convencional, en sus dos modos de trabajo, reflexión y transmisión, para cuantificar potasio en disoluciones acuosas usando sensores desechables con unas características analíticas buenas, especialmente en términos de precisión. Con dicho escáner es posible adquirir de forma simultánea la imagen de diferentes membranas desechables, acortando de esta manera el tiempo de análisis y reduciendo el posible costo del análisis al utilizar un instrumento de bajo costo y uso común.
7. Se ha aplicado y demostrado la viabilidad de uso de una cámara CCD y de una cámara fotográfica digital a color como dispositivos instrumentales para la determinación cuantitativa de magnesio, dureza y potasio mediante

sensores desechables a través del uso de las imágenes adquiridas. Utilizando una cámara CCD, el procedimiento desarrollado para potasio presenta un rango dinámico entre  $9,92 \cdot 10^{-5}$  y 100 mM con una reproducibilidad intersensor de 3,83 % como logaritmo de la actividad. Para magnesio presenta un rango dinámico entre  $1,86 \cdot 10^{-3}$ -1000 mM con una reproducibilidad intersensor de 5,01 % y para dureza entre 0,013 y 20000  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  con una reproducibilidad de 5,74%. Ahora bien, utilizando una cámara fotográfica digital encontramos que para potasio el rango de aplicación es de  $2,66 \cdot 10^{-4}$  y 100 mM con una reproducibilidad intersensor de 4,69 % como logaritmo de la actividad. Para magnesio presenta un rango dinámico entre  $1,99 \cdot 10^{-3}$ -1500 mM con una reproducibilidad intersensor de 7,71 % y para dureza entre 0,020 y 200000  $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$   $\text{CaCO}_3$  con una reproducibilidad de 4,28% . El procedimiento propuesto con ambos sistemas de medida con sus diversas variantes, ha sido validado para el análisis de los tres analitos en bebidas y aguas de distinta procedencia.

8. Se ha estudiado la posibilidad de determinar pH de disoluciones mediante una cámara fotográfica digital a color utilizando tiras de pH comerciales, pudiendo determinar un rango de pH comprendido entre 6,5 y 10.
9. Todos los procedimientos de medida desarrollados en la presente Memoria se han aplicado a la determinación de los diferentes analitos objeto de estudio (potasio, magnesio, dureza) en muestras de agua de grifo, pozo, mineral, fuente, río, lluvia, nieve de mar y en distintas bebidas sin necesidad de tratamiento previo de las muestras en ningún caso, salvo dilución en algún caso y adición de la disolución reguladora del pH.
10. En todos los casos, el coste de los sensores de un solo uso desarrollados se encuentran entre 1 y 10 céntimos de euro, considerando solo materiales, y el tiempo de vida se encuentra alrededor de un mes y medio.

11. En conclusión, es posible el desarrollo de procedimientos de medida alternativos, basados en fotómetros portátiles dedicados, escáneres y cámaras fotográficas, a los habitualmente empleados para la medida de sensores desechables como son espectrofotómetros convencionales, logrando procedimientos de sensibilidad similar, aunque con mayor simplicidad de uso, rapidez y costo.



**ANEXO I**

**PUBLICACIONES**



## Magnesium optical one-shot sensor based on a coumarin chromoionophore

L.F. Capitán-Vallvey<sup>a,\*</sup>, M.D. Fernández-Ramos<sup>a</sup>, A. Lapresta-Fernández<sup>a</sup>,  
E. Brunet<sup>b</sup>, J.C. Rodríguez-Ubis<sup>b,\*</sup>, O. Juanes<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Granada, Granada 18071, Spain

<sup>b</sup> Department of Organic Chemistry, C-I Faculty of Science, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain

Received 22 June 2005; received in revised form 27 July 2005; accepted 9 August 2005

Available online 19 September 2005

### Abstract

The characterization of a new irreversible optical absorption-based one-shot sensor for magnesium is described. The magnesium photoactive probe is 7-diethylamino-3-(3,4-ethylendioxybenzoyl)coumarin immobilized in a plasticized polymeric membrane. The magnesium selectivity can be explained in terms of size and charge density of magnesium and charge-separated resonance forms contribution in the excited state of coumarin. The selectivity obtained for magnesium over a variety of naturally occurring species in natural waters meets the requirements for the determination of this ion in water. The one-shot sensor responds between 0.14 and 14 mg L<sup>-1</sup> with a sensor-to-sensor reproducibility of 1.3% as log  $a_{\text{Mg}^{2+}}$ , at the medium level of the range. The performance of the optical one-shot sensor was tested in the analysis of magnesium in different types of natural waters and soft drinks validating results against a reference procedure.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Magnesium determination; One-shot sensor; Coumarin chromoionophore; Water analysis; Sensing mechanism

### 1. Introduction

Of the different strategies for cation recognition, chromoionophore molecules are notable for having a recognition moiety for the analyte linked to a signalling moiety to convert the recognition event into an optical signal (absorption, reflection, luminescence). A very interesting signalling moiety is the coumarin nucleus because of its photochemical and photophysical properties when coupled to cryptands [1], crown ethers [2] or calixarenes [3].

Different monoaza- and diazacrowns linked to a coumarin nucleus via a methylene [4,5] or ethylene bridge [6] have been synthesized, demonstrating that the carbonyl group of coumarin moiety participates in the complexation next to the crown ring. The replacement of a methylene bridge by a carbonyl group in a monoaza-15-crow-5 ether improves selectivity against alkaline-earth ions. Here, the amide bridge

participates in the complexation and generates hyperchromaticity [7].

Making the complexing cavity stiffer by connecting the aroyl coumarin with the crown ring through a benzo group [8] or by incorporating the benzo group in the ether crown [9] leads to competition between 3-arylcoumarin chromophore and crown ether for the metal ion, forming a mixture of two different 1:1 complexes with carbonyl groups and crown ether, respectively [8].

This was demonstrated by preparing a 7-diethylamino-3-(3,4-ethylendioxybenzoyl)coumarin in which the crown ring was substituted for a 1,4-dioxane moiety to mimic the electronic effects exerted by the crown ring on the 3-arylcoumarin nucleus [8]. This compound only reacted with magnesium perchlorate in acetonitrile, showing an interesting bathochromic shift of 46 nm upon complexation.

Taking its selectivity against magnesium into consideration, we used this coumarin as a chromoionophore for the development of an optical one-shot sensor for the determination of Mg(II) in water.

\* Corresponding authors.

E-mail address: [lcapitan@ugr.es](mailto:lcapitan@ugr.es) (L.F. Capitán-Vallvey).

Different one-shot sensors or test strips for Mg(II) have been described and some of them even marketed. In the case of water, the most often proposed sensor determines Mg(II) plus Ca(II) – in fact, hardness, more than magnesium – which is the case of Serim™ water hardness test strips (Serim Research Co.), EM Quant® total hardness test (Merck) or Aquadur® total hardness (Macherey-Nagel), all of which are based on a reaction between a chemical indicator in the pad of the test strip and Mg(II) and/or Ca(II) in water, which results in a colour change that is compared with a colour scale to obtain a semi-quantitative assay value.

Other test strip procedures have been proposed for Mg(II) determination in biological fluids, such as blood or urine. The most simple are composed of a chelatometric dye such as Calmagite. RTM [10] or a cyanofornazan derivative [11], a masking agent, a buffer, and a stabilizer on a bibulous material, usually filter paper, covered with a semi-permeable membrane. Another proposed magnesium test strip is an integral multilayer analytical element comprising a water impermeable light-transmissive support, a reagent layer containing a water-soluble indicator, Xylidyl blue IR, capable of reacting with the analyte, a pH buffer, a nonionic surfactant, and a porous spreading layer containing a spreading action controller [12]. Phthalein purple has been used as reagent in the Reflectoquant® magnesium test (Merck) for determination in milk or cheese based on diffuse reflectance measurements [13].

Another type of test strip uses ionophore–chromoionophore chemistry and is comprised of a porous carrier matrix, for example, filter paper, incorporated into a homogeneous hydrophobic mixture containing *N,N*-diheptyl-*N,N*-dimethyl-1,4-butanediamide as a Mg(II) ionophore next to an indonaphthol derivative acting as chromoionophore, a plasticizer, a buffer and additional reagents such as interferent removal chemicals or wetting compounds [14]. Transparent bulk membranes of the same type have been proposed also for Mg(II) [15]. In all cases, the amount of colour change is proportional to the quantity of magnesium in the sample and this can be measured by visual comparison to a standard colour chart or with dedicated reflectance or transmission photometers.

To the best of our knowledge, chromoionophore chemistry has been not used for one-shot sensors. We describe here a selective optical one-shot sensor procedure for Mg(II) based on a ketoaminocoumarin receptor that is applied to its determination in different types of waters.

## 2. Experimental

### 2.1. Apparatus and software

A Hewlett Packard HP-8453 diode array spectrophotometer (Nortwalk, CT, USA) interfaced to a Pentium MMX 200 microcomputer via a HP IB interface board and HP IB cable for spectral acquisition and subsequent manipulation of data

were used to perform the absorbance measurements. As software for the acquisition and manipulation of the spectral data, a UV–visible Chemstation software package supplied by HP was used. A 44 mm high, 12 mm homemade cell holder made of a wide painted iron block was used to obtain the absorbance measurements. The diameter of the central hole of the cell holder was 5 mm and it was placed 11.5 mm from the base. The cell holder contained a 1 mm thick space for the introduction of the sensor [16]. A Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer and an Edinburgh Instruments OB 920 fluorescence lifetime spectrometer (TCSPC technique) were used for emission measurements. Other apparatus and laboratory materials were a laboratory-made spin-on device [17], and a Crison Basic 20 (Crison Instruments, Barcelona, Spain) digital pH-meter with combined glass-saturated electrode.

### 2.2. Reagents and materials

All chemicals used were of analytical-reagent grade and reverse-osmosis type quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore) was used throughout. Magnesium and calcium stock solutions (0.5 M) were prepared in water from dry magnesium carbonate and calcium carbonate, respectively (Merck, Darmstadt, Germany) by adding 1:1 HCl until dissolution (pH 2.2); sodium, potassium, barium, iron(III), and zinc stock solutions (0.5 M) were prepared in water from chlorides (Merck), as well as potassium sulphate, sodium hydrogen carbonate, potassium nitrate, strontium nitrate, and sodium hypochlorite stock solutions (0.5 M) (Merck). Solutions of lower concentration were prepared by dilution with water. A pH 9.0 buffer solution 0.5 M was prepared from tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and HCl (Merck).

The magnesium sensitive films were prepared on sheets of Mylar type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) using the following chemicals: tributylphosphate (TBP), tris(2-ethylhexyl)phosphate (TEHP), 2-nitrophenyloctylether (NPOE), bis(2-ethylhexyl)sebacate (DOS), dioctylphthalate (DOP), poly(vinylchloride) (PVC; high molecular weight), and tetrahydrofuran (THF) from Sigma; potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate and sodium tetrakis [3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]borate were purchased from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). A 5% solution of D4 and D6 polyurethane hydrogels (Tyndale Plains-Hunter L.D. Lawrenceville, NJ, USA) in 90% ethanol:water mixture and Nafion (Sigma–Aldrich) were used. The chromoionophore 7-diethylamino-3-(3,4-ethylendioxybenzoyl) coumarin was synthesized, and purified by us [8], being characterized by melting point, elemental analysis, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR, HRMS (FAB+), and IR.

### 2.3. Preparation of disposable membranes

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique. Mixtures for the prepara-

tion of magnesium-sensitive membranes were made from a batch of 25.0 mg (32.85 wt%) of PVC, 50.0 mg (65.70 wt%) of TBP, 0.18 mg (0.24 wt%) of 7-diethylamino-3-(3,4-ethylendioxybenzoyl)coumarin, and 0.94 mg (1.24 wt%) of potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate, dissolved in 1 mL of freshly distilled THF. The magnesium sensitive membranes were cast by placing 20  $\mu$ L of the mixture on a 14 mm  $\times$  40 mm  $\times$  0.5 mm thick polyester sheet on a home-made spin-coater [17] rotating at 120 rpm. After spinning for 30 s, the membrane was removed from the spin coater and was left in a dryer with a saturated THF atmosphere for 3 min at room temperature to enable slow evaporation of the THF. The sensing area of the resulting one-shot sensor has the following physical characteristics: solid and homogeneous  $\varnothing$  6 mm circular film, transparent and yellow, well-adhered to the solid support and with a calculated thickness of about 7.0  $\mu$ m. The concentration of the chromoionophore and lipophilic salt in a dry, thin membrane was calculated to be 6.24 and 24.9 mmol kg<sup>-1</sup>, respectively.

#### 2.4. Procedure and measurement set-up

Into a glass vessel containing 50 mL of an aqueous test solution with magnesium between  $4.90 \times 10^{-4}$  and  $5.01 \times 10^{-6}$  M in activities buffered with 1 mL of pH 8.0 Tris buffer solution 0.5 M, a one-shot sensor was introduced hanging from a support. The solution was then mechanically stirred for 7 min with a magnetic stirrer at 900 rpm in such a way that the flow of the solution impinged vertically on the surface of the sensing zone without turbulence. After this, the one-shot sensor was heated with a hair dryer set 10 cm above the sensor for 1 min ( $\sim 100^\circ\text{C}$ ). The absorbance of the sensing membrane was measured 0.75 min after being removed from the heater at 461 nm in a spectrophotometer against a Mylar polyester strip [16]. All measurements were carried out at room temperature. The membranes were not conditioned before use.

#### 2.5. Calculations

The analytical parameter used was a normalized absorbance  $\alpha$  defined as  $(A - A_0)/(A_1 - A_0)$ , where the maximum ( $A_0$ ) and minimum ( $A_1$ ) absorbance values corresponded to the complexed and uncomplexed forms of the chromoionophore. They were obtained from measuring the one-shot sensors both before and after reaction with an amount of Mg(II) in the saturation zone. After optimization of the membrane composition, reaction conditions and establishing the model, it was possible to use a constant value for  $A_0$  ( $0.74 \pm 0.050$ ) obtained as an average of 45 different membrane measurements. The extraction constant  $K_e$  was calculated according to [18], using values in the maximum slope zone of the experimental response functions for magnesium. Activities were calculated according to the two-parameter Debye–Hückel formalism [19]. Software programs used for the treatment of the data and fitting of experimental data

to theoretical response function were: Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), ver.6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993 and Graphmatica for Win 32 ver. 1:60d, 1998 edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido.

### 3. Results and discussion

A previous study on the development of photoactive probes based on coumarins as the signalling moiety [8] reported the reaction of 7-diethylamino-3-(3,4-ethylendioxybenzoyl)coumarin against Group IIA cations, especially with magnesium in acetonitrile, a reaction explained by the cooperation of chromene and aroyl carbonyl groups ( $\log K_s = 3.91 \pm 0.01$ ).

We were interested in implementing this reaction in the one-shot sensor format for the determination of magnesium in aqueous media. Consequently, we prepared different types of membranes containing the chromoionophore being studied and the chemicals needed in each case using hydrophilic polymers, such as cellulose, polyurethane hydrogels and hydrophobic polymers such as PVC, PVA, ethyl cellulose, and Nafion, discerning that the use of hydrophobic membranes gave the best results.

Preliminary observations performed on plasticized PVC films containing the coumarin in the presence of an alkaline tetraphenylborate R showed that complexation with Mg(II) caused a bathochromic shift of 40 nm in the membrane (from 421 to 461 nm) with an isosbestic point at 436 nm (Fig. 1) very similar to the 46 nm shift (from 418 to 464 nm) observed in acetonitrile solution [8]. We also observed in the membrane that the free and complexed coumarin emitted at 473 ( $\lambda_{\text{exc}} = 421$ ) and 491 ( $\lambda_{\text{exc}} = 461$ ) nm, respectively, the Stokes' shift being thus smaller in the complex (from  $2.61 \times 10^{-3}$  to  $1.32 \times 10^{-3}$  cm<sup>-1</sup>). Fig. 2 depicts fluorescence evolution with time. That of the free coumarin diminished in favour of an increase of the complexed one, both variations sharing a first order rate constant

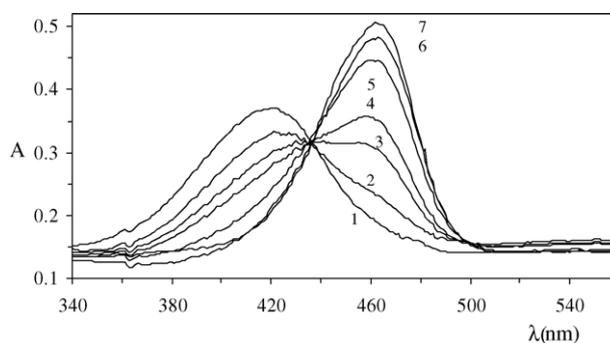


Fig. 1. Absorption spectra of one-shot sensor after reaction with different magnesium concentrations: (1)  $1 \times 10^{-5}$  M; (2)  $3 \times 10^{-5}$  M; (3)  $5 \times 10^{-5}$  M; (4)  $7 \times 10^{-5}$  M; (5)  $1 \times 10^{-4}$  M; (6)  $4 \times 10^{-4}$  M; (7)  $7 \times 10^{-4}$  M.

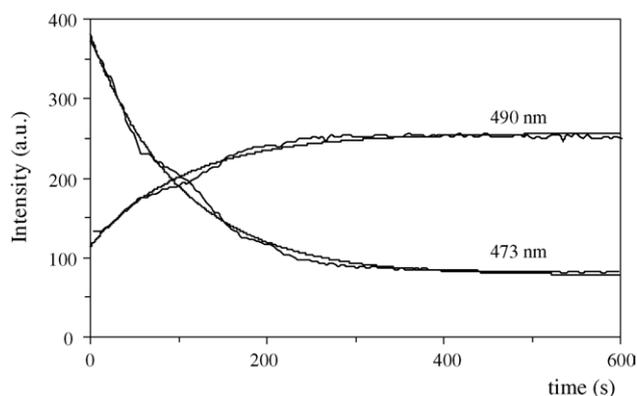


Fig. 2. Evolution of fluorescence signal of free (473 nm) and complexed coumarin (491 nm) in the membrane immediately emerged from the magnesium solution.

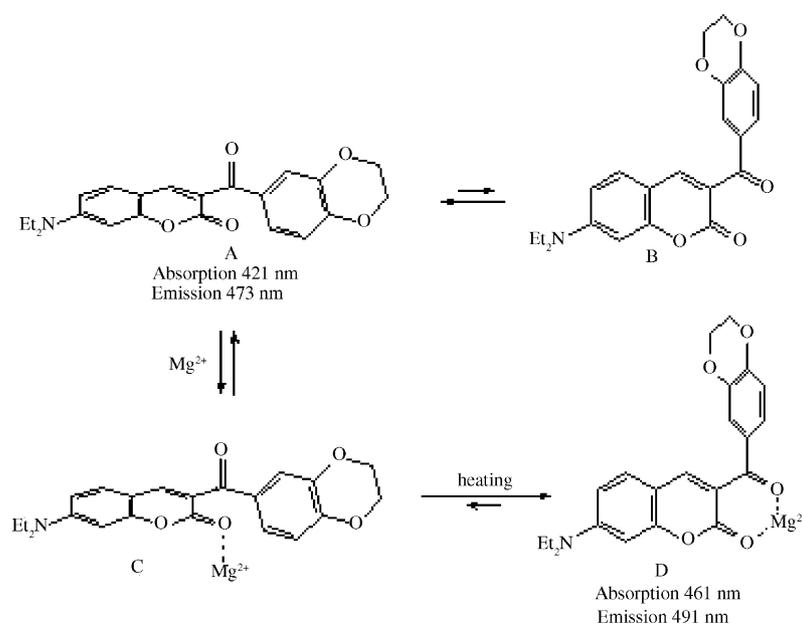
of  $9.6 \times 10^{-3} \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$  which may correspond to Mg(II) diffusion into the viscous medium of the membrane.

After ca. 6 min emission stabilized and the overall result was a decrease of fluorescence ( $\Delta \text{Int} = 40\%$ ), as it occurred for other magnesium coumarin complexes with the same structure [20,9], although the differences could also be ascribed to the lower polarity of membrane solvent (plasticizer tributylphosphate;  $\epsilon \sim 8$  [21]).

The fluorescence lifetimes of free and complexed coumarin fitted with a biexponential decay [free coumarin:  $\tau_1$  0.52 ns (18.1%),  $\tau_2$  1.91 (81.9%),  $\chi^2$  1.123; complex:  $\tau_1$  0.91 ns (79.9%),  $\tau_2$  1.92 (20.1%),  $\chi^2$  1.084] showing that deactivation should be a relatively complicated process due to membrane heterogeneity and/or the conformational behaviour of the coumarin (vide infra) that is affected by complexation.

To finish this preliminary study we did find, to our surprise, that the extent of the reaction between the membrane and the magnesium it retained from its contact with aqueous Mg(II) solutions was limited because the subsequent heating of the film, while not submerged in the solution and after reaction, considerably increased the development of colour. This apparently unusual behaviour can be explained if one considers the conformational behaviour of the coumarin depicted in Scheme 1. Semi-empirical calculations (AM1, HyperChem) suggested that, in absence of the metal, the conformational energy minimum corresponded to an arrangement (A) where the carbonyl groups form a dihedral angle of ca.  $120^\circ$ . On the other hand, the large bathochromic shift observed upon complexation (40 nm) should be due to the stabilizing interaction in the excited state of the metal with the high electron density of the chromone carbonyl group transferred from the donor 7-diethylamino group [6,20]. This stabilization should be even higher in species D where the phenone and chromone carbonyl groups rest parallel to one another and co-operate in metal coordination.

We hypothesize that when the coumarin incorporates into the membrane its conformational equilibrium freezes and conformer A, less appropriate for complexation, must be the most abundant one. The initial, limited development of colour should be due to the relatively small ratio of conformer B, more suitable for complexation. Although complex D must be much more stable, the combined turning of the phenone carbonyl and phenyl groups necessary to achieve the appropriate parallel layout (B) of the carbonyl groups for Mg(II) coordination must be much more difficult in the viscous medium of the membrane (AM1 calculations predict already an activation energy of 1.5–2.0 kcal/mol in the single molecule). All evidence hints that this is the energy surpassed with the heat-

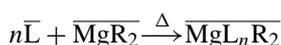
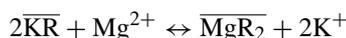


Scheme 1. Conformational behaviour of coumarin chromoionophore.

ing. Once the complex has been formed, the situation is quite stable and, thus, irreversible.

The sensing mechanism of this one-shot sensor involves a two-step process: (1) uptake of Mg(II) by ion-exchange with the ion-exchanger plasticized PVC with a limited reaction with chromoionophore L and (2) reaction of Mg(II) with coumarin concomitant to membrane heating, the whole process being irreversible. An alkaline salt of a highly lipophilic anion  $R^-$  is incorporated into the membrane to give it ion-exchange properties.

If the chromoionophore is assumed to form (1):  $p$  (M:L) complexes with magnesium, the following equilibrium holds resulting in a mass transfer of Mg(II) into the bulk of the organic membrane phase:



in which the over lined species are in membrane phase, while Mg(II) is in aqueous solution. The response parameter of the one-shot sensor is the protonation degree  $\alpha$ , defined as  $[C]/C_L$ , measured by the absorbance of the protonated form of chromoionophore, which is the optical measurable species in membrane phase, as a normalized absorbance [22]. The  $\alpha$  value is related to the co-extraction constant,  $K_e$ , the analytical concentrations of chromoionophore  $C_L$  and the activity of magnesium through the response function:

$$a_{Mg^{2+}} = \frac{1}{K_e} \frac{(1 - \alpha)C_L}{(C_L - p(1 - \alpha)C_L)^p} \quad (1)$$

Factors controlling one-shot sensor response fall into two groups: (a) those related to the design and composition of the membrane, such as proportions of components and conditions used for membrane making and (b) those related to the reaction with analyte, such as pH, contact time, heating time, and magnesium activity.

The plasticizer strongly influences the response of the membrane to magnesium, the reaction rate and selectivity. To select the plasticizer, the reaction against both magnesium and calcium was studied, finding that NPOE and DOP produced a higher response for Ca(II) than for Mg(II), DOS gave the same answer for both, TEHP exhibited a very slow response for both alkaline earth ions and, finally, TBP made it possible to discriminate between both ions. TBP was thus used as plasticizer for all subsequent experiments.

Of the different lipophilic salts tested, potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate provided the best results. The concentration of lipophilic salt and chromoionophore was optimized using a sequential experimental Doehlert design [23] with three levels assigned to the lipophilic salt and five to the chromoionophore. The obtained response surface (Fig. 3) did not indicate the presence of a maximum, according to Lagrange's criterion, but rather a continuous increase in the signal to concentration growth of both reagents in the membrane.

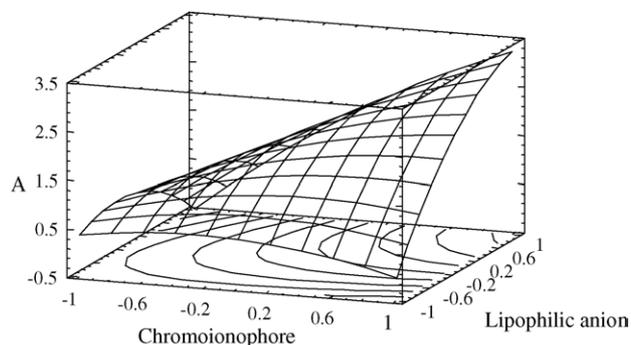


Fig. 3. Surface response for lipophilic salt and chromoionophore variation.

Notwithstanding this, the interference of Ca(II) concomitantly increased with reagent concentration, which imposes a restriction on the amount of reagent in the membrane. Thus, the optimisation of the lipophilic salt and coumarin concentration in the membrane was studied univariantly, by monitoring the calcium interference in each case. Fig. 4(1) shows the dependence of the signal on coumarin concentrations in the membrane for Mg(II) and Ca(II), illustrating the increase of Ca(II) interference with coumarin concentration. A concentration of  $6.24 \times 10^{-3} \text{ mol kg}^{-1}$  was selected in order to minimize calcium interference at the expense of producing a poorer signal. The amount of lipophilic salt used was a 1:4 molar ratio of chromoionophore/lipophilic anion due to the observed increase in the analytical signal that was produced with lower calcium interference (Fig. 4(2)).

The percentage of plasticizer TBP in the membrane was shown to have little influence on magnesium selectivity, but a large one on the response time and physical properties of the one-shot sensor. The response time decreased up to 66% TBP, and then increased because of the worsening of the physical properties of the film (adherence, homogeneity and drying time) as shown in Fig. 4(3).

The reaction of both Mg(II) and Ca(II) with coumarin chromoionophore film is practically independent of the solution pH in the interval 6.5–9.0, as one would have anticipated considering the structure of the chromoionophore, but from pH 8.0 onwards the difference between Mg(II) and Ca(II) signals increased 15%. We selected 8.0 as the working pH and  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  Tris solution as a buffer. As expected, the ionic strength of the sample influenced the one-shot sensor response. Nevertheless, experimental results showed that the signal was independent of the ionic strength, adjusted with NaCl, up to  $10^{-2} \text{ M}$ , then decreasing exponentially at higher NaCl concentrations (to 5% at 0.1 M and to 0.5% at 0.5 M), probably due to the competition of sodium with magnesium from the ionic sites in membrane. Calcium behaved identically.

It was found that the analytical signal increased with the equilibration and stirring times up to 7 min and 900 rpm, respectively, staying constant afterwards. Thus, 7 min and 900 rpm were used in the following experiments.

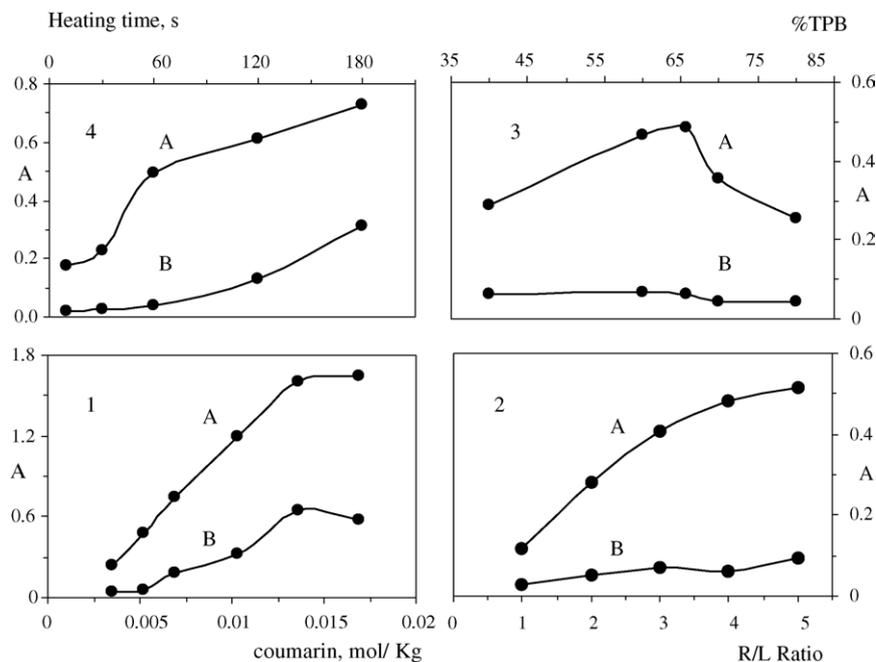


Fig. 4. Influence of several variables on one-shot sensor response: (1) chromoionophore concentration; (2) chromoionophore/lipophilic salt ratio; (3) plasticizer percentage; (4) heating time. (A) Reaction with Mg(II) ( $1 \times 10^{-3}$  M) and (B) reaction with Ca(II) ( $1 \times 10^{-3}$  M).

Preliminary experiments indicated that heating the membrane after contact with the solution problem greatly increased the extent of the reaction, even more than when the reaction was brought about in a warm solution. Considering different heating systems (oven, hot plate, hot air), the best results were attained with hot air coming from a conventional 1800 W hair dryer maintained 10 cm from the membrane for 1 min, thus achieving absorbance increments of 2 orders of magnitude. Higher heating times increased the calcium signal (Fig. 4(4)). From the instant the heating was ceased, the absorbance decreased reaching a constant value around 45 s later. This process was observed again with a new heating cycle.

The response of the one-shot sensor to magnesium activities was established against 20 different values between  $5.4 \times 10^{-2}$  and  $8.7 \times 10^{-8}$  (0.1 M and  $10^{-7}$  M in concentrations) at pH 8.0 with 9 replicates of each one. Fig. 5 shows the mean experimental values along with a good adjustment of the theoretical response function calculated using Eq. (1) for the stoichiometric ratio of chromoionophore/magnesium,  $p = 1$ . The fitting by least-squares of the experimental points, in the linear maximum slope zone (six different concentration levels and nine replicates of each one) of the response curve for magnesium to the theoretical model indicated by Eq. (1), made it possible to calculate  $\log K_e$  as  $4.28 \pm 0.04$ .

### 3.1. Analytical characterization and applications

To characterize the magnesium one-shot sensor we used the linear relationship in the middle of the sigmoidal response function defined by means of a lack-of-fit test as the measuring range [18]. To define the measuring range we used

three series of standards; one in the maximum slope zone (five standards, nine replicates each one, each replicate being measured with a different test strip), between  $1.74 \times 10^{-5}$  and  $1.72 \times 10^{-4}$  in activities ( $2 \times 10^{-5}$  and  $2 \times 10^{-4}$  M in concentration), another in the minimum slope zone of lower activity (four standards, nine replicates each one, again each replicate being measured with a different test strip), between  $8.7 \times 10^{-8}$  and  $2.17 \times 10^{-6}$  in activities ( $10^{-7}$  and  $2.5 \times 10^{-6}$  M in concentration); and finally another in the minimum slope area of highest activity (six standards, nine replicates each one, again each replicate being measured with a different test strip), between  $8.4 \times 10^{-4}$  and  $5.3 \times 10^{-2}$  in activities ( $10^{-3}$  and 0.1 M in concentration). The linearity of

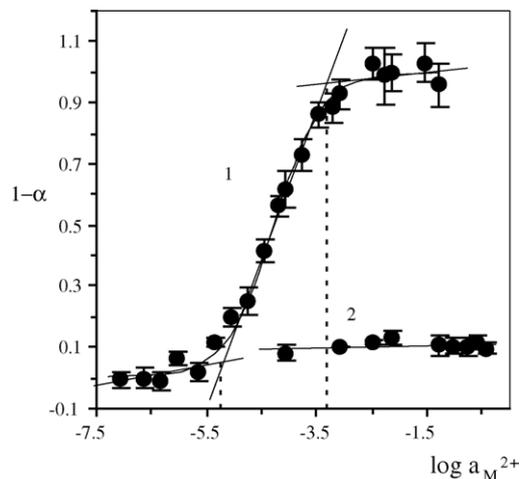


Fig. 5. Curve response of one-shot sensor: (1) against Mg(II) activity and (2) against Ca(II) activity.

each of the three series was tested by applying a lack-of-fit test and the following linear functions were obtained—(1) maximum slope:  $1 - a = 0.4857 - 2.5869 \log a_{\text{Mg}^{2+}}$ ; (2) minimum slope in the zone of highest activity:  $1 - a = 0.0195 - 1.0303 \log a_{\text{Mg}^{2+}}$ ; (3) minimum slope in the zone of lowest activity:  $1 - a = 0.0165 - 0.1069 \log a_{\text{Mg}^{2+}}$ . The interception of functions with maximum and minimum slopes in the zone of lower activity gave us a detection limit of  $0.14 \text{ mg L}^{-1}$  in concentration. The upper limit of the measuring range was obtained from the intercept of the linear calibration function with the linear function in the zone of higher activity, displaying a value of  $14 \text{ mg L}^{-1}$ . Thus, the measuring range for Mg(II) determination is between  $0.14$  and  $14 \text{ mg L}^{-1}$  expressed in concentration. ( $5.18 \times 10^{-6}$  and  $4.58 \times 10^{-4}$  in activities).

The precision using different one-shot sensors, and expressed as relative standard deviation (R.S.D.), was obtained at 3 activity levels of Mg(II), namely  $8.69 \times 10^{-6}$ ,  $6.07 \times 10^{-5}$  and  $0.34 \times 10^{-3}$  in activities ( $1 \times 10^{-5}$ ,  $7 \times 10^{-5}$  and  $4 \times 10^{-4} \text{ M}$  in concentrations) and 10 replicates of each one, and had values of 1.1, 1.3 and 2.2% for  $\log a_{\text{Mg}^{2+}}$ . Table 1 shows these and other analytical parameters.

In order to check the selectivity of the one-shot sensor for the intended application to water analysis, a systematic study was conducted on the effect produced by common species in water on the determination of  $1.7 \text{ mg L}^{-1}$  of Mg(II). The concomitant species were tested at different concentration levels, and if interference occurred, the concentration of these species was reduced until the result was included in the interval defined by  $\pm t_{(n-2; \alpha; 0.05)} \cdot S_R$  (at  $1.7 \text{ mg L}^{-1}$ ). We used this interval as the reference and the maximum concentration of interfering species producing a value higher or lower to this interval was taken as the tolerance level. Table 2 shows that the obtained tolerance levels are sufficient for the analysis of magnesium in many different types of water, although the

Table 1  
Analytical figures of merit

Parameter	Value (S)
Intercept	2.5869; 0.0764
Slope	0.4857; 0.0178
Probability level% (lack-of-fit test)	95.38
Linear range <sup>a</sup>	Up to $4.58 \times 10^{-4}$
Detection limit <sup>a</sup>	$5.18 \times 10^{-6}$
R.S.D. (%) <sup>b</sup>	
$8.69 \times 10^{-6a}$	1.1
$6.07 \times 10^{-5a}$	1.3
$0.34 \times 10^{-3a}$	2.2
Lifetime (weeks)	3

<sup>a</sup> Activities.

<sup>b</sup> R.S.D. for  $\log a_{\text{Mg}^{2+}}$ .

Table 2  
Effect of foreign ions on the determination of  $1.7 \text{ mg L}^{-1}$  of Mg(II)

Foreign ions	Tolerance level ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Na(I)	162.5
K(I)	289.3
Ca(II)	5.1
Sr(II)	10.0
Ba(II)	>100
Fe(III)	>10
Zn(II)	>50
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	>100
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	>100
ClO <sup>-</sup>	54.4
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	>100

calcium interference is higher ( $5.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) than expected considering the separate response for both alkaline-earth ions (see a calibration function for calcium in Fig. 4). This synergistic effect can be explained taking into consideration that calcium extraction by ion exchange in the membrane might be more favoured than that of magnesium. Consequently, although magnesium is complexed more favourably than cal-

Table 3  
Determination of Mg(II) in different types of water using our strip and AAS as a reference method (three replicates in all cases)

Matrix	Test strip ( $\text{mM Mg}^{2+}$ )	S	Reference method ( $\text{mM Mg}^{2+}$ )	S	P <sub>val</sub> (%)
Mineral water (Solan de Cabras)	0.8	0.09	1.0	0.02	10.7
Mineral water (Sierras de Jaén)	0.7	0.26	0.7	0.01	98.7
Mineral water (Bonaqua)	0.9	0.11	1.0	0.03	8.5
Mineral water (Lanjarón)	0.3	0.02	0.29	0.004	76.2
Horchata (Che, Puleva)	2.0	0.03	2.1	0.09	19.1
Isotonic drink (Isostar)	5.6	0.22	5.9	0.07	16.3
Tap water (City of Granada, Spain)	0.3	0.08	0.29	0.002	89.8
Tap water (La Línea, Cádiz, Spain)	0.1	0.05	0.19	0.001	5.3
Tap water (Ogijares, Granada, Spain)	0.9	0.05	0.9	0.01	60.9
Tap water (Viznar, Granada, Spain)	0.7	0.04	0.8	0.01	5.4
Tap water (Monachil, Granada, Spain)	0.9	0.09	1.0	0.01	20.8
Tap water (Huetor Santillán, Granada, Spain)	0.8	0.10	0.9	0.01	30.2
Tap water (Carchuna, Granada, Spain)	1.6	0.17	1.6	0.01	95.3
Tap water (Armillá, Granada, Spain)	0.3	0.02	0.3	0.01	12.7
Spring water (La Peza, Granada, Spain)	1.0	0.09	1.1	0.01	8.2
Spring water (Morollón, Granada, Spain)	1.1	0.22	1.2	0.01	54.8
Well water (Otura, Granada, Spain)	2.6	0.06	2.7	0.03	6.3

cium, a high concentration of the latter led to a decrease in magnesium reaction. Despite the increase in calcium interference when it was mixed with the analyte, the tolerance level was sufficient for different applications.

To check its usefulness, the proposed one-shot sensor for water analysis was applied to different types of water (spring, mineral, and tap) and soft drinks. Table 3 shows the results obtained with the proposed optical test strip and with ASS used as a reference method. Table 3 also includes the mean values from three determinations of each sample, standard deviations of these measurements and the probability value ( $P_{\text{val}}$ ) of the test used for the comparison of the measurements obtained from both methods. It may be easily seen that the results obtained from both methods are statistically similar.

The lifetime of the one-shot sensor was a mean of 3 weeks, as tested with a series of different membranes at a magnesium concentration in the middle of the range and preserved dry and protected from light and humidity.

#### 4. Conclusion

An optical one-shot sensor for magnesium is presented that uses a coumarin-based chromoionophore implemented in a transparent membrane that works by ion exchange offering its absorbance as an easy-to-measure analytical signal.

The described one-shot sensor makes it possible to monitor magnesium for water and soft drinks, with advantages in reducing contamination, cost reduction (ca.  $<€25 \text{ g}^{-1}$  of coumarine), and short response time. It is environmentally friendly and has an estimated lifetime of 3 weeks in usual conditions. The use of other coumarin chromoionophores that reduce temperature dependencies is now under investigation.

#### Acknowledgements

We acknowledge financial support from the Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Supe-

rior (Spain) (Projects Nos. BQU2002-00353 and MAT2002-03243). We also thank FYSE-ERCROS S.A. (Aranjuez, Spain) for generous indirect funding.

#### References

- [1] D. Masilamani, M.E. Lucas, G.S. Hammond, WO 8 900 997, 14-6-1988.
- [2] J.G. Bentsen, S.H. Chou, E.M. Cross, K.J. Halverson, J.E. Trend, C.A. Kipke, M. Yafuso, S.L. Patil, US 5,958,782, 27-2-1997.
- [3] H.M. Chawla, K. Srinivas, J. Indian Inst. Sci. 74 (1994) 515.
- [4] F.Z. Badaoui, J. Bourson, Anal. Chim. Acta 302 (1995) 341.
- [5] J. Bourson, F. Badaoui, B. Valeur, J. Fluor. 4 (1994) 275.
- [6] E. Brunet, P. Garcia-Losada, J.C. Rodriguez-Ubis, O. Juanes, Can. J. Chem. 80 (2002) 169.
- [7] J.L. Habib Jiwan, C. Branger, J.-P. Soumilion, B. Valeur, J. Photochem. Photobiol. A 116 (1998) 127.
- [8] E. Brunet, M.T. Alonso, O. Juanes, R. Sedano, J.C. Rodriguez-Ubis, Tetrahedron Lett. 38 (1997) 4459.
- [9] D. Taziaux, J.P. Soumilion, J.L. Habib Jiwan, J. Photochem. Photobiol. A 162 (2004) 599.
- [10] G.D. Steinman, US 5,397,710, 1995.
- [11] M.J. Smith-Lewis, J.C. Mauck, J.L. Toner, US 4,753,890, 2004.
- [12] M. Tanaka, F. Arai, K. Terashima, N. Yaginuma, US 4,966,784, 1990.
- [13] Merck, Reflectoquant. Magnesium in milk, <http://www.environmental-center.com/technology/merck/#merck>, 2004.
- [14] M.L. Gantzer, P.R. Hemmes, D. Wong, US 4,670,218, 1987.
- [15] L.F. Capitán-Vallvey, M.D.F. Ramos, P.A.d.C. Galvez, J. Gomez, Talanta 65 (2005) 239.
- [16] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, F. Santoyo-Gonzalez, Anal. Chim. Acta 481 (2003) 139.
- [17] K. Seiler, W. Simon, Anal. Chim. Acta 266 (1992) 73.
- [18] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, Anal. Chim. Acta 451 (2002) 231.
- [19] P.C. Meier, Anal. Chim. Acta 136 (1982) 363.
- [20] M.T. Alonso, E. Brunet, O. Juanes, J.C. Rodriguez-Ubis, J. Photochem. Photobiol. A 147 (2002) 113.
- [21] T. Negishi, K. Nakatani, Phys. Chem. Chem. Phys. 5 (2003) 594.
- [22] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, Chemical Rev. 97 (1997) 3083.
- [23] Y. Hu, D.L. Massart, J. Chromatogr. 458 (1989) 311.

A. Palma · A. Lapresta-Fernández · J. M. Ortigosa-Moreno ·  
M. D. Fernández-Ramos · M. A. Carvajal · L. F. Capitán-Vallvey

## A simplified measurement procedure and portable electronic photometer for disposable sensors based on ionophore-chromoionophore chemistry for potassium determination

Received: 22 April 2006 / Revised: 3 June 2006 / Accepted: 9 June 2006 / Published online: 8 July 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** A field-portable photometer for potassium determination with disposable sensors has been developed. It can be applied to routine water and beverage analysis. The disposable sensor is based on ionophore-chromoionophore chemistry. A colour change in the sensing film is detected by measuring the transmitted intensity with a solid state photodetector. Optical excitation at 660 nm is emitted by a light-emitting diode (LED). Negative feedback for LED bias and thermal correction were included to improve system stability. Additionally, a measurement procedure is presented, characterized and validated for in situ photometer use and real-time results. This simplified procedure is based on prior preparation of the disposable sensor in its acidic form and on the use of an absorbance ratio as analytical parameter. The only requirement for analysis is prior equilibration with a buffered sample solution for 3 min and absorbance measurement before and after equilibration. Good sensitivity in the concentration range 5  $\mu$ M to 100 mM and very good repetitively and stability were achieved that are comparable to those obtained with bulkier analytical instrumentation. Given the compact size, low weight, rapid response and low energy requirement of the electronic photometer developed here, this measurement system is suitable for potassium determination in the field.

**Keywords** Field portable instrument · Optical chemical sensor · Photometer · Ionophore-chromoionophore chemistry · Potassium determination · Water and beverage analysis

### Introduction

Dedicated analytical instruments have become more and more useful in a wide variety of situations related to environmental and process monitoring, medical diagnostics, explosives detection, chemical emergencies, among others. Currently, a very desirable property for these instruments is the possibility of obtaining results in situ and in real time. For this reason, the development of field-portable analytical instrumentation is one of the main technological trends in this area. In addition to developing hardware, researchers must develop methods and procedures for use in the field – what Overton designated “fieldable” – [1, 2], along with the appropriate sampling methods.

This report focuses on analysis by radiation absorption measurement with disposable sensors processed by optoelectronic instrumentation. We present a field-portable photometer which performs real-time analysis and is portable. This instrument incorporates advances in three complementary and interrelated instrumental aspects: (1) the recognition element; (2) the signal processing electronics design; (3) the measurement procedure applied.

Light-emitting diodes (LEDs) have been widely studied and applied to these kinds of instruments [3, 4] as quasi-monochromatic light sources for sensor exciting and solid state photodetectors (PD) for absorbance measurements. When supported with the appropriate bias and support circuits, the low energy consumption, robust and compact designs, stability and sensitivity of these optoelectronic devices have shown them to be suitable for the desired analytical accuracy. At the same time, low-cost but powerful microcontrollers are being included as control processing units in many types of portable and hand-held

A. Palma · J. M. Ortigosa-Moreno · M. A. Carvajal  
Department of Electronics and Computer Technology,  
Campus Fuentenuueva, Faculty of Sciences,  
University of Granada,  
18071 Granada, Spain

A. Lapresta-Fernández · M. D. Fernández-Ramos ·  
L. F. Capitán-Vallvey (✉)  
Solid Phase Spectrometry Research Group,  
Department of Analytical Chemistry, Campus Fuentenuueva,  
Faculty of Sciences, University of Granada,  
18071 Granada, Spain  
e-mail: lcapitan@ugr.es

instrumentation [5–10]. These electronic circuits can be programmed with the measurement algorithms and the calibration function needed for full instrument operation, with the numeric result appearing in a screen at the end of the measurement process. For many applications, external personal computer data processing can be omitted using this compact solution. Their internal memory, versatility of programming, possibility of multiple interfaces and low power function make it possible to design pocket instruments with low energy requirements that are satisfied with small batteries. Those typical bulky elements traditionally included in laboratory analytical instrumentation, such as incandescent lights, photomultiplier tubes and computers, can be replaced by LEDs, PDs and micro-controllers in some applications in the intermediate accuracy and resolution ranges.

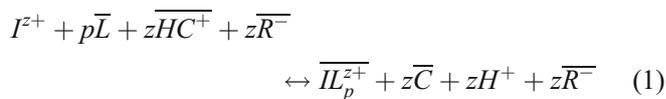
The progress in measurement procedures has closely paralleled that in hardware development. These include double-beam techniques for optical interference, light-source modulation with lock-in detection for signal-to-noise ratio improvement [11, 12] and even fast-Fourier-transformation signal processing [13]. Multivariate calibration methods have been also used with multisensor instruments [14, 15]. The sensor's analytical parameters and the measurement conditions in the instrument are also important in this context.

Disposable sensors can be considered to be a kind of chemical analysis test method for obtaining chemical information rapidly, simply and cheaply. There are very different approaches to this type of device – depending on the different field in which they are to be used; however, all of the approaches share the need for rapid analytical systems that are independent from the usual requirements for analysis. Among the desirable advantages of disposable sensors are their short analysis time, ease of handling, low purchase and running costs, on-site results, lack of use of liquid reagents, absence of skilled personnel, lack of need to transport samples to the laboratory or store large volumes of samples, no need for waste disposal and their environmental friendliness [16].

#### Foundation of the detector response

With respect to the foundation of the sensor response, different recognition strategies have been devised for ions, of which host-guest interactions are notable, such as those used in carrier-based bulk sensors. The sensors based on a second component work on the basis of an ion exchange or co-extraction between a complete organic phase of a plasticized PVC membrane and the aqueous phase, and they respond to the activity of target ion [17, 18]. In the case of cationic analytes such as  $I^{z+}$ , the principle of the operation is cation-exchange, and the plasticized membrane contains a selective ionophore L, a hydrogen ion-selective chromoionophore C and, usually, an alkaline salt

of a highly lipophilic anion  $R^-$  incorporated for reasons of electroneutrality.



The ion activities ratio  $a_{I^{z+}}/a_{H^+}^z$  in aqueous phase is related to the overall equilibrium constant  $K_e^{IL_p}$  and degree of protonation of chromoionophore  $1-\alpha$  through an implicit sigmoidal response function:

$$a_{I^{z+}} = \frac{1}{K_e^{IL_p}} \left( \frac{a_{H^+}\alpha}{1-\alpha} \right)^z \frac{C_R - (1-\alpha)C_C}{z(C_L - \frac{p}{z}(C_R - (1-\alpha)C_C))^p} \quad (2)$$

where  $C_L$ ,  $C_C$  and  $C_R$  are the analytical concentrations of the ionophore, chromoionophore and lipophilic anion, respectively.

The analytical parameter coming from the change in the optical properties of the bulk sensors is the degree of protonation  $1-\alpha$ , defined as the ratio of protonated chromoionophore to its analytical concentration  $C_C$ , the latter of which is obtained from absorbance [19], reflectance [20] or fluorescence [21] measurements. Thus, in the case of absorbance measurements, where  $A$  is the absorbance of the chromoionophore in a membrane for a given equilibrium, and  $A_{HC^+}$  and  $A_C$  are the absorbance values at the fully protonated and deprotonated chromoionophore species:

$$1-\alpha = \frac{[HC]}{[C]_0} = \frac{A - A_C}{A_{HC^+} - A_C} \quad (3)$$

Alternatively, other analytical parameters have been used for calibration purposes instead of the normalized value  $1-\alpha$ ; these include the direct absorbance value [22], reflectance [23] and fluorescence intensity [24].

Normalized or relative signals are more convenient for sensor measurements and calibration, although they do involve measuring optical signals related to fully protonated and deprotonated species in addition to measuring the signal coming from the sample or standard. In the case of the disposable format for this type of sensor, the use of normalized signals is cumbersome and requires obtaining different measurements with the same sensor before equilibration with different solutions – HCl; NaOH for fully protonated and deprotonated chromoionophore optical signals; sample or standard in buffer for the corresponding intermediate signal. An easier form of measurement is needed.

In this study, we have developed a field-portable photometer where all of the components – from the disposable sensor to the signal processing electronics – have been designed with the aim of applying a novel measurement procedure to potassium determination in natural waters and beverages simply and with enough

sensitivity and repeatability for in situ measurement at low cost. We used a disposable sensor for potassium determination previously developed and characterized by us [25]. This instrument and technique can be directly extended to the determination of other chemical species.

## Experimental

### Reagents

A potassium chloride (KCl) stock solution (1.000 M) was prepared in water by exactly weighing analytical reagent grade dry KCl (Aldrich, Steinheim, Germany). Solutions of lower concentration were prepared by dilution with water. A Tris(hydroxymethyl) aminomethane 0.1 M buffer solution (pH 9.0) was prepared from Tris and HCl supplied by Sigma (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain).

For preparing the potassium-sensitive films, we purchased high-molecular-weight poly (vinyl chloride) (PVC), dibenzo-18-crown-6-ether, tributylphosphate (TBP) and tetrahydrofuran (THF) from Sigma and potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate (TCPB) from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). The chromoionophore N,N-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5H-benzo[a]phenoxazine-9-amine was synthesized, purified and characterized by us according to Morf et al. [26]. Sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support. All chemicals used were of analytical-reagent grade. Reverse-osmosis type quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore, Bedford, Mass.) was used throughout.

### Membrane preparation

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique [19]. Mixtures for the preparation of the disposable sensing films were made from a batch of PVC [26.0 mg (28.0 wt%)], TBP [63.0 mg (68.5 wt%)], dibenzo-18-crown-6-ether [0.8 mg (0.87 wt%)], chromoionophore [1.3 mg (1.4 wt %)] and TCPB [1.1 mg (1.2 wt %)] dissolved in 1.0 ml of freshly distilled THF. The disposable sensors were cast by placing 20  $\mu$ L of the cocktail on a 14 $\times$ 40 $\times$ 0.5-mm-thick polyester sheet using a homemade spin-coater rotating at 180 rpm. After spinning for 30 s, the membrane was removed from the spin coater and dried in a dryer with a saturated THF atmosphere for few minutes at room temperature. The membranes prepared in this way were ready to use with the conventional measurement procedure.

Additionally, we prepared other types of membranes with an extra treatment consisting of immersion for 5 min with a  $10^{-2}$  M HCl solution in order to change the color to that of their acidic form. Sensors prepared in this way had a lifetime of at least 2 months when stored in darkness and under nitrogen atmosphere.

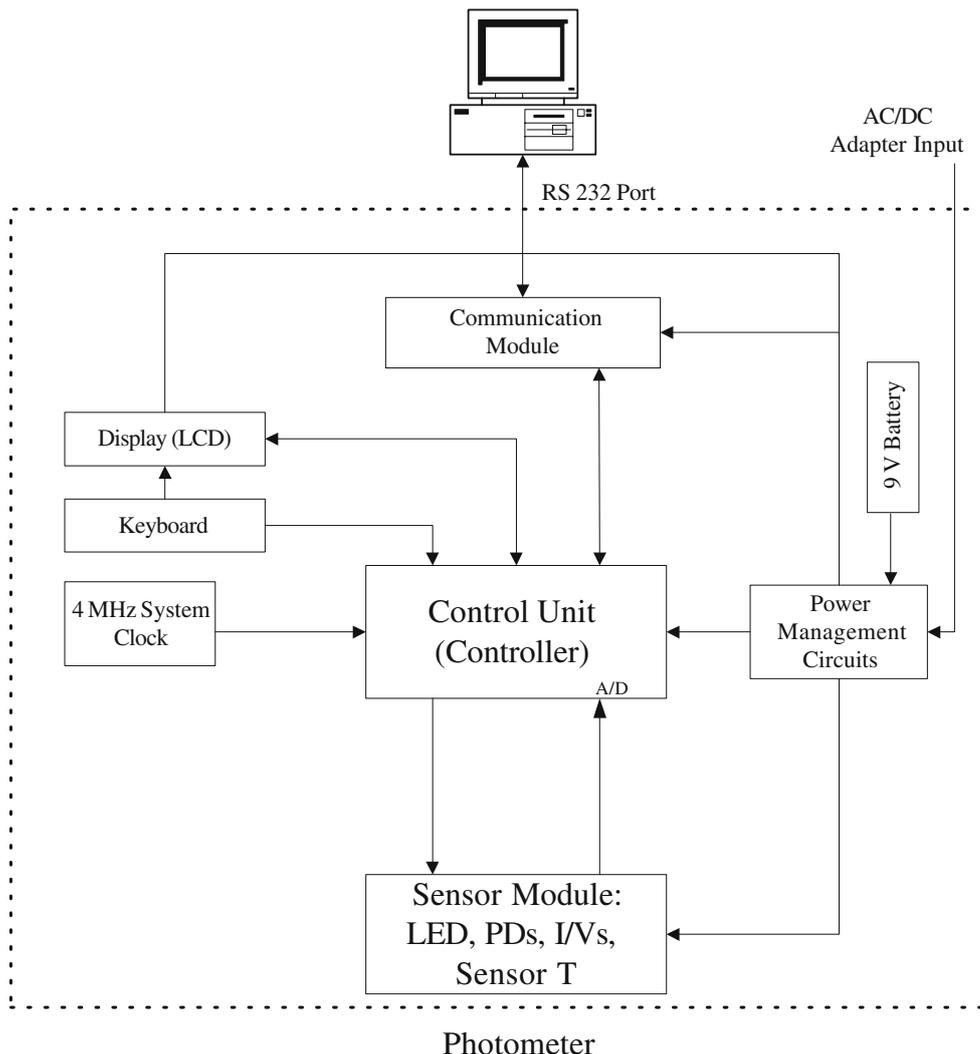
### Measurement system description

Our goals for the measurement instrument design were to obtain: (1) high optical and electrical noise immunity; (2) simple electronics; (3) low power operation; (4) a compact and reliable instrument for analyte determination in the field, outside of the analytical laboratory. To do this, the transparent disposable membrane described above was inserted into the slot of the portable electronic instrument. Our design is based on a low-cost microcontroller as a control unit. This microcontroller controls the excitation and detection of the optical signals, includes the algorithm for signal processing and controls all of the instrument interfaces, such as a display, keyboard and a serial port for computer communication for ease in design and calibration processes. In addition, a sleep mode function was programmed for energy saving. The developed instrument is hand-held, and the analyte concentration is directly read from the display. The instrument has electronic circuitry for power management from a standard 9 V battery or from a standard a.c./d.c. adapter. The dimensions and weight are 134 $\times$ 135 $\times$ 45 mm and 440 g (without battery), respectively. In Fig. 1, the functional block diagram of the electronic system is displayed with a clear depiction of its different modules: sensor module (including the conditioning circuits), clock system, microcontroller, power management circuits and interfaces.

In the sensor module, based on a single-beam measurement channel, the disposable membrane is optically illuminated by a red LED with an emission maximum at 660 nm. As Fig. 2 shows, to improve the light intensity stability, we biased the LED with a negative feedback circuit [27]. The incident light from the LED is split in two beams by a beam splitter. With 10% of the total intensity, one beam is directly collected by a photodetector and a current-voltage converter controls the LED bias in a negative feedback loop. The other 90% of the incident intensity illuminates the inserted membrane. The light intensity transmitted by the disposable sensor is collected by another photodiode and analogue processed by another current-voltage converter. The resulting voltage is converted to a digital word by the 10-bit analog-to-digital converter embedded in the microcontroller and then digitally processed.

Additional attention was given to the thermal drift and stability of the photometer. Here, a voltage reference with a very low thermal coefficient was included in the LED polarization circuitry in order to minimize the instrument thermal drift. In all cases, a temperature sensor with digital output was included for thermal monitoring for subsequent correction of the temperature influence on the instrument response. Temperature during the measurement is also displayed in the prototype display. This point will be analyzed extensively in the [Results and Discussion](#) section below. In addition, to prevent transient effects when the LED switches on, the light source turns on 10 ms before the acquisition process. Then, each final transmittance result is calculated by averaging 1024 measurements for a better signal-to-noise ratio, resulting in a total acquisition time of 1 s.

**Fig. 1** Functional block diagram of the portable photometer



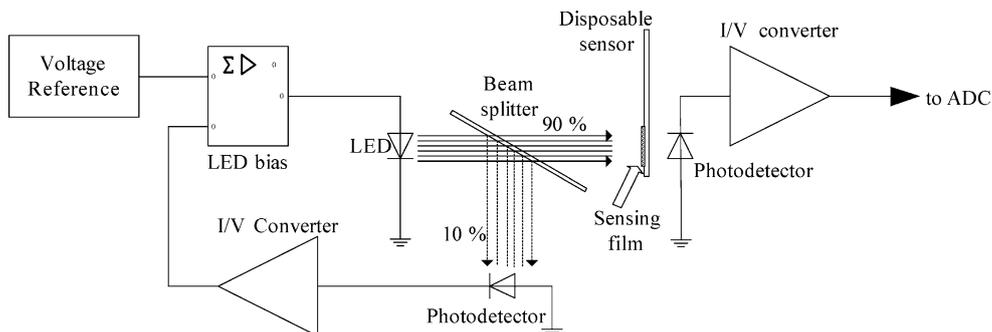
**Measurement conditions**

The response of the disposable sensors was evaluated by adding 8 mL of test solution to a polyethylene plastic tube together with 2 mL of 0.1 M pH 9.0 Tris buffer solution. The disposable sensor was then introduced for 5 min into the tube without shaking. Following equilibration, the membrane was pulled out of the solution and wiped to remove any solution droplets. It was then inserted into the slot of the portable photometer.

To obtain the absorbance value  $A$  ( $\log I_0/I$ ) in the portable photometer, the following method was applied to each individual membrane. The incident intensity  $I_0$  was obtained measuring a Mylar sheet, and the transmitted intensity  $I$  was measured with the prepared disposable sensor. All measurements were thermally corrected by monitoring the ambient temperature with the photometer's built-in temperature sensor.

In order to validate the measurement procedure and to evaluate the performance of the portable instrument, the potassium-disposable membranes were also measured

**Fig. 2** Schematic of the module sensor showing the complete analogue processing



using a Hewlett Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Norwalk, Conn.) equipped with a 44-mm-high, 12-mm-wide homemade membrane cell holder made of a matte-black-painted iron block [28] and interfaced to a computer. The background absorbance was corrected by measuring against a Mylar polyester strip. Additionally, the absorbance values at 660 nm were corrected by subtracting the absorbance at a long wavelength (800 nm) where it does not absorb the chromoionophore, as is usual with this type of disposable sensors [16].

## Results and discussion

This section discusses the analytical parameters that offer the best results for the use of the portable photometer in situ with very little analysis time. The instrumental characterization and its application to different liquids were carried out.

### Measurement procedure

To simplify the analytical methodology and shorten the analysis time – with respect to eliminating some of the calibrating solutions (HCl, NaOH or buffer) needed for the estimation of the usual analytical parameter  $1-\alpha$  – we investigated two methods: (1) maintaining the normalized absorbance  $1-\alpha$  as analytical parameter but considering it to be a constant for some of the absorbance terms needed for its calculation in Eq. (3); (2) using an absorbance ratio  $A_{\text{standard}}/A_{\text{reference}}$  as analytical parameter. The latter refers to the ratio between the absorbance of the membrane equilibrated with sample or standard potassium solution,  $A_{\text{standard}}$ , and the absorbance of the

membrane equilibrated with a reference solution,  $A_{\text{reference}}$ , namely NaOH, HCl or buffer solutions.

In the first case –  $1-\alpha$  as analytical parameter – we studied how its value is affected when some of the absorbance terms are constant. The  $\alpha$  value used in this case is an effective normalized absorbance value  $\alpha_{\text{eff}}$  defined as:

$$1 - \alpha_{\text{eff}} = \frac{A - A_{\text{NaOH}}}{A_{\text{buffer}} - A_{\text{NaOH}}} \quad (4)$$

where  $A_{\text{NaOH}}$  and  $A_{\text{buffer}}$  are the absorbance values measured from the equilibrated sensor with  $10^{-2}$  M NaOH and pH 9 buffer solution, respectively. The need to use the  $\alpha_{\text{eff}}$  parameter instead of  $\alpha$  is due to the fact that the used chromoionophore cannot be fully protonated ( $1-\alpha \cong 0.9$ ) at the working pH (9.0) due to its  $\text{pK}_a$  value [25]. Thus, we used the membrane absorbance in the buffer instead of the absorbance in the HCl solution,  $A_{\text{HCl}}$ , as a measurement of the fully protonated form of chromoionophore with the aim of expanding this effective normalized absorbance value between 0 and 1.

As such, we studied three possibilities: (1) having  $A_{\text{buffer}}$  as a constant; (2) having  $A_{\text{NaOH}}$  as a constant; (3) having both of them constant. Thirty different disposable sensors were prepared and measured with both measurement systems to obtain constant absorbance values by averaging them with: (1) the diode spectrophotometer [ $A_{\text{buffer}}=1.310$ , relative standard deviation (RSD) = 4.30%;  $A_{\text{NaOH}}=0.345$ , 3.64%] and (2) the portable photometer ( $A_{\text{buffer}}=1.013$ , RSD = 3.61%;  $A_{\text{NaOH}}=0.307$ , 3.53%). Then, each membrane was tested at seven different potassium concentration levels:  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $1 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$  and 0.1 M. Table 1 shows the  $1-\alpha_{\text{eff}}$  average values along with

**Table 1** Comparison of  $1-\alpha_{\text{eff}}$  as an analytical parameter obtained with the portable photometer and diode spectrophotometer

[K <sup>+</sup> ] (M)	Reference spectrophotometer		Portable photometer		Reference spectrophotometer		Portable photometer	
	Individual A		Average $A_{\text{buffer}}$		Average $A_{\text{buffer}}$ and $A_{\text{NaOH}}$		Average $A_{\text{buffer}}$ and $A_{\text{NaOH}}$	
	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)
$10^{-7}$	0.97	3.16	0.99	2.54	0.97	5.87	1.00	5.74
$10^{-6}$	0.95	2.97	0.97	2.92	0.95	5.95	0.98	4.89
$10^{-5}$	0.91	4.34	0.94	3.74	0.91	7.17	0.94	6.46
$10^{-4}$	0.69	4.75	0.72	4.44	0.69	7.44	0.72	7.20
$10^{-3}$	0.34	5.50	0.35	4.33	0.34	7.11	0.35	7.87
$10^{-2}$	0.10	8.45	0.10	6.93	0.10	8.92	0.10	9.47
$10^{-1}$	0.01	51.32	0.01	37.31	0.01	52.41	0.01	37.15
[K <sup>+</sup> ] (M)	Average $A_{\text{NaOH}}$		Average $A_{\text{buffer}}$ and $A_{\text{NaOH}}$		Average $A_{\text{buffer}}$ and $A_{\text{NaOH}}$		Average $A_{\text{buffer}}$ and $A_{\text{NaOH}}$	
	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD (%)
$10^{-7}$	0.97	3.16	0.99	2.54	0.97	5.90	0.99	5.81
$10^{-6}$	0.95	2.97	0.97	2.94	0.95	6.01	0.98	4.93
$10^{-5}$	0.91	4.37	0.93	3.77	0.91	7.26	0.93	6.58
$10^{-4}$	0.69	4.81	0.72	4.61	0.69	7.70	0.72	7.60
$10^{-3}$	0.34	5.63	0.35	5.54	0.34	8.08	0.35	9.54
$10^{-2}$	0.10	15.00	0.10	16.56	0.10	16.82	0.10	19.43
$10^{-1}$	0.01	105.48	0.01	151.36	0.01	103.49	0.01	142.33

**Table 2** Comparison between different absorbance ratios used as the analytical parameter obtained with the portable photometer and diode spectrophotometer

[K <sup>+</sup> ] (M)	Reference spectrophotometer		Portable photometer		Reference spectrophotometer		Portable photometer		Reference spectrophotometer		Portable photometer	
	$A/A_{\text{HCl}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{HCl}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{buffer}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{buffer}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{NaOH}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{NaOH}}$	RSD (%)
10 <sup>-7</sup>	0.93	3.98	0.94	1.60	0.98	2.33	1.00	1.76	3.73	4.35	3.29	3.54
10 <sup>-6</sup>	0.91	3.47	0.93	1.75	0.96	2.17	0.98	1.94	3.67	4.32	3.23	3.38
10 <sup>-5</sup>	0.88	4.45	0.90	2.19	0.93	3.12	0.95	2.56	3.54	4.62	3.15	3.49
10 <sup>-4</sup>	0.73	4.05	0.76	2.06	0.77	3.17	0.81	2.78	2.93	4.88	2.66	3.94
10 <sup>-3</sup>	0.48	4.07	0.52	1.88	0.51	3.08	0.55	1.89	1.95	3.82	1.81	3.22
10 <sup>-2</sup>	0.32	3.88	0.36	2.53	0.34	3.76	0.38	2.54	1.28	1.96	1.24	1.69
10 <sup>-1</sup>	0.26	4.49	0.29	3.16	0.27	4.29	0.31	2.99	1.04	2.05	1.02	0.93

the RSD for each concentration level obtained in the four cases studied (cases 1–3 above plus that obtained with each individual value of  $A_{\text{buffer}}$ ,  $A_{\text{NaOH}}$  and  $A_{\text{standard}}$ . For measurements with the diode spectrophotometer, the precision increases by an average of 2% when the background, measured at 800 nm, is subtracted from all cases.

Generally speaking, we can see that the  $1-\alpha_{\text{eff}}$  average values obtained using all of the tested schemes are very similar, although there are considerable differences with respect to the precision. In all cases, the dispersion of  $1-\alpha_{\text{eff}}$  values increases with potassium concentration. From the three different possibilities studied, the best results were obtained using the procedure of with a constant value of  $A_{\text{NaOH}}$ , both for the portable photometer and the diode spectrophotometer.

The second method studied with the aim of simplifying the experimental procedure was to use absorbance ratios as analytical parameters instead of  $1-\alpha_{\text{eff}}$ . For this, we tested three different absorbance ratios: (1)  $A_{\text{standard}}/A_{\text{HCl}}$ ; (2)  $A_{\text{standard}}/A_{\text{buffer}}$ ; (3)  $A_{\text{standard}}/A_{\text{NaOH}}$ . In all cases, two possibilities were studied: using the individual absorbance value for each disposable sensor (Table 2) and using average values (Table 3) coming from 30 different disposable sensors for  $A_{\text{HCl}}$ ,  $A_{\text{buffer}}$  and  $A_{\text{NaOH}}$ .

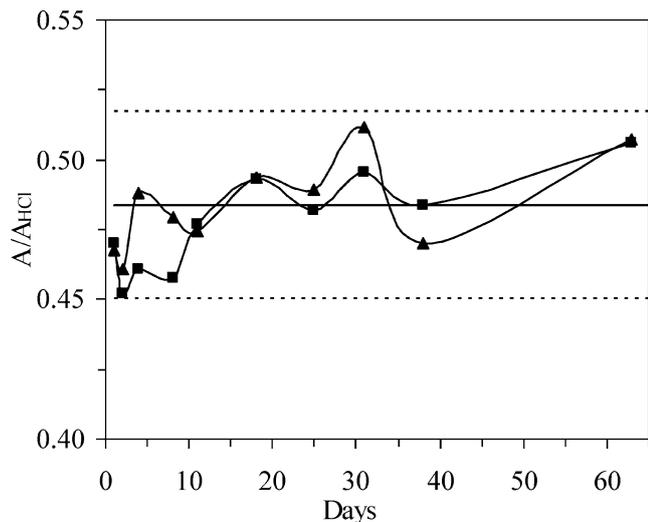
As can be expected, in terms of precision, the use of average values of absorbance for sensors in buffer, acidic and basic solutions were worse than the use of individual values. Comparing results obtained using individual values,

we can observe that the use of  $A_{\text{HCl}}$  as a reference value gives better results than any other reference values ( $A_{\text{buffer}}$  and  $A_{\text{NaOH}}$ ) for both portable and desktop instruments. When comparing the results obtained from the best way to calculate  $1-\alpha_{\text{eff}}$  (Table 2) and  $A_{\text{standard}}/A_{\text{reference}}$  (Table 3), we can conclude that the use of the absorbance ratio  $A_{\text{standard}}/A_{\text{HCl}}$  as an analytical parameter offers the best results in term of precision in the whole concentration range studied and especially at a high potassium concentration. Consequently, we propose the absorbance ratio  $A_{\text{standard}}/A_{\text{HCl}}$  as the analytical parameter to be used with this portable instrument.

This form of measurement requires equilibrating the disposable sensor with a 10<sup>-2</sup> M HCl solution and measuring the absorbance and then equilibrating the disposable sensor with the potassium standard solution or sample. In order to simplify the procedure, we used a disposable sensor pretreated with a 10<sup>-2</sup> M HCl solution to change the chromoionophore to its fully protonated form (HC<sup>+</sup>). In this way, we eliminated the need for equilibration with HCl, with only the direct absorbance measurement prior to equilibration with potassium solution being necessary. This procedure can be used whenever the membrane is stable enough. To demonstrate its stability, 20 identical membranes were prepared and kept in darkness under nitrogen atmosphere. Of these, ten were treated with HCl and the other ten were used as prepared. We periodically tested one membrane of each type against a 10<sup>-3</sup> M solution of potassium. The results of this test, shown in Fig. 3, demonstrate that the disposable mem-

**Table 3** Comparison between the different absorbance ratios used as an analytical parameter using average values of  $A_{\text{HCl}}$ ,  $A_{\text{buffer}}$  and  $A_{\text{NaOH}}$  obtained with the portable photometer and diode spectrophotometer

[K <sup>+</sup> ]M	Reference spectrophotometer		Portable photometer		Reference spectrophotometer		Portable photometer		Reference spectrophotometer		Portable photometer	
	$A/A_{\text{HCl}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{HCl}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{buffer}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{buffer}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{NaOH}}$	RSD (%)	$A/A_{\text{NaOH}}$	RSD (%)
10 <sup>-7</sup>	0.93	4.32	0.94	4.04	0.98	4.32	1.00	4.04	3.73	4.32	3.29	4.04
10 <sup>-6</sup>	0.91	4.37	0.93	4.08	0.96	4.37	0.98	4.08	3.67	4.37	3.23	4.08
10 <sup>-5</sup>	0.88	5.21	0.90	4.49	0.93	5.21	0.95	4.49	3.54	5.21	3.15	4.49
10 <sup>-4</sup>	0.73	5.07	0.76	4.74	0.77	5.07	0.81	4.74	2.93	5.07	2.66	4.74
10 <sup>-3</sup>	0.48	3.92	0.52	4.20	0.51	3.92	0.55	4.20	1.95	3.92	1.81	4.20
10 <sup>-2</sup>	0.32	3.66	0.36	3.73	0.34	3.66	0.38	3.73	1.28	3.66	1.24	3.73
10 <sup>-1</sup>	0.26	3.94	0.29	3.39	0.27	3.94	0.31	3.39	1.04	3.94	1.02	3.39



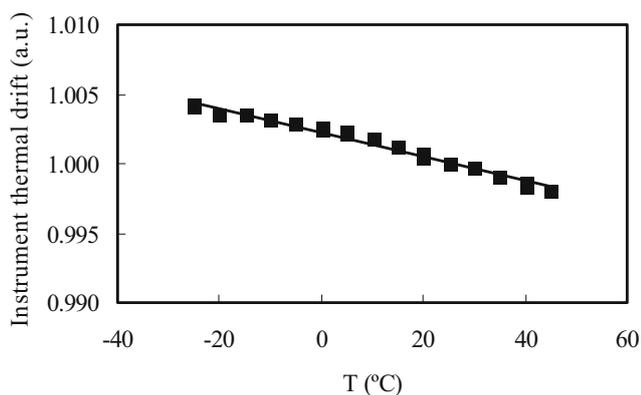
**Fig. 3** Membrane stability tested measured against a  $10^{-3}$  M potassium solution. *Dotted lines* Interval confidence at  $\pm t \cdot s$  ( $n=15$ ). *Filled triangle* Disposable sensors previously treated with HCl, *filled square* disposable sensors without prior treatment

branes are stable for at least 63 days under our storage conditions and that both types of membranes have the same lifetime.

To summarize, the devised absorbance measurement procedure consists of a two steps: (1) a direct absorbance measurement of the disposable membrane without any equilibration and (2) an absorbance measurement following equilibration with a standard or sample solution. The hand-held instrument directly produces either the absorbance ratio used as the analytical parameter or the potassium concentration after programming the calibration function for the signal processing into the microcontroller.

#### Portable measurement system characterization

Figure 4 shows the influence of temperature on the photometer response without the disposable sensor. The curve is represented with normalized data at a temperature



**Fig. 4** Thermal drift of the portable instrument. *Filled squares* represent experimental data and the *line* is the linear fit

of 25 °C. As expected, the dominant effect is due to decreasing LED light intensity as the temperature increases. However, this effect is greatly reduced by the bias circuit described in Fig. 2. Experimental data from Fig. 4 are fitted to a linear dependence ( $r^2=0.983$ ) with a thermal coefficient below  $-90$  ppm. Despite the very low thermal drift, this linear dependence was programmed in the microcontroller to correct the final result.

The instrumental stability has been also characterized. In an experiment involving making one absorbance measurement per minute per day, we were unable to distinguish the time drift from the quantization noise of the a.c./d.c. converter of the microcontroller. Therefore, the optoelectronics time drift is below 0.05% per day.

The relationship between the analytical parameter and potassium concentration is of the sigmoidal type. As a calibration function, we tested Eq. (5):

$$\frac{A}{A_{HCl}} = a_2 + \frac{a_2 - a_1}{1 + \exp\left(\frac{([K^+] - a_0)}{a_3}\right)} \quad (5)$$

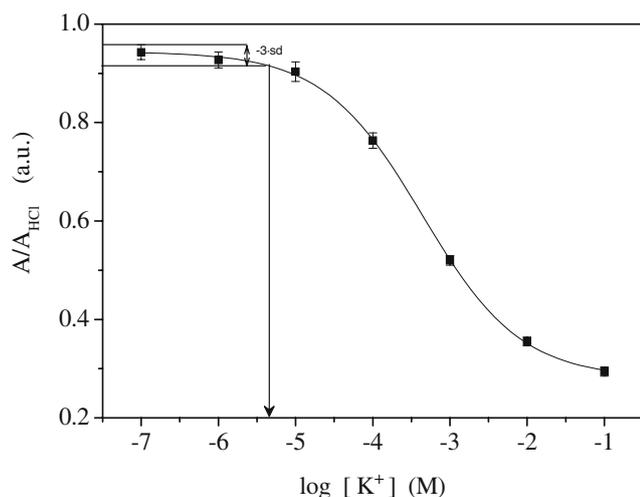
where  $a_0$  to  $a_3$  are adjusting coefficients.

Using 30 disposable membranes analyzed at seven potassium concentration levels we obtained the function indicated in Table 4, which shows an excellent adjustment ( $r^2=0.9998$ ). This calibration function (Fig. 5) was programmed into the microcontroller of the portable photometer to obtain the potassium concentration directly. The interpolation of the experimental analytical parameter

**Table 4** Analytical and technical specifications of the portable photometer

Parameter	Value (S)
$a_2$	0.2767; 0.01408
$a_1$	0.9428; 0.01609
$a_0$	-3.4145; 0.05936
$a_3$	0.6586; 0.06625
$r^2$	0.9998
$\chi^2/\text{DoF}$	0.12443
Analytical range	0.005–100 mM
Detection limit	0.005 mM
RSD <sup>a</sup>	1·10 <sup>-4</sup> M 1.6%
	1·10 <sup>-3</sup> M 1.1%
	1·10 <sup>-2</sup> M 2.1%
Equilibration time	180 s
Analysis time	1 s
Sensor lifetime	2 months
Input power	Battery: 9 V PP3 12 V a.c./d.c. adapter
Temperature range	-20 / +45 °C
Thermal drift	-90 ppm
Time drift	<0.05 %/day
Dimensions (L×H×W)	135×134×45 mm
Weight	440 g (without battery)

<sup>a</sup>Expressed as  $\log[K^+]$

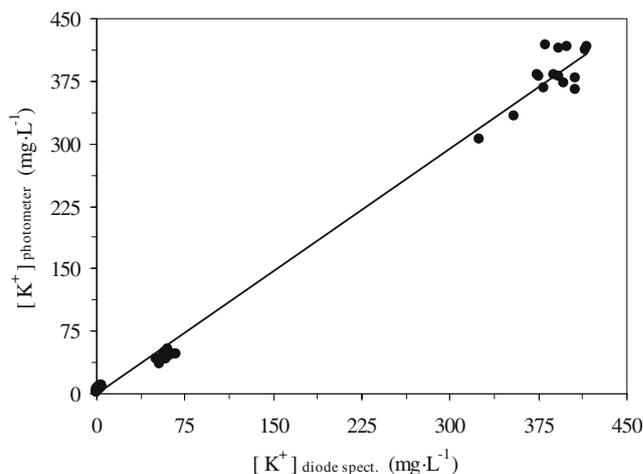


**Fig. 5** Sigmoidal calibration function showing the detection limit

into the sigmoidal function produces a wide measurement range ( $5 \cdot 10^{-6}$  to 0.1 M).

The precision of the proposed instrumental procedure was evaluated at three concentration levels ( $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  M) using 12 different disposable sensors to obtain relative standard deviations between 1 and 2% when expressed as the logarithm of the potassium concentration (Table 4). In order to demonstrate the trueness of the results given by the proposed measurement system, we prepared an experiment with 15 different disposable sensors working at four potassium concentration levels ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$  M). The sensors were measured both with the portable photometer and with the diode spectrophotometer, using each instrumental system's own analytical parameter and calibration function. The results, expressed in milligrams per litre, from the portable photometer were plotted against those from the diode spectrophotometer, expecting a unity slope straight line when fitted by the least-squares method ( $y=0.9849x-1.0901$ ;  $r^2=0.9939$ ) (see Fig. 6). This regression line was checked simultaneously – using a *F*-test [29], that the slope did not differ from the unity and the intercept did not differ from zero. The results obtained show no statistical differences between both sets ( $F_{\text{cal}}: 1.47$ ;  $F_{\text{theo}}: 1.55$ ;  $\alpha: 0.05$ ;  $df: 58$ ), thereby indicating the trueness of the studied procedure compared with that of the potassium procedure based on the same recognition scheme and measured with a diode spectrophotometer studied and characterized earlier [25].

To establish the detection limit of the procedure and to take into consideration that the calibration function is a sigmoidal curve (see Fig. 5), we calculated the standard deviation of the analytical signal ( $A/A_{\text{HCl}}$ ) using 58 membranes equilibrated with buffer. As the buffer gave us the highest analytical signal, the average  $A_{\text{buffer}}/A_{\text{HCl}}$  value with the standard deviation subtracted three times made it possible to calculate the detection limit of the procedure, obtaining a value of  $5 \mu\text{M}$  or  $0.19 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . The upper limit of the measurement range is 100 mM, the highest concentra-



**Fig. 6** Trueness of instrumental procedure from linear regression of results from portable photometer plotted against a diode spectrophotometer considered as a reference procedure. Filled circles represent experimental data, line is the linear fit

tion tested. Table 4 summarizes the portable photometer specifications. A photograph of the instrument, showing how introduce the disposable sensor, is displayed in Fig. 7.



**Fig. 7** Photograph of the portable instrument showing how to introduce the disposable sensor

**Table 5** Determination of potassium in different samples by proposed and reference procedures

Sample	Portable photometer		Atomic absorption spectrometry (AAS)		$P_{\text{val}}$ (%)
	$K^+$ (mM)	Standard deviation	$K^+$ (mM)	Standard deviation	
Mineral water (Vichy Catalán)	1.5	0.61	1.6	0.020	84.2
Mineral water (Mondariz)	0.14	0.10	0.13	0.00084	78.4
Mineral water (Solán de Cabras)	0.025	0.016	0.032	0.00036	27.7
Snow water (Sierra Nevada, Granada)	0.0073	0.0013	0.0094	0.00019	5.3
Well water (Otura, Granada)	0.051	0.0022	0.042	0.0090	36.0
Tap water (Almuñecar, Granada)	0.043	0.0011	0.058	0.013	6.4
Sea water (Almuñecar, Granada)	24	5.9	24	0.10	98.6
Tomato juice	79	8.7	73	0.39	24.6
Fruit juice	28	6.4	33	0.14	22.4
Cider	23	2.3	23	0.31	64.5

### Validation and applications

The instrument and procedure presented here were applied to the determination of potassium in real samples in order to assess its usefulness. To do this, we selected samples of waters coming from diverse provenance (tap, well, stream, snow and sea), fruit juices and beverages whose potassium content covered the dynamic range. Table 5 shows the results obtained using the disposable sensor procedures described here for potassium compared to an atomic absorption spectrometry method used as a reference method. Table 5 also includes the mean values from three determinations of each sample and the standard deviation of these measurements as well as the probability value ( $P_{\text{val}}$ ) of the test used for the comparison of the measurements obtained from both methods.

In addition, and considering the wide concentration range analyzed in real samples, the root mean squared relative error (RMSRE) was selected as an appropriate feature for evaluating the predictive capacity of the proposed calibration in relation to the reference values. The RMSRE is calculated from the expression

$$RMSRE = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left( \frac{value_{estimated} - value_{reference}}{value_{reference}} \right)^2} \quad (6)$$

where N refers to the number of samples in the test set. The obtained value from the data set collected in Table 5 is 0.20. In conclusion, the results obtained for both methods agree, which corroborates the validity of the proposed procedure with the portable photometer described here.

### Conclusions

We report here the development of a portable photometer and a measurement procedure for disposable sensors. The instrument carries out absorbance measurements of the colour changes in an ionophore-cromoionophore based disposable sensor for potassium determination in water and

beverages developed by our research team. The electronics is based on commercial and inexpensive solid state devices controlled by a microcontroller, thereby making the instrument easy to use with only low energy requirements that can be obtained from small batteries. The negative feedback for LED bias in the circuitry design and thermal drift correction were included to improve system stability.

To simplify the analytical methodology and shorten the analysis time with respect to eliminating some calibrating solutions (HCl, NaOH or buffer), we used an absorbance ratio, namely  $A_{\text{standard}}/A_{\text{reference}}$ , as the analytical parameter. The devised absorbance measurement procedure consists of: (1) a direct absorbance measurement of the disposable membrane without any equilibration and (2) an absorbance measurement after following equilibration with a standard or sample solution. The hand-held instrument directly gives either the absorbance ratio used as the analytical parameter or the potassium concentration following programming of the calibration function for the signal processing into the microcontroller. The sigmoidal-type calibration function produced a wide measurement range from  $5 \cdot 10^{-6}$  M to 0.1 M with a relative standard deviation between 1 and 2% expressed as the logarithm of the potassium concentration.

The developed photometer and measurement procedure were applied to the determination of potassium in different samples. The good results were validated against a reference analytical procedure.

**Acknowledgements** We acknowledge financial support from the Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior (Spain) from Projects CTQ2005-09060-CO2-01 and CTQ2005-09060-CO2-02).

### References

- Overton EB, Stewart M, Carney KR (1995) J Hazard Mat 43:77–89
- Overton EB, Ehrmann U, Dharmasena HP, Carney KR (1996) Field Anal Chem Tech 1:87–92
- Dasgupta PK, Bellamy HS, Liu H, Lopez JL, Loree EL, Morris K, Petersen K, Mir KA (1993) Talanta 40:53–74

4. Zukauskas A, Shur MS, Gaska R (2004) NATO Science Series II: Math Physics Chem 144:127–142
5. Hauser PC (1995) Meas Sci Technol 6:1081–1085
6. Lippitsch ME, Kieslinger D, Draxler S (1997) Sens Actuators B 38:96–102, 2-1
7. Malinen J, Kansakoski M, Rikola R, Eddison CG (1998) Sens Actuators B 51:220–226
8. Matias FAA, Vila MMDC, Tubino M (2003) Sens Actuators B 88:60–66
9. Lau KT, Yerazunis WS, Shepherd RL, Diamond D (2006) Sens Actuators B 114:819–825, 26-4
10. Packman A, Nicholson J, Long M (2006) Patent EP 1069424 A2
11. Trettnak W, Kolle C, Reninger F, Dolezal C, O’Leary P (1996) Sens Actuators B 35–36:506–512
12. Trinkel M, Trettnak W, Kolle C (2000) Quim Anal 19:112–117
13. Shimazaki Y, Fujioka F, Iwatsuki M (1998) Field Anal Chem Tech 2:173–178
14. Hauser PC, Thusitha WTR (1997) Fresenius J Anal Chem 357:1056–1060
15. Fonseca A, Raimundo IM Jr (2004) Anal Chim Acta 522: 223–229
16. Capitán-Vallvey LF, Fernández-Ramos MD (2003) Solid-phase spectrometric assays 3 in Integrated Analytical Systems. Alegret, S.; Elsevier Science : Amsterdam
17. Bakker E, Bühlmann P, Pretsch E (1997) Chem Rev 97: 3083–3132
18. Johnson RD, Bachas LG (2003) Anal Bioanal Chem 376: 328–341
19. Seiler K, Simon W (1992) Anal Chim Acta 266:73–87
20. Narayanaswamy R, Sevilla F III (1986) Anal Chim Acta 189:365–369
21. Ceresa A, Quin Y, Peper S, Bakker E (2003) Anal Chem 75:133–140
22. Hisamoto H, Miyashita N, Watanabe K, Nakagawa E, Yamamoto N, Suzuki K (1995) Sens Actuators B 29:378–385
23. Vogel P, Thym D, Fritz M., Mosoiu D (1993) Patent US 5,211,914
24. Citterio D, Omagari M, Kawada T, Sasaki S, Suzuki Y, Suzuki K (2004) Anal Chim Acta 504:227–234
25. Capitán-Vallvey LF, Fernández Ramos MD, Al Natsheh M (2003) Sens Actuators B B88:217–222
26. Morf WE, Seiler K, Rusterholz B, Simon W (1990) Anal Chem 62:738–742
27. Dasgupta PK, Eom IY, Morris KJ, Li J (2003) Anal Chim Acta 500:337–364, 19-12
28. Capitán-Vallvey LF, Fernández-Ramos MD, Alvarez de Cienfuegos P, Santoyo-Gonzalez F (2003) Anal Chim Acta 481:139–148
29. Massart DL, Dijkstra A, Kaufman L (1978) Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures : a survey of statistical and mathematical techniques, Elsevier: Amsterdam

# Establishment of wide-range linear response curves in bulk optode sensors for cations based on ion exchange

L.F. Capitán-Vallvey\*, A. Lapresta-Fernández, M.D. Fernández-Ramos, L. Cuadros-Rodríguez

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, Campus Fuentenueva, University of Granada, Granada 18071, Spain*

Received 28 September 2005; accepted 31 October 2005

Available online 13 December 2005

## Abstract

A linear curve is obtained when a decimal logistic transformation is applied to the sigmoidal calibration curve of ion-selective bulk optodes for the determination of cations based on ionophore–chromoionophore chemistry. In this way, problems derived from the use of a sigmoidal shape calibration functions are solved and the linear dynamic range is increased. The method is easier to use and eliminates the need for prior treatment of the sample.

The influence of different parameters on the linearization of the theoretical model was studied: charge of the analyte, ionophore:chromoionophore ratio and complex stoichiometry, and the goodness of the linearization of the theoretical fit to experimental data for two experimental systems was checked. The procedure was applied to the determination of potassium and hardness using disposable sensors in different types of waters (tap, well, stream, rain, snow and sea), validating the results against a reference procedure. This new linear calibration proposed for cation determination increases the linear dynamic range up to 7–8 orders of magnitude. The main advantage is that it is possible to directly quantify samples with very different analyte contents in a fast and simple way.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Linearization; Cation determination; Disposable optical sensor; Ionophore–chromoionophore chemistry; Water analysis

## 1. Introduction

In 1982, Charlton et al. published a paper [1] on potassium determination in serum based on the use of ionophores in plasticized PVC membranes next to so-called reporter substances. This led to the beginning of a fruitful set of patents from Miles Inc. devoted to the analysis of electrolytes in serum mainly in test strip formats that made use of dry chemistry [2–5]. The outstanding study of the mechanism of procedures by Simon et al. [6,7] has made it possible to develop a large variety of bulk optode membranes since 1989.

In the case of bulk optode membranes for cations, the optical sensing is based on the ion exchange between the cationic analyte in solution, due to ionophore present in the lipophilic membrane and a reference cation, usually the hydrogen ion, also present in membrane as a complex with an acid–base indicator or chromoionophore. These membranes answer the ratio of activ-

ities of the cationic analyte to the activity of a reference cation (hydrogen ion); consequently, the measurement or fixation of pH makes it possible to determine analyte activity or concentration working at a constant ionic strength. Different chemical sensors for relevant cations have been designed and characterized [8], such as for sodium [9–11]; potassium [11–13]; calcium [14,15]; magnesium [16,17]; hardness [18]; mercury [19]; silver [20]; lead [21]; or copper [22], among others.

The sensing components can be implemented in different ways, such as fibre-optic probes [12]; active waveguide optodes [23]; flow sensors [24]; test strips or disposable sensors [25]; and microsphere-based optical sensors [26], which are examples for various practical purposes. However, the technical aspects of these sensors are different: Their foundations are also unique and they can be implemented in a widespread number of devices according to the need.

The characteristic response function of such sensors—analytical parameter versus logarithm of analyte activity—shows a sigmoidal shape as predicted by the theory [27]. This implies a problem for calibration purposes, since only the central zone of the sigmoid that can be assimilated to a straight

\* Corresponding author.

E-mail address: [lcapitan@ugr.es](mailto:lcapitan@ugr.es) (L.F. Capitán-Vallvey).

line is used as calibration function and part of the analytical information possessed by the whole dynamic range is lost.

The purpose of this paper is to linearize the mathematical relationship between the analytical parameter versus logarithm of the analyte activity in ion-selective bulk optodes in order to extend its measuring range, thus taking advantage of the whole response function.

The transformation of the non-linear relationship into a linear one is made using a logistic-type regression, a type of generalized linear model, which makes it possible to predict a discrete outcome from a set of variables that may be continuous, discrete, dichotomous, or a mix of any of these.

In the logit regression model, the predicted values for the response variable will never be  $\leq 0$  or  $\geq 1$ , regardless of the values of the independent variables. This is accomplished by applying the regression Eq. (1) which always produces predicted values in the range of 0–1

$$y = \frac{\exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)}{1 + \exp(b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n)} \quad (1)$$

If we consider a dependent variable  $y$  ranging from 0 to 1 (for example, a probability), we can transform (logit or logistic transformation) that variable  $y$  as:

$$y' = \ln \left( \frac{y}{1-y} \right) \quad (2)$$

Note that  $y'$  can theoretically assume any value between minus and plus infinity. Since the logit transform solves the issue of the 0/1 boundaries for the original dependent variable, we can use those logit-transformed values in an ordinary linear regression equation. Namely, if we perform the logit transformation on both sides of the logit regression equation, we obtain the standard linear multiple regression model of Eq. (3):

$$y' = (b_0 + b_1x_1 + \dots + b_nx_n) \quad (3)$$

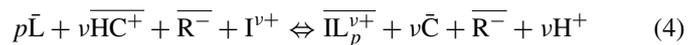
The logistic transformation has been used in analytical chemistry with different purposes, such as to linearize the sigmoidal shape response in immunoassay, both radioimmunoassay [28] and ELISA [29]. It has also been used for the evaluation of test kits [30] and dipstick tests [31] of dichotomous response. Additionally, logistic transformation has been applied to other analytical situations such as to model capacity factors as a function of the pH in HPLC optimization [32] and to model mobility as a function of pH in capillary zone electrophoresis [33].

We present evidence here that the logistic-type transformation function can be used to linearize data in cation bulk optode sensors, giving reliable results when applied to optical disposable sensors previously developed by us for potassium [34] and hardness [18]. To validate the methodology, different real water samples and beverages coming from different provenances and with analyte concentration levels in the extreme zones of the new calibration function were analysed comparing results with a reference method.

## 2. Theory

### 2.1. General model

The foundation of optical sensors based on concentration changes inside the bulk of a separate phase, named bulk optodes, is well established [8,27,35]. In the case of cation sensing, recognition is due to ionophore L present in a thin polymeric membrane by selective host–guest interaction and the optical transduction is induced through a cation exchange reaction involving a co-existing chromoionophore C. The exchange of the cationic analyte  $I^{v+}$  present in the sample solution by a reference cation, usually a hydrogen ion present as a chromoionophore species  $HC^+$  is made possible by immobilized anions  $R^-$ , usually coming from a lipophilic salt that controls the total ion activity in membrane



Eq. (4) accounts for this global ion exchange equilibrium, in which barred species are in membrane phase, ruled by the global equilibrium constant  $K_{\text{exch}}$  which is a function of relative lipophilicities of involved analyte and reference ions, stability constant of  $IL_p^{v+}$  complex and acidity constant of  $HC^+$  species [36,37].

The sensor response can be accomplished through the absorbance or luminescence changes of the chromoionophore, which is the optical measurable species in membrane phase, as a normalized parameter  $\alpha$  [8,27]. The  $\alpha$  value, defined as  $[C]/C_C$ , where  $[C]$  is the concentration of deprotonated chromoionophore, is related to the global equilibrium constant  $K_{\text{exch}}$ , the analytical concentrations of chromoionophore  $C_C$ , ionophore  $C_L$ , and lipophilic anion  $C_R$ , the activities of analyte  $I^{v+}$  and reference ion, hydrogen ion  $H^+$ , in the aqueous sample through an implicit sigmoidal response function:

$$a_{I^{v+}} = \frac{1}{K_{\text{exch}}} \left( \frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^v \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{v(C_L - \frac{p}{v}(C_R - (1 - \alpha)C_C))^p} \quad (5)$$

The experimental parameter  $\alpha$ , degree of deprotonation of the chromoionophore, is obtained using the problem, the minimum ( $\alpha = 1$ ) and the maximum ( $\alpha = 0$ ) absorbance, or luminescence, values ( $A$ ,  $A_C$  and  $A_{HC}$ ) (Eq. (6)) and depends on the quotient of the corresponding ion activities of hydrogen ion and reference ion in aqueous phase

$$\alpha = \frac{A_{HC} - A}{A_{HC} - A_C} \quad (6)$$

The logarithmic form of Eq. (5) shows the dependence between the activity of the cationic analyte  $a_{I^{v+}}$  and the degree of deprotonation of chromoionophore,  $\alpha$ , since all the other terms are constant for each analytical system. Plotting  $\alpha$  versus  $\log a_{I^{v+}}$  a sigmoidal curve (Fig. 1) is obtained

$$\log a_{I^{v+}} = \log \left( \left( \frac{\alpha}{1 - \alpha} \right)^v \left( \frac{a_{H^+}^v}{K_{\text{exch}}} \right) \times \frac{(C_R - (1 - \alpha)C_C)}{v(C_L - \frac{p}{v}(C_R - (1 - \alpha)C_C))^p} \right) \quad (7)$$

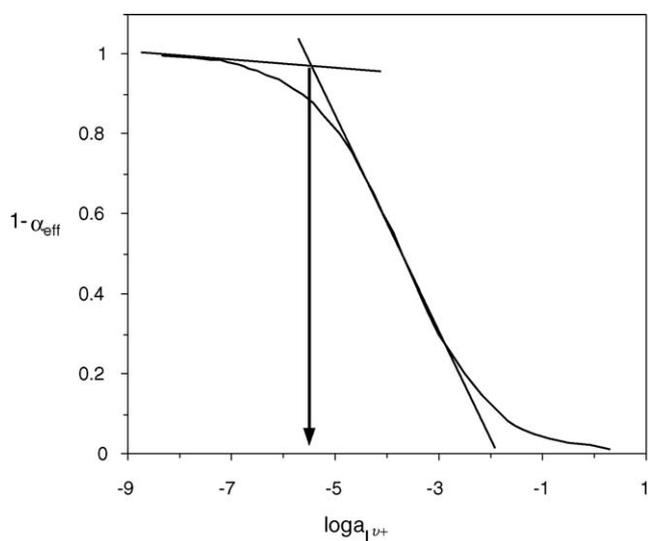


Fig. 1. Dynamic linear range in sigmoidal-type response using previous methodology.

In bulk optode sensors, the analytical measuring range typically covers 2–4 orders of magnitude and depends, at any given pH value, on the membrane composition, the charge of the cationic analyte and the stoichiometry of the complex with ionophore formed in membrane; increasing the working range with analyte charge and stoichiometric factor [7,27].

For analysis purposes the linear part of the sigmoidal response curve it is usually employed [38], defined as between a lower and an upper limit. The lower limit can be estimated from different approximations: (i) the loss of sensitivity due to the sigmoidal shape of the response function at low analyte concentrations and (ii) the interference from other ions present [27]. Using the first approximation, loss of sensitivity at low analyte concentrations, it has been defined through: (a) the standard deviation of background signal [21]; (b) the variation of a given fraction of the maximum slope of the response function, for example one-half or one-quarter [37], and (c) the intersection point of two linear functions of maximum and minimum slope, this one in the zone of lower activity of sigmoidal function [39] (Fig. 1). Since the sensitivity decreases continuously with increasing analyte activity, the upper detection limit can be described in analogy with previous definitions (b) and (c). In the latter case, it is necessary to be able to define a linear function with minimum slope in the zone of high activity. If this is not possible, as is usual, due to some problem, such as lack of solubility of the corresponding salt, a practical upper detection limit is obtained from the intercept of the linear calibration function with the axis of abscise [40].

In the first studies of these systems, usually in test strip format, in which the analytical parameter was absorbance or, more commonly, diffuse reflectance, different calibration function were used. For example, Charlton et al. [1] found a hyperbolic dependence of test strip element absorbance on analyte concentration linearized by means a double-reciprocal plot. In the case of reflectance measurements, the Kubelka–Munk transformation [41] and the Williams–Clapper transformation

[42] have been used as a convenient algorithm for calibration purposes.

The use of the central part of sigmoidal response function as the measuring range of bulk optode membranes means a loss of intrinsic analytical information, since the measuring range for the analyte is various orders shorter than the whole dynamic range. With the aim of using the whole sigmoidal function to extract analytical information, in this paper we studied its transformation into a linear function to obtain a wider application range to samples, eliminating the need for prior treatment.

To find a linear function from the sigmoidal theoretical model, Eq. (7) could be rewritten as:

$$\begin{aligned} \log \left( \frac{\alpha}{1-\alpha} \right) + \frac{1}{\nu} \log \left( \frac{\left( \frac{C_R}{C_C} - (1-\alpha) \right)}{\nu \left( \frac{C_L}{C_C} - \frac{p}{\nu} \left( \frac{C_R}{C_C} - (1-\alpha) \right) \right)^p} \right) \\ = \frac{1}{\nu} \log \frac{K_{\text{exch}} C_C^{p-1}}{a_{\text{H}^+}^{\nu}} + \frac{1}{\nu} \log a_{\text{I}^{\nu+}} \end{aligned} \quad (8)$$

In a simplified way it follows as:

$$Y(\alpha) + D(\alpha) = A + BX \quad (9)$$

where  $Y(\alpha)$  is the decimal logit of  $\alpha$ ;  $X$  the decimal logarithm of the activity of considered cation;  $A$  is an independent term that remains constant for each analytical system and  $B$  is the linear coefficient or slope ( $B = 1/\nu$ ). We apply a decimal logarithm instead of a neperian logarithm in order to maintain the usual formalism in the analytical equations that imply constants of equilibrium and concentrations.

Eq. (9) is similar to a straight-line equation ( $Y(\alpha)$  versus  $X$ ), except for the introduction of a term named disturbance term  $D(\alpha)$ , defined as:

$$D(\alpha) = \frac{1}{\nu} \log \left( \frac{\left( \frac{C_R}{C_C} - (1-\alpha) \right)}{\nu \left( \frac{C_L}{C_C} - \frac{p}{\nu} \left( \frac{C_R}{C_C} - (1-\alpha) \right) \right)^p} \right) \quad (10)$$

Fig. 2 shows the theoretical evolution of  $D(\alpha)$  for different conditions of analytical concentrations of membrane components, analyte charge and stoichiometric factors.

Consequently, we use here a logit transformation, but one that uses decimal logarithms and not neperian logarithms in order to respect the usual dependence used in this field between the degree of deprotonation  $\alpha$  and the analyte activity to obtain a linear calibration curve. The type of logit transformation that we use is known as fully specified logit–log model [43] that describes an algebraically equivalent expression for the logistic function which effectively linearize through the equation  $\logit Z = a + b \log(\text{concentration})$ , being the fully specified logit of  $Z$  equal to  $\logit Z = \log[(Z - Z_{\text{min}})/(Z_{\text{max}} - Z)]$ .

To demonstrate the feasibility of Eq. (8) to the linearize sigmoidal response of bulk optode for cations, we selected two disposable sensors for cations previously studied by us, namely for potassium [34] and hardness (calcium plus magnesium) [18]. The general Eq. (8) is adjusted for each particular case and checked experimentally.

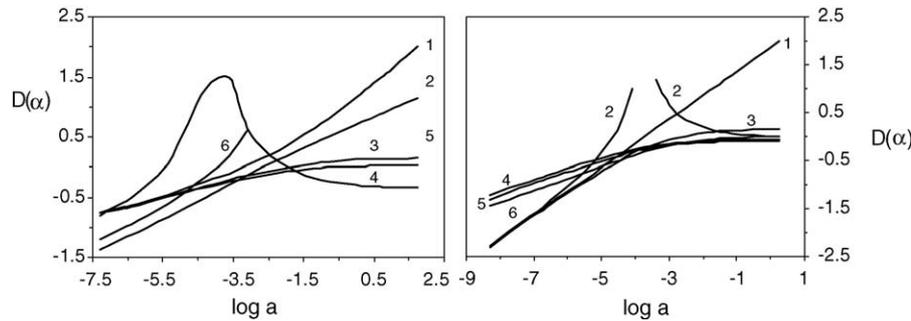


Fig. 2. Variance of decimal logit of  $D(\alpha)$  as a function of decimal logarithm of hardness (1): 1:  $\nu=2, p=2$ ; 2:  $\nu=1, p=0.5$ ; 3:  $\nu=2, p=1$ ; 4:  $\nu=2, p=0.5$ ; 5:  $\nu=1, p=2$ ; 6:  $\nu=1, p=1$ ; and potassium (2): 1:  $\nu=1, p=1$ ; 2:  $\nu=1, p=2$ ; 3:  $\nu=1, p=0.5$ ; 4:  $\nu=2, p=0.5$ ; 5:  $\nu=2, p=1$ ; 6:  $\nu=2, p=2$ .

## 2.2. Model for potassium disposable sensor

The ion exchange equilibrium that holds in this case can be expressed as:



Since in this case the chromoionophore cannot be fully protonated ( $1 - \alpha \cong 0.9$ ) at the working pH (9.0), it is practically difficult to determine the absorbance for  $\alpha = 0$ , the problem being solved by using an effective  $\alpha$  value,  $\alpha_{\text{eff}}$ , in which  $A_{\text{HC}}$  is measured in buffer as indicated in Section 3.

In the case of potassium, the analytical concentrations of ionophore, chromoionophore and lipophilic salt are the same,  $C_L = C_C = C_R = C$ , and, additionally,  $\nu = 1$  and the stoichiometric factor  $p = 1$  [34], thus Eq. (5) is reduced to:

$$a_{K^+} = \frac{a_{H^+}}{K_{\text{exch}}^{K^+}} \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right)^2 \quad (12)$$

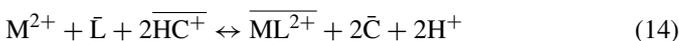
Taking decimal logarithms in the above equation results in:

$$\log \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right) = \frac{1}{2} \log \frac{K_{\text{exch}}^{K^+}}{a_{H^+}} + \frac{1}{2} \log a_{K^+} \quad (13)$$

In this equation the disturbance term  $D(\alpha)$  takes the form of the decimal logit and for that reason results in a straight line with slope 1/2, namely  $Y(\alpha) = A + (1/2)X$ , where  $Y(\alpha)$  is the decimal logit of  $\alpha$  and  $X$  is the decimal logarithm of the potassium activity.

## 2.3. Model for hardness disposable sensor

In contact with an aqueous solution containing calcium and magnesium, the following ion exchange equilibrium holds in the disposable membrane:



In this particular case, we also use  $\alpha_{\text{eff}}$  for the same reason indicated above and the analytical concentrations of ionophore, chromoionophore and lipophilic salt hold the condition:  $C_C = C_R = (1/2)C_L = C$ ; and  $\nu = 2$  and  $p = 0.5$  [18], so:

$$a_{M^{2+}} = \frac{a_{H^+}^2}{K_{\text{exch}}^{M^{2+}}} \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right)^2 \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{\sqrt{8 - \alpha_{\text{eff}}}} \right) \sqrt{C} \quad (15)$$

Taking decimal logarithms in Eq. (15) results in:

$$\begin{aligned} \log \left( \frac{\alpha_{\text{eff}}}{1 - \alpha_{\text{eff}}} \right) + \frac{1}{2} \log \frac{\alpha_{\text{eff}}}{\sqrt{8 - \alpha_{\text{eff}}}} \\ = \frac{1}{2} \log \frac{K_{\text{exch}}^{M^{2+}}}{a_{H^+}^2 \sqrt{C}} + \frac{1}{2} \log a_{M^{2+}} \end{aligned} \quad (16)$$

The resulting Eq. (16) presents the form  $Y(\alpha_{\text{eff}}) + D(\alpha_{\text{eff}}) = A + (1/2)X$  where  $Y(\alpha_{\text{eff}})$  is the decimal logit of  $\alpha$  and  $X$  is the decimal logarithm of the total metal content (calcium plus magnesium) content, expressed as calcium carbonate.

In this case, the disturbance term  $D(\alpha_{\text{eff}})$  does not have a linear dependence with the logarithm of the activity, which introduces a disturbance in the linear model. As it can be seen in Fig. 2, the disturbance term shows a behaviour that is nearly linear in relation to  $X$  and, for this reason, when  $Y(\alpha_{\text{eff}})$  is plotted versus  $X$  a linear curve is obtained, although it exhibits a slope smaller than the theoretical value of 1/2.

Consequently, the decimal logit transformation should be applied to the experimental degree of deprotonation  $\alpha$  to obtain linear calibration curves against analyte activity, which can be used as a calibration curve for this type of sensor.

## 2.4. Calculation of the detection limit

This model makes it possible to linearize experimental data covering the dynamic range response of optical sensors and, additionally can be used to calculate the detection limit (DL). This DL is the cation concentration, which yields an  $\alpha$  value significantly different from zero. It is possible to establish a minimum value for  $\alpha$  such that it fulfils the condition  $\alpha \geq 3s_0$ , where  $s_0$  is the standard deviation of experimental  $\alpha$  values when the analyte concentration is near zero and the DL is the corresponding analyte concentration calculated from the calibration curve:

$$DL = 3 \times \frac{s_0}{b} \quad (17)$$

## 2.5. Estimation of the global equilibrium constant

Usually, the global equilibrium constant of bulk optode membranes is calculated by fitting the experimental data to the theoretical model by simple fit [38], using a least-squares approx-

imation to the central points of the sigmoid [40] or by iterative calculation [44]. With the data transformation proposed here, it is possible to calculate the global equilibrium constant  $K_{\text{exch}}$  from the intercept of linearized Eq. (8):

$$A = \frac{1}{\nu} \log \frac{K_{\text{exch}} C_C^{p-1}}{a_{\text{H}^+}^\nu} \\ = \frac{1}{\nu} ((p-1) \log C_C + \nu \text{pH} + \log K_{\text{exch}}) \quad (18)$$

It is only necessary to know the pH value and the analytical concentrations of the components in the membrane.

### 3. Experimental

#### 3.1. Reagents

The chemicals used were of analytical-reagent grade and all aqueous solutions were prepared using reverse-osmosis type quality water produced by a Milli-RO 12 plus Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA).

Calcium (3.1 M), magnesium (3.1 M) and potassium (2.0 M) stock solutions were prepared in water from  $\text{CaCO}_3$  (Pan-reac, Barcelona, Spain),  $\text{MgCO}_3$  (Merck, Darmstadt, Germany) and KCl (Aldrich, Steinheim, Germany), respectively. Solutions of lower concentrations were prepared by dilution with water. A pH 9.0 buffer solution 0.2 M from tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris) (Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain) and HCl (Merck) was used.

For preparing the optode films, poly(vinylchloride) (PVC; high molecular weight), tributylphosphate (TBP) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma (Sigma–Aldrich), potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate (TCPB) and dibenzo18-crown-6-ether (DB18C6) both from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). Next the ionophore and chromoionophore were synthesized, purified and identified by us according to references: 4,13-[bis(*N*-adamantylcarbamoyl)acetyl]-1,7,10,16-tetraoxa-4,13-diazacyclooctadecane (K22B5) [18,45]; (1,2-benzo-7-(diethylamino)-3-(octadecanoylimino) phenoxazine [14]. Sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support.

#### 3.2. Preparation of disposable membranes and measurement set-up

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique [46]. Mixtures for the calcium preparation and magnesium-sensitive membranes were made from a batch of 25.0 mg (27.8 wt.%) of PVC, 63.0 mg (70.0 wt.%) of TBP, 0.5 mg (0.56 wt.%) of K22B5, 0.85 mg (0.94 wt.%) of (1,2-benzo-7-(diethylamino)-3-(octadecanoylimino) phenoxazine and 0.71 mg (0.79 wt.%) of TCPB and for potassium-sensitive membranes were made from a batch of 26.0 mg (28.0 wt.%) of PVC, 63.0 mg (68.5 wt.%) of TBP, 0.8 mg (0.87 wt.%) of DB18C6, 1.3 mg (1.4 wt.%) of (1,2-benzo-7-(diethylamino)-3-(octadecanoylimino) phenoxazine and 1.1 mg (1.2 wt.%) of TCPB. In both cases all components were dis-

solved in 1 mL of freshly distilled THF. The disposable sensors were cast in all cases by placing 20  $\mu\text{L}$  of the cocktail on a 14 mm  $\times$  4 cm  $\times$  0.5 mm thick polyester sheet by means of a laboratory-made spin-on device and stored in a vacuum dryer at room temperature to enable slow solvent evaporation.

The response of the two disposable sensors was evaluated by adding 9 mL of the test solution to a polyethylene plastic tube together with 1 mL of pH 9.0 buffer solutions. The disposable sensor was then introduced for 5 min into the tube without shaking. After reaching equilibrium, the absorbance of the membranes was measured at 655 nm in a Hewlett Packard diode array spectrophotometer (model 8453; Nortwalk, CT, US) provided with a 44 mm high, 12 mm wide homemade membrane cell holder made of a matte black painted iron block [18]. The standard solutions used for calibration purposes in the case of hardness disposable sensors were prepared from a 1:1 molar ratio calcium–magnesium solution. The maximum and minimum absorbance values, corresponding to the fully protonated ( $A_{\text{HC}^+}$ ) and deprotonated ( $A_{\text{C}}$ ) forms of the chromoionophore necessary for calculation of  $\alpha_{\text{eff}}$  values were measured by conditioning the disposable sensors in  $10^{-2}$  M Tris buffer and  $10^{-2}$  M NaOH. Activities were calculated according to the two-parameter Debye–Hückel formalism [47]. To correct for the background absorbance the measurements were made against a Mylar polyester strip. All measurements were carried out at room temperature. The membranes were not conditioned before use.

### 4. Results and discussion

#### 4.1. Verification of the theoretical model: establishment of linear calibration curves

In order to verify the reliability of the theoretical models discussed above (Eqs. (13) and (16)), two sets of 11 standard solutions for hardness (calcium plus magnesium) and 10 standard solutions for potassium were independently prepared containing between  $1.77 \times 10^{-8}$  and 2.5 M in activities ( $2 \times 10^{-8}$  and 3 M in concentrations) of calcium plus magnesium and  $8.8 \times 10^{-9}$  and 0.87 M in activities ( $1 \times 10^{-8}$  and 1.5 M in concentrations) of potassium, respectively. For each standard solution nine replicates were analysed with an unused disposable sensor each time, according to the procedure indicated above in Section 3 and the corresponding  $\alpha_{\text{eff}}$  values were obtained. The experimental data obtained were fitted to the corresponding theoretical linear model using a linear ordinary least squares (OLS) regression.

The precision of the activity logarithm measurements was studied in the entire application range observing that variance increases towards the extremes of the analytical range. Fig. 3 shows the obtained variance curves, which follow a parabolic profile for both cases studied.

The standard deviation of the experimental  $\alpha$  value  $s_0$  needed for the calculation of the detection limit was obtained using a two-step procedure. In a first step, a  $s_{01}$  value and a  $\text{DL}_1$  were obtained from replicate values of  $\alpha$  at the lower analyte concentration tested. In the second step, we use all experimental

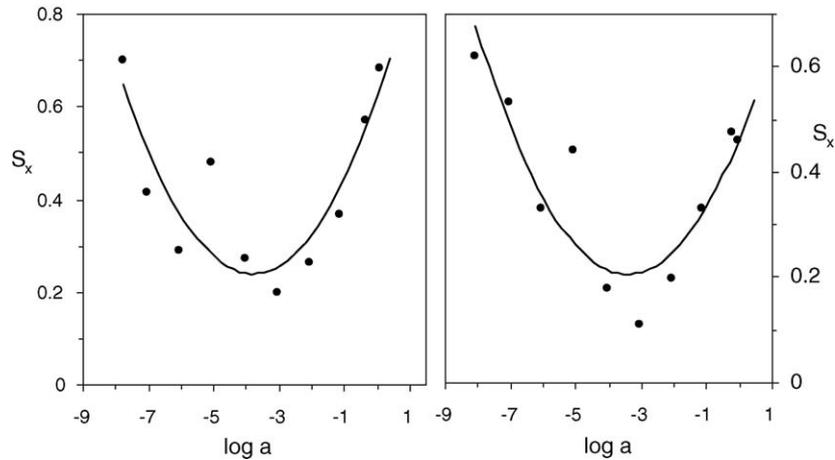


Fig. 3. Decimal log of  $\alpha$  variance curves as a function of decimal logarithm of hardness (1) and potassium (2) activities.

values of  $\alpha$  coming from analyte concentrations that are below this first DL<sub>1</sub>. With those  $\alpha$  values a pooled standard deviation is calculated and the corresponding DL is obtained using the Eq. (17).

The dynamic linear range for potassium using the previous methodology was from 0.013 to 100 mM (five orders of magnitude) and now is from 0.0001 to 1500 mM (seven orders) (Fig. 4). In the case of measurement of hardness, the previous methodology used gave an analytical range from 1.9 to 15,000 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> (five orders) changing to 0.007 to 300,000 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub> (eight orders) with the methodology studied here (Fig. 4). The considerable increase in the obtained linear dynamic range means an advantage of the proposed methodology. One possible drawback is the fact that precision of measurements decreases with the parabolic profile towards the edge of linear dynamic range, although these values are acceptable for disposable-type sensors. Table 1 shows the analytical characteristics of the proposed procedures comparing results with those of previous methodology.

The global equilibrium constants, as  $\log K_{\text{exch}}$ , calculated from the intercept of linearized Eq. (8), were  $-5.1$  for potassium and  $-15.7$  for hardness, values that agree with calculations using the least-squares approximation to the central points of sigmoid [40] ( $-5.3$  and  $-15.9$ , respectively).

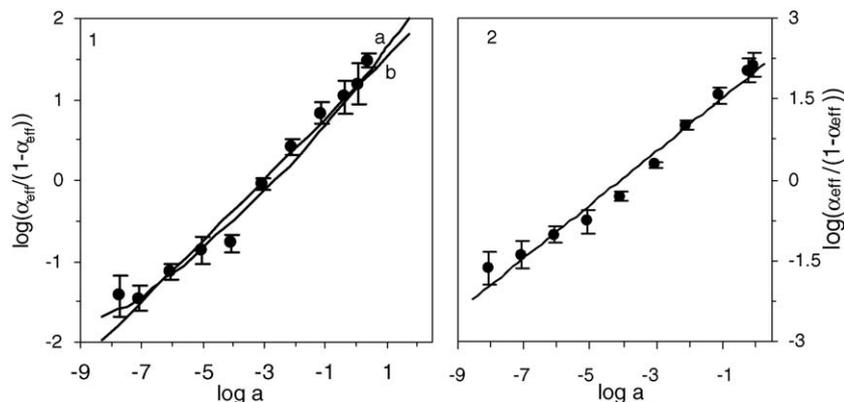


Fig. 4. Comparison between the calibration curves for: (1) hardness; a: theoretical function, b: proposed function and (2) potassium.

Table 1

Analytical performance of disposable sensors studied using the proposed linearization methodology

Parameter	Disposable sensor	
	Potassium	Hardness
Intercept	1.970	1.143
Intercept standard deviation	0.053	0.040
Slope	0.481	0.377
Slope standard deviation	0.011	0.013
Determination coefficient ( $R^2$ )	95.8%	95.0%
Linearity on-line	97.7%	96.7%
Previous detection limit	0.013	1.9
New detection limit	0.00001	0.007
Previous linear dynamic range	$1.3 \times 10^{-2}$ to $10^2$	$1.9$ to $1.5 \times 10^3$
New linear dynamic range	$1.6 \times 10^{-4}$ to $1.5 \times 10^3$	$0.017$ to $3 \times 10^5$

The concentration units are mM for potassium and mg L<sup>-1</sup> of CaCO<sub>3</sub> for hardness, respectively.

#### 4.2. Analytical applications

To assess the usefulness of the proposed linearization method for cation bulk optodes, it was applied to disposable sensors that had been previously designed and characterized for the determination of potassium and hardness. To this end, we selected

Table 2

Determination of potassium and hardness in different types of samples using AAS as reference method

Sample	Disposable sensor		AAS		$P_{\text{val}}$ (%)
	K (mM)	s <sup>a</sup>	K (mM)	s	
Mineral water (Vichy Catalán)	1.59	0.196	1.61	0.040	81.8
Mineral water (Mondariz)	0.25	0.019	0.26	0.001	26.5
Rain water (Granada)	$9.6 \times 10^{-4}$	$6.4 \times 10^{-4}$	$6.72 \times 10^{-4}$	$5.42 \times 10^{-5}$	47.6
Snow water (Sierra Nevada, Granada)	$1.4 \times 10^{-2}$	$3.2 \times 10^{-3}$	$1.14 \times 10^{-2}$	$9.39 \times 10^{-5}$	19.1
Apricot and peach juice	22.5	2.75	26.2	0.23	61.9
Fruit juice	34.9	2.15	37.5	0.19	5.6
Cider	26.3	1.90	23.2	0.43	5.4
Well water (Otura, Granada)	0.076	0.002	0.075	0.009	6.6
Well water (Valderrubio, Granada)	0.13	0.02	0.164	0.016	94.1
Seawater (Almuñecar, Granada)	13.5	3.69	19.3	1.18	27.6

Sample	Disposable sensor		AAS		$P_{\text{val}}$ (%)
	CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	s	CaCO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	s	
Well water (Otura, Granada)	516	43.2	468	10.6	13.6
Well water (Valderrubio, Granada)	440	76.3	451	12.2	82.2
Rain water (Granada)	2.3	1.39	4.11	0.13	8.4
Snow water (Sierra Nevada, Granada)	0.77	0.09	0.81	0.08	72.5
Stream water (Lachar, Granada)	1672	235.7	1973	10.1	9.2

All the results were obtained from three replicate analysis.

<sup>a</sup> Standard deviation.

samples of beverages and waters of diverse provenance (tap, well, stream, snow and sea) whose hardness and potassium content were in the new zones of the linear dynamic range obtained by the proposed linearization method, especially in the zone of low activity. Table 2 shows the results obtained using the described disposable sensor procedures compared to an atomic absorption spectrometry method used as a reference method. Table 2 also includes the mean values from three determinations of each sample and the standard deviation of these measurements and the probability value ( $P_{\text{val}}$ ) of the test used for the comparison of the measurements obtained for both methods.

In addition, and due to the wide interval of concentrations studied in the validation, the RMSRE (root mean squared relative error) was selected as an appropriate feature for evaluating the capacity of prediction of the proposed calibration in relation to the reference values. The RMSRE is calculated from the expression:

$$\text{RMSRE} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left( \frac{\text{value}_{\text{estimated}} - \text{value}_{\text{reference}}}{\text{value}_{\text{reference}}} \right)^2} \quad (19)$$

where  $N$  refers to the number of references in the test set. The obtained values from the data set collected in Table 2 are 0.20 and 0.22 for potassium and hardness, respectively.

In conclusion, the results obtained for both methods agree, which corroborates the validity of the assumptions made in this linearization procedure.

## 5. Conclusions

We have established a simple mathematical linear model useful for bulk optodes for cations based on the use of ionophore–chromoionophore chemistry that works by ion

exchange. This methodology makes it possible to considerably enlarge the linear dynamic range of such optodes up to 7–8 orders of magnitude by using the whole dynamic response. The linearization procedure studied here makes direct and fast determination of samples possible without the need for preliminary operations such as dilution or preconcentration, permitting the direct measurement of samples with extreme analyte content. The linearization procedure has been illustrated with two optodes in disposable sensor format for hardness and potassium, showing that is possible to directly analyse such analytes in samples from snow water to seawater.

This new curve response linearization for optical disposable sensors increases the analytical feasibility of this type of optical sensors, offering the market a useful and inexpensive tool for obtaining chemical information in situ for a wide range of analyte samples that can be implemented easily in portable equipment.

## Acknowledgement

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educacion y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) (Project No. BQU2002-00353).

## References

- [1] S.C. Charlton, R.L. Fleming, A. Zipp, *Clin. Chem.* 28 (1982) 1857–1861.
- [2] S.C. Charlton, Multilayer test device containing ionophore and reporter substance and its use for determination of ions in aqueous solution, Patent no. E.P. 207392 (1986).
- [3] S.C. Charlton, R.L. Fleming, P. Hemmes, A.L.Y. Lau, Unified test means for ion determination, Patent no. U.S. 4,645,744 (1987).

- [4] S.C. Charlton, J.B. Denton, Selectivity improvement for lithium ion tests, Patent no. U.S. 4,968,630 (1989).
- [5] K.-F. Yip, S.C. Charlton, Compound useful in detecting ions and method of preparing it, Patent no. U.S. 4,552,697 (1985).
- [6] W.E. Morf, K. Seiler, B. Lehmann, C. Behringer, K. Hartman, W. Simon, *Pure Appl. Chem.* 61 (1989) 1613–1618.
- [7] U.E. Spichiger-Keller, *Optical Sensors, Optodes*, in *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998, p. 259.
- [8] P. Bühlmann, E. Pretsch, E. Bakker, *Chem. Rev.* 98 (1998) 1953–1987.
- [9] W.H. Chan, A.W.M. Lee, Y.S. Lam, J.Z. Lu, *Microchem. J.* 72 (2002) 201–207.
- [10] X. Yang, K. Wang, C. Guo, *Anal. Chim. Acta* 407 (2000) 45–52.
- [11] H. Hisamoto, N. Miyashita, K. Watanabe, E. Nakagawa, N. Yamamoto, K. Suzuki, *Sens. Actuators B* 29 (1995) 378–385.
- [12] J.F. Alder, D.C. Ashworth, R. Narayanaswamy, R.E. Moss, I.O. Sutherland, *Analyst* 112 (1987) 1191.
- [13] W.H. Chan, A.W.M. Lee, D.W.J. Kwong, W.L. Tam, K.M. Wang, *Analyst* 121 (1996) 531–534.
- [14] W.E. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* 62 (1990) 738–742.
- [15] K.H. Kim, H. Minamitani, H. Hisamoto, K. Suzuki, S. Kang, *Anal. Chim. Acta* 343 (1997) 199–208.
- [16] D. Siswanta, H. Hisamoto, S. Sato, Y. Matsumoto, Y. Koike, S. Yamamori, K. Suzuki, *Anal. Sci.* 13 (1997) 429–435.
- [17] W. Zhang, L. Jenny, U.E. Spichiger-Keller, *Anal. Sci.* 16 (2000) 11–18.
- [18] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, F. Santoyo-Gonzalez, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 139–148.
- [19] M. Lerchi, E. Reitter, W. Simon, E. Pretsch, A. Chowdhury, S. Kamata, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1713–1717.
- [20] M. Lerchi, F. Orsini, Z. Cimermam, E. Pretsch, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3210–3214.
- [21] M. Lerchi, E. Bakker, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1534–1540.
- [22] N. Alizadeh, A. Moemeni, M. Shamsipur, *Anal. Chim. Acta* 464 (2003) 187–196.
- [23] H. Hisamoto, K.H. Kim, Y. Manabe, K. Sasaki, H. Minamitani, K. Suzuki, *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 31–39.
- [24] P.C. Hauser, J.C. Litten, *Anal. Chim. Acta* 294 (1994) 49–56.
- [25] C. Krause, T. Werner, O.S. Wolfbeis, *Anal. Sci.* 14 (1998) 163–167.
- [26] M. Telting-Diaz, E. Bakker, *Anal. Chem.* 74 (2002) 5251–5256.
- [27] E. Bakker, P. Bühlmann, E. Pretsch, *Chem. Rev.* 97 (1997) 3083–3132.
- [28] C. Laba, H. Haas, J. Jodkowski, A. Lange, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 34 (1986) 111–127.
- [29] B.D. Plikaytis, S.H. Turner, L.L. Gheesling, G.M. Carlone, *J. Clin. Microbiol.* 29 (1991) 1439–1446.
- [30] J.A. Clark, A. El Shaarawi, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 380–388.
- [31] T.A. Hurlbut III, B. Littenberg, *Am. J. Clin. Pathol.* 96 (1991) 582–588.
- [32] P.F. de Aguiar, B. Bourguignon, M.S. Khots, W. Penninckx, D.L. Massart, *Quim. Anal.* 12 (1993) 177–182.
- [33] P.F. de Aguiar, M. Jimidar, D.L. Massart, *Acta Chromatogr.* 7 (1997) 35–48.
- [34] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, M. Al Natsheh, *Sens. Actuators B* B88 (2003) 217–222.
- [35] U.E. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, 1998.
- [36] E. Bakker, W. Simon, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1805–1812.
- [37] K. Seiler, W. Simon, *Sens. Actuators B* 6 (1992) 295–298.
- [38] K. Seiler, K. Wang, E. Bakker, W.E. Morf, B. Rusterholz, U.E. Spichiger-Keller, W. Simon, *Clin. Chem.* 37 (1991) 1350–1355.
- [39] E. Bakker, M. Willer, E. Pretsch, *Anal. Chim. Acta* 282 (1993) 265–271.
- [40] L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 231–241.
- [41] K. Anand, L. Koon-Wah, *Reflective particle-containing analysis composition and device*, Patent no. E.P. 0141647 (1985).
- [42] H.G. Curme, R.L. Columbus, G.M. Dappen, T.W. Eder, W.D. Fellows, J. Figueras, C.P. Glover, C.A. Goffe, D.E. Hill, W.H. Lawton, E.J. Muka, J.E. Pinney, R.N. Rand, K.J. Sanford, T.W. Wu, *Clin. Chem.* 24 (1978) 1335–1342.
- [43] D. Rodbard, D.M. Hutt, *Proceedings of the Symposium on Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine*, Istanbul, 1973, 1974, p. 165.
- [44] S. O'Neill, S. Conway, J. Twellmeyer, O. Egan, K. Nolan, D. Diamond, *Anal. Chim. Acta* 398 (1999) 1–11.
- [45] K. Suzuki, K. Watanabe, Y. Matsumoto, M. Kobayashi, S. Sato, D. Siswanta, H. Hisamoto, *Anal. Chem.* 67 (1995) 324–334.
- [46] K. Seiler, W. Simon, *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 73–87.
- [47] P.C. Meier, *Anal. Chim. Acta* 136 (1982) 363–368.

## Biographies

**L.F. Capitán Vallvey**, PhD in Chemistry since 1976 from the University of Granada (Granada, Spain). He is Full Professor in Analytical Chemistry at the Department of Analytical Chemistry in the University of Granada (Spain). His current research interests include optical sensors, gas sensors, one-shot sensors, hand-held dedicated devices, and cultural heritage.

**A. Lapresta-Fernández**, is currently Phd student in chemistry at the Department of Analytical Chemistry in the University of Granada (Spain). His research interest involve mainly: one-shot sensors, portable instrumentation, and image analysis system.

**M.D. Fernández Ramos**, PhD in Chemistry since 1997, professor at the Department of Analytical Chemistry in the University of Granada (Spain). Fields of interest: one-shot sensors, ion selective ionophores, and optical sensors.

**L. Cuadros-Rodríguez**, PhD in Chemistry since 1995, professor at the Department of Analytical Chemistry in the University of Granada (Spain). Expert in the field of the Chemical Metrology and Qualimetrics (CMQ). Technical advisor in Quality Management for Chemical Testing Laboratories. The principal R&D areas of interest includes analytical characterization of edible (olive) oil, analytical chemistry of food residues and water pollutants, and application of qualimetric and chemometric protocol (equipment and method calibration, method validation, uncertainty estimation, process optimization by applying statistically designed experiments, etc.) on analytical process.

# Diferentes medidas espectrales para la determinación de potasio mediante tiras reactivas

Rafael Huertas\*<sup>1</sup>, Manuel Melgosa\*<sup>1</sup>, Francisco Martínez-Verdú\*<sup>2</sup>,  
Alejandro Lapresta-Fernández\*<sup>3</sup>, María Dolores Fernández-Ramos\*<sup>3</sup>  
y Luis Fermín Capitán-Vallvey\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> Departamento de Óptica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España

\*<sup>2</sup> Departamento Interuniversitario de Óptica, Universidad de Alicante, España

\*<sup>3</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España

## Introducción

Una de las demandas actuales es la introducción de controles medioambientales o de salud rigurosos que sean simples, rápidos y eficaces, y que originen una información fiable. Este tipo de sistemas rápidos de análisis, que se pueden llevar a cabo in situ, evita el uso de instrumentación compleja, y esto hace que sea una metodología atractiva para los usuarios. Además, con frecuencia la evaluación del diagnóstico se suele realizar por una simple inspección visual que no genera dificultades adicionales para el usuario.

De las formas de llevar a cabo este tipo de métodos, una de las más interesantes es mediante tiras reactivas. Las tiras reactivas permiten llevar a cabo análisis químicos de forma rápida, económica y sin necesidad de personal especializado. Además, no es necesario realizar toma ni tratamiento de muestras, desplazamiento hasta los laboratorios convencionales de análisis, ni hacer uso de una instrumentación de laboratorio más o menos compleja (Ünger-Heumann 1996, Capitán-Vallvey y Fernández Ramos 2003).

El desarrollo de métodos para la determinación de K(I) ha recibido especial atención en análisis clínicos, pues el nivel de dicho ión en fluidos biológicos, junto con otros metabolitos, puede indicar ciertos trastornos metabólicos y del riñón. La determinación rutinaria de K(I) se realiza por fotometría de llama, potenciometría con electrodos selectivos de iones (Bobacka, Ivaska y Lewenstam 1999, Lee y Thomas 1994) o con tiras reactivas tanto visuales como de tipo óptico por medida de reflectancia difusa (Charlton, Fleming y Zipp 1982).

En este trabajo realizamos un estudio comparativo de diferentes tipos de medidas espectrales, espectrofotométricas –basadas en la medida de absorción de radiación por transmisión (Capitán-Vallvey, Fernández Ramos y Al-Natsheh 2003)– y espectrorradiométricas, sobre tiras reactivas ópticas para la determinación rápida de K(I) en aguas. Además, estudiamos la posible valoración visual de la concentración de K(I) a partir de las diferencias de color percibidas en las tiras reactivas. En la bibliografía se encuentran distintos métodos de análisis óptico basados en el análisis del color (Hirayama y colab. 2000, Suzuki y colab. 2002).

## Método experimental

### Instrumentación y software

Para realizar las medidas espectrofotométricas de las tiras reactivas se utilizó un espectrofotómetro de diodos en fila HP 8453 provisto de un portamuestras de diseño propio (Capitán-Vallvey, Fernández Ramos y Álvarez 2002), con cuyo uso se mejora la reproducibilidad de las medidas. Las tiras reactivas se prepararon en un sistema centrífugo de giro variable de diseño propio de acuerdo con Seiler y Simon (1992) y Álvarez de Cienfuegos (2003).

Las medidas espectrorradiométricas se hicieron mediante un espectrorradiómetro PR-704 de PhotoResearch en una cabina VeriVide portátil con una fuente luminosa D65 y una superficie de BaSO<sub>4</sub> como blanco de referencia.

### Reactivos y materiales

Todos los productos químicos usados fueron de grado reactivo y las disoluciones se prepararon a partir de agua de calidad osmosis inversa preparada con un sistema de purificación Milli-RO 12 junto con un Milli-Q (Millipore, Bedford, Massachusetts).

La disolución patrón de K(I) (1 mol·L<sup>-1</sup>) se preparó a partir de KCl (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid), obteniendo por dilución con agua disoluciones de menor concentración. La disolución reguladora de pH 9 se preparó a partir de tris[hidroximetil]aminometano (Tris) 2.10<sup>-2</sup> M y ácido clorhídrico (ambos de Sigma-Aldrich).

Para la preparación de las tiras reactivas se utilizó cloruro de polivinilo (PVC, de alto peso molecular), éter dibenzo-18-corona-6, tributilfosfato (TBP), tetrahidrofurano (THF), todos ellos de Sigma, y tetrakis (4-clorofenil) borato potásico de Fluka (Fluka, Madrid). Como cromoforo se empleó azul Nilo lipofilizado (1,2-benzo-7-(dietilamino)-3-(octadecanoilimino) fenoxazina), el cual fue sintetizado, purificado e identificado de acuerdo con Morf y colab. (1990), y Pandey y Prakash (1998). Como soporte se usó una lámina de 0,25 mm de espesor de politereftalato de etileno de tipo Mylar (Goodfellow, Cambridge, Reino Unido) que es ópticamente transparente, inerte y estable en las condiciones de trabajo.

### Preparación de la membrana

Las membranas sensoras para K(I) se prepararon a partir de disoluciones que contenían: 26 mg de PVC (28% p/p), 1,1 mg de TCFB (1,18% p/p), 1,3 mg de azul Nilo lipofilizado (1,46% p/p), 0,8 mg de éter dibenzo-18-corona-6 (0,86% p/p) y 63,5 mg NPOE (68,5% p/p) disueltos en 1,0 ml de THF recién destilado. Se depositan 20 µl de ese cóctel sobre una lámina de poliéster de 14 × 40 × 0,25 mm con ayuda de una micropipeta en el sistema centrífugo citado anteriormente. Se deja evaporar, obteniéndose una película circular sólida, homogénea, adherida

al soporte sólido, transparente y de color rojo. El espesor promedio de la membrana es de 4,7  $\mu\text{m}$  y la concentración de ionóforo, cromoionóforo y sal lipofílica en la membrana seca es de 24,1  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$  en cada uno de los componentes.

### Procedimiento experimental para el uso de las membranas

Se coloca una alícuota de una disolución conteniendo entre  $1 \times 10^{-4}$  y 100 mM de K(I) en un matraz de 50 mL junto con 5 mL de disolución reguladora de pH 9 de Tris 0,2 M enrasando con agua. 10 mL de la anterior disolución se sitúan en un tubo de polietileno de  $10 \times 1,5$  cm junto con la tira reactiva durante 5 minutos sin agitación. A continuación, se extrae la membrana y se realizan las medidas de acuerdo con el apartado siguiente. Las medidas se realizan a temperatura ambiente y las membranas no se acondicionan antes de usarlas.

### Medidas de absorbancia

La variación del espectro de absorción de la tira reactiva con la concentración de K(I) se muestra en la Figura 1a, que indica la presencia de un isobéptico a 580 nm mostrando la existencia de un equilibrio ácido-base. Como señal analítica utilizamos el grado de protonación  $\alpha_{\text{ef}}$  que es una absorbancia normalizada, definida según:

---


$$1 - \alpha_{\text{ef}} = \frac{A - A_{\text{base}}}{A_{\text{tampón}} - A_{\text{base}}} \quad (1)$$


---

donde  $A_{\text{base}}$  es la absorbancia de la tira de la después de introducirla en NaOH 0,01 M;  $A_{\text{tampón}}$  es la absorbancia después de introducirla en la disolución reguladora y A es la absorbancia de la tira en el problema conteniendo K(I).

### Medidas de reflectancia

El espectro de reflectancia de tiras reactivas tratadas de forma análoga a lo descrito en el apartado anterior se muestra en la Figura 1b, donde observa un isobéptico a 580 nm y una modificación de señal con la concentración de K(I) similar a la ya vista. Como parámetro analítico se utiliza una reflectancia normalizada definida por la ecuación (1), siendo el significado de los subíndices igual al anterior.

---


$$1 - \alpha_{\text{ef}} = \frac{r - r_{\text{base}}}{r_{\text{tampón}} - r_{\text{base}}} \quad (2)$$


---

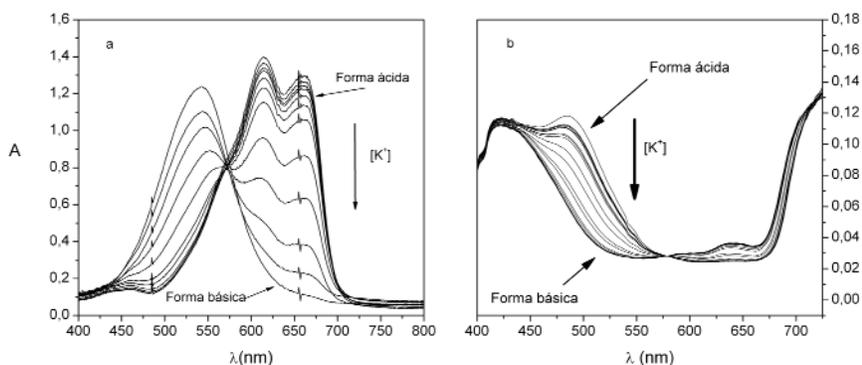
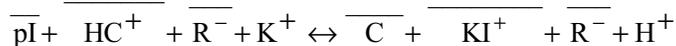


Figura 1. Espectros de absorción (a) y reflectancia (b) para diferentes concentraciones de  $K(I)$ . La forma básica tiene un máximo de absorción a 540 nm y la ácida a 610 y 660 nm; y en reflectancia para la forma básica a 638 nm y para la ácida a 482 y 424 nm.

## Resultados y discusión

### Mecanismo de sensado

Esta tira reactiva se basa en un proceso de cambio iónico entre una membrana de PVC plastificada y la fase acuosa con  $K(I)$  (Bakker, Bühlmann y Pretsch 1997). El reconocimiento selectivo de  $K(I)$  se logra mediante el ionóforo éter dibenzo18-corona-6 y la transducción óptica mediante un cromoionóforo selectivo a protones, azul Nilo lipofilizado. Ambos procesos se acoplan mediante una sal lipofílica presente en la membrana a la que confiere propiedades de cambio iónico. En consecuencia, la entrada de  $K(I)$  en la membrana para reaccionar con el ionóforo exige la salida de protones del cromoionóforo al objeto de mantener la electroneutralidad de la misma, lo cual lleva aparejado un cambio de color del cromoionóforo de la forma ácida a la básica (azul a rojo vinoso), según la reacción:



La relación entre el parámetro analítico  $\alpha_{ef}$  y la actividad en  $K(I)$  viene dada por la ecuación siguiente, siendo  $I_o$ ,  $C_o$  y  $R_o$  las concentraciones analíticas de ionóforo, cromoionóforo y sal lipofílica, respectivamente:

$$a_{K^+} = \left( \frac{a_{H^+} \alpha_{ef}}{1 - \alpha_{ef}} \right) \frac{K_e [(R_o - (1 - \alpha_{ef}) C_o)]}{[I_o - (R_o - (1 - \alpha_{ef}) C_o)]} \quad (3)$$

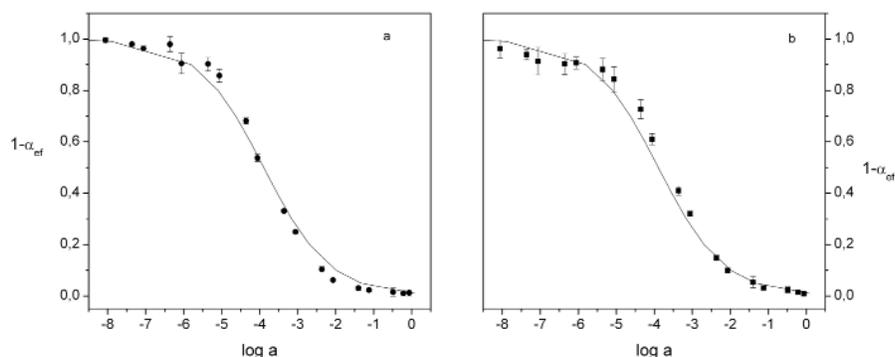


Figura 2. Ajuste al modelo teórico de los datos experimentales espectrofotométricos (curva b) y espectrorradiométricos (curva a).

Esta ecuación permitirá determinar ópticamente  $K(I)$  si se mantiene constante el valor de pH del problema con una disolución reguladora. Para comprobar la validez del modelo teórico se utilizaron los valores experimentales medidos para calcular el parámetro analítico  $\alpha_{ef}$  a partir de las medidas de absorbancia (medida a 660 nm) y de reflectancia (482 nm). La Figura 2 muestra el buen ajuste de los datos experimentales al modelo teórico, caracterizado por un valor de constante  $K_e$  de  $5,45 \pm 0,31$  para absorbancia y  $5,31 \pm 0,27$  para reflectancia. Considerando las incertidumbres experimentales observamos mayor precisión en las medidas espectrorradiométricas.

Tabla 1. Valores de  $1 - \alpha_{ef}$  y diferencias de color en unidades CIEDE2000 ( $\Delta E_{00}$ ).

Molaridad	log (actividad)	Absorbancia	Reflectancia	$\Delta E_{00}$
		Media ( $1 - \alpha_{ef}$ ) $\pm 5$	Media ( $1 - \alpha_{ef}$ ) $\pm 5$	
$1 \cdot 10^{-8}$	-8,06	$0,94 \pm 0,04$	$0,99 \pm 0,01$	
$5 \cdot 10^{-8}$	-7,36	$0,93 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,01$	0,167
$1 \cdot 10^{-7}$	-7,06	$0,92 \pm 0,04$	$0,96 \pm 0,01$	0,45
$5 \cdot 10^{-7}$	-6,36	$0,90 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,03$	0,423
$1 \cdot 10^{-6}$	-6,06	$0,91 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,04$	1,210
$5 \cdot 10^{-6}$	-5,36	$0,89 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$	0,227
$1 \cdot 10^{-5}$	-5,06	$0,85 \pm 0,01$	$0,86 \pm 0,03$	0,676
$5 \cdot 10^{-5}$	-4,36	$0,75 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,01$	3,324
$1 \cdot 10^{-4}$	-4,06	$0,61 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,01$	2,351
$5 \cdot 10^{-4}$	-3,36	$0,40 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,01$	3,736
$1 \cdot 10^{-3}$	-3,06	$0,33 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$	1,270
$5 \cdot 10^{-3}$	-2,37	$0,15 \pm 0,01$	$0,25 \pm 0,01$	2,403
$1 \cdot 10^{-2}$	-2,07	$0,10 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	0,548
$5 \cdot 10^{-2}$	-1,40	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	0,631
$1 \cdot 10^{-1}$	-1,12	$0,03 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	0,155
$5 \cdot 10^{-1}$	-0,49	$0,03 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,02$	0,072
1,0	-0,22	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$	0,082
1,5	-0,06	$0,01 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,12$	0,060

A partir de las medidas espectrorradiométricas de las tiras y del blanco de referencia, hemos calculado las coordenadas de color CIELAB (CIE 1986) para las tiras utilizadas con cada concentración de K(I). La Tabla 1 muestra las diferencias de color en unidades CIEDE2000 (CIE 2001, Melgosa y colab. 2001), entre tiras utilizadas con concentraciones consecutivas. Las diferencias de color muestran que solo 6 niveles de concentración tienen una diferencia  $\Delta E_{00} > 1$  en toda la gama estudiada. Esta diferencia podría considerarse como un umbral claramente discernible. Las pequeñas diferencias de color entre concentraciones consecutivas se explican porque los cambios en la reflectancia debidos a las distintas concentraciones se producen básicamente en las longitudes de onda 482 nm, 544 nm y 658 nm, permaneciendo muy parecidos los valores de reflectancia en el resto del espectro, según se observa en la Figura 1. En la actualidad se está estudiando el cambio de cromóforo por otro que permita una mejor percepción visual, lo que permitiría prescindir de instrumentación.

## Referencias bibliográficas

- ÁLVAREZ DE CIENFUEGOS-GALVEZ, P. 2003. *Sensores ópticos para calcio y magnesio. Estrategias, desarrollo y aplicaciones* (Granada: Universidad de Granada, tesis doctoral).
- BAKKER, E., P. BÜHLMANN y E. PRETSCH. 1997. "Carrier-based ion selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics", *Chem. Rev.* **97**, 3083-3132.
- BOBACKA, J., A. IVASKA y A. LEWENSTAM. 1999. "Plasticizer-free all-solid-state potassium-selective electrode based on poly (3-octylthiophene) and valinomycin", *Analytica Chimica Acta* **385**, 195-202.
- CIE (Commission Internationale de l'Éclairage). 1986. *Colorimetry*, 2da ed. (Viena: CIE Central Bureau, Public. 15.2.).
- . 2001. *Improvement to industrial colour-difference evaluation* (Viena: CIE Central Bureau, Public. 142).
- CAPITÁN-VALLVEY, L. F., M. D. FERNÁNDEZ RAMOS y P. ÁLVAREZ DE CIENFUEGOS-GALVEZ. 2002. "Optical test strip for calcium determination based on a neutral ionophore", *Analytica Chimica Acta* **451**, 231-241.
- CAPITÁN-VALLVEY, L. F., y M. D. FERNÁNDEZ RAMOS. 2003. "Solid-phase spectrometric assays", en *Integrated analytical systems*, ed. S. Alegret (Amsterdam: Elsevier Science, Wilson & Wilson Comprehensive Analytical Chemistry Series, XXXIX), 81-159.
- CAPITÁN-VALLVEY, L. F., M. D. FERNÁNDEZ RAMOS y M. AL-NATSHEH. 2003. "A disposable single-use optical sensor for potassium determination based on neutral ionophore", *Sensors and Actuators B* **88**, 217-222.
- CHARLTON, S. C., R. L. FLEMING y A. ZIPP. 1982. "Solid-phase colorimetric determination of potassium", *Clinical Chemistry* **28**, 1857-1861.

- HIRAYAMA, E., T. SUGIYAMA, H. HISAMOTO y K. SUZUKI. 2000. "Visual and colorimetric lithium ion sensing based on digital color analysis", *Analytical Chemistry* 72, 465-474.
- LEE, D., y J. D. R. THOMAS. 1994. "4'-Picrylamino-5'-nitrobenzo-18-crown-6 as a sensing reagent in potassium ion-selective electrode membranes", *Talanta* 41, 901-907.
- MELGOSA, M., M. M. PÉREZ, A. YEBRA, R. HUERTAS y E. HITA. 2001. "Algunas reflexiones y recientes recomendaciones internacionales sobre evaluación de diferencias de color", *Óptica Pura y Aplicada* 34, 1-10.
- MORF, W. E., K. SEILER, B. RUSTERHOLZ y W. SIMON. 1990. *Analytical Chemistry* 62, 738-742.
- PANDEY, P. C., y R. PRAKASH. 1998. "Polyindole modified potassium ion-sensor using dibenzo-18-crown-6 mediated PVC matrix membrane", *Sensors and Actuators B* 46, 61-65.
- SEILER, K., y W. SIMON. 1992. "Theoretical aspects of bulk optode membranes", *Analytica Chimica Acta* 266, 73-87.
- SUZUKI, K., E. HIRAYAMA, T. SUGIYAMA, K. YASUDA, H. OKABE y D. CITTERIO. 2002. "Ionophore-based lithium ion film optode realizing multiple color variations utilizing digital color analysis", *Analytical Chemistry* 74, 5766-5773.
- ÜNGER-HEUMANN, M. 1996. "Strategy of analytical test kits", *Fresenius Journal Analytical Chemistry* 354, 803-806.

# NEW IMAGE ANALYSIS PROTOCOL FOR POTASSIUM QUANTIFICATION USING DISPOSABLE SENSORS MEASURED BY AN OPTICAL FLATBED SCANNER

*A. Lapresta-Fernández and L.F. Capitán-Vallvey\**

*Solid Phase Spectrometry Research Group, Department of Analytical Chemistry,  
Campus Fuentenueva, Faculty of Sciences, University of Granada, E-18071 Granada,  
Spain.*

## ABSTRACT

We have applied a general image analysis protocol for the optimisation of scanner variables and treatment of digital images of the disposable sensor being studied. The most important achievement with this technique is that this treatment enhances the image quality without any loss of information; thus, it is possible to make quantitative determinations measuring potassium disposable sensors based on ionophore-chromoionophore chemistry using an instrument as simple as a conventional flatbed reflection scanner using colour management and a personal computer for image treatment. The analytical parameter, an estimated reflection density, is obtained using the average luminosity of a channel from an area of the sensing zone of the disposable sensor. The fit of the experimental results to the theoretical sigmoidal model and the precision of the results are used to optimise the scanner variables. Using this scanner protocol for measurement, it is possible to analyse potassium between  $6.58 \cdot 10^{-6}$  and  $10^{-2}$  M with a precision, expressed as RSD of  $\log a_{K^+}$ , ranging from 0.45 to 1.80 %. These results are good when compared to the same procedure using a DAD spectrophotometer in which the concentration range is  $1.25 \cdot 10^{-5}$  and  $7.68 \cdot 10^{-2}$  M and the precision range between 3.31 and 7.66 %.

## KEYWORDS

Scanner, image colour analysis, potassium determination, disposable sensor, digital image. Colour management

\*Corresponding author; e-mail: [lcapitan@ugr.es](mailto:lcapitan@ugr.es)

## 1. INTRODUCTION

The optical scanners most often used for different scientific purposes are based on linear imager charge couple device (CCD) technology. Their ability to capture images, digitise and quantify light intensity data directly into a computer has been used in very different fields, such as mineralogy [1], soil science [2], odontology [3], radiology [4], food processing [5], biology [6], archaeology [7] and so forth.

In the field of chemical analysis, scanners have been mainly used in two ways. The first is to obtain information on bidimensional separation procedures like thin layer chromatography [8] and electrophoresis in polyacrylamide gel used, as just one example, with immunoblots [9].

A second use of scanners is to obtain qualitative or quantitative information from analyses performed on a solid phase. The simplest case is monoanalyte determination. This is the case with protein determination on nitrocellulose paper based on the binding of dyes such as ponceau S and the use of the intensity values in the grey scale obtained from the image using the automatic exposure option [10]. A similar case is mercury semiquantitative determination in fish based on the collection of mercury vapour on a carboxymethylcellulose paper covered with  $\text{Cu}_2\text{I}_2$  [11]. The determination of iron (III) based on the colourimetric spot-test with thiocyanate [12] or povidone-iodine antiseptic agents [13], using a hand-scanner in both cases, is improved by linearising the responses by means of a principal component analysis.

Immunochromatographic procedures have been quantitatively evaluated using flatbed scanners; for instance, the analysis of immunoglobulin E, in the attomole range, is possible using carbon black particles as an antibody label [14] or, similarly, human chorionic gonadotropin (HGC) [15]. Others labels such as gold nanoparticles have been used for HGC determination in sandwich-type immunoassays [16] or biotin-tagged sulforhodamine B-loaded liposomes in rapid one-step strip immunoassays for biotin [17]. The combination of artificial neural network image analysis systems with scanner data has been used in a quantitative immunochromatographic strip for human serum  $\alpha$ -fetoprotein [18]. The combination of a conventional gas detector tube and an optical scanner has been used for monitoring unpleasant smells in the living environment [19].

Other uses rely on the microarray technology used in high-throughput gene analysis with applications in the quantitative analysis of gene expression, DNA

sequencing, disease diagnosis, etc, using different types of detection systems, including the scanner. Different schemes have been developed based on the use of this scanner. This is the case with nanoparticle-based detection schemes that use a gold nanoparticle probe with covalently bound oligonucleotides that are complementary to the target of interest [20]. Another case uses nonlabeled target molecules based on an electrostatic interaction between gold nanoparticles and hybridised target molecules [21] or colourimetric detection using enzymatic labels through biotin chemistry [22]. Protein microarrays used for proteomic profiling are also based on scanner measurement [23]. Another type of array, macroarrays in this case, has been proposed for different purposes such as a colourimetric array for volatile organic compounds (VOC) capable of discriminating around 100 VOC by means of different multicomponent techniques [24].

Different wet analytical procedures have been implemented in microtitre plates and measured using a scanner, as with protein [25] or toxicity tests based on microorganisms [26].

The different procedures based on image acquisition by means of a scanner show very different characteristics. Some of them only offer low quality semiquantitative characteristics while others need a very complicated treatment to extract analytical information. In this paper, we study the possible use of a scanner for the determination of an analyte in solution, namely potassium, with a disposable sensor. The goal is to demonstrate the possible use of inexpensive devices that can be used easily by anyone as an analytical instrument. We focus our attention on the image analysis system, colour management and image acquisition, obtaining analytical results of comparable quality with a conventional flatbed reflection scanner such as those produced by desktop spectrophotometers.

## **2. EXPERIMENTAL**

### *2.1. Reagents*

Potassium chloride stock solution (1.000 M) was prepared in water by exactly weighing analytical reagent grade dry KCl (Aldrich, Steinheim, Germany). Solutions of lower concentrations were prepared by dilution with water. Tris(hydroxymethyl) aminomethane 1 M pH 9.0 buffer solution was prepared from Tris and HCl supplied by Sigma (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, Spain). The activities were calculated

according to the two-parameter Debye-Hückel formalism [27].

For preparing the potassium sensitive films, high molecular weight poly (vinyl chloride) (PVC), dibenzo18-crown-6-ether, tributylphosphate (TBP) and tetrahydrofuran (THF) were purchased from Sigma and potassium tetrakis (4-chlorophenyl)borate (TCPB) was purchased from Fluka (Fluka, Madrid, Spain). The chromoionophore N,N-diethyl-5-(octadecanoylimino)-5H-benzo[a]phenoxazine-9-amine was synthesized, purified and characterized by us according to [28]. Sheets of Mylar-type polyester (Goodfellow, Cambridge, UK) were used as support. All chemicals used were of analytical-reagent grade. Reverse-osmosis type quality water (Milli-RO 12 plus Milli-Q station from Millipore) was used throughout.

## *2.2. Membrane preparation*

The membranes were produced on a polyester substrate using a spin-coating technique [29]. The sensing films were prepared from a solution of 26.0 mg (28.0 wt %) PVC, 63.0 mg (68.5 wt %) TBP, 0.8 mg (0.87 wt %) dibenzo-18-crown-6-ether, 1.3 mg (1.4 wt %) chromoionophore and 1.1 mg (1.2 wt %) TCPB dissolved in 1.0 mL of freshly distilled THF. The disposable sensors were cast by placing 20  $\mu$ L of the cocktail on a 14 mm x 40 mm x 0.5 mm thick polyester sheet using a homemade spin-coater rotating at 180 rpm. After spinning for 30 seconds, the membrane was removed from the spin coater and dried in a dryer with saturated THF atmosphere for few minutes at room temperature. In order to reduce the analysis time we prepared two or three sensing zones on the same Mylar sheet, producing two or three replicates per disposable sensor. The membranes prepared in this way were ready for use with the conventional measurement procedure.

## *2.3 Apparatus and Software*

To perform the scanner measurement a Microtek scanner model ScanMaker i700 (CA, USA) was used and to perform the absorbance measurements of the membranes, a Hewlett Packard diode array (DAD) spectrophotometer model 8453 (Nortwalk, CT, USA) equipped with a 44 mm high, 12 mm wide homemade membrane cell holder made of a matte black painted iron block and containing a 1 mm thick space for the introduction of the disposable sensor was used [30]. The acquisition and manipulation of the spectral data were carried out using the Chemstation software package supplied

by HP for absorbance measurements. Later statistical calculations were performed with the Statgraphics software package (Manugistics Inc. and Statistical Graphics Corporation, USA, 1992), version 6.0 STSC Inc. Statistical Graphics Corporations, USA, 1993, Graphmatica for Win 32 version 1:60d, 1998 edited by K. Hertzner and adapted by J. Garrido and Mathematica version 5.0, 1988-2003 (Wolfram Research) and Excel software (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) for general calculations. To perform the scanner measurement for colour analysis of the disposable sensor we used Adobe Photoshop CS version 8.0.1. (Adobe System Inc., CA, USA).

#### *2.4. Measurement conditions*

The response of the disposable sensors was evaluated by adding 8 mL of the test solution to a polyethylene plastic tube together with 2 mL of 0.1 M pH 9.0 Tris buffer solution. The disposable sensor was then introduced for 5 min into the tube without shaking. Additionally, the maximum and minimum values, corresponding to the fully protonated ( $I_{HC^+}$ ) and deprotonated ( $I_C$ ) forms of the chromoionophore necessary for calculation of  $\alpha_{eff}$  values, were measured by conditioning the disposable sensors in  $10^{-2}$  M Tris buffer and  $10^{-2}$  M NaOH. After equilibration, the membrane was pulled out of the solution and wiped to remove any solution droplets. Next, the disposable sensor was inserted into a homemade holder for the scanner and covered with a white lid in order to enhance the contrast when using the reflection flatbed scanner. The obtained images were stored in tiff file format. The colour information for each disposable sensor was decomposed into red, green and blue colours coming from RGB colour space and cyan, magenta and yellow for the CMYK colour space. This colour information was obtained from an area of the sensing zone of the disposable sensor, the Region of Interest (ROI), for each channel as an average value, using the optional histogram palette from Photoshop. Finally, these values were transferred to a spreadsheet for the data analysis. In order to compare the measurement procedure and to evaluate the performance of the scanner, the potassium disposable membranes were also measured using a DAD spectrophotometer working at 660 nm.

#### *2.5. Image analysis system and colour management*

Colour management is an important question in the capture, adjustment and impression of the digital images, because it makes it possible to understand and control

the image colours and their changes from one device to another [31].

First, it is important to calibrate the scanner to obtain a precise colour through the software. Since every input and output device has its own colour gamut, the colours are not consistent. A dedicated ICC-profile (the data file that characterises the colour space behaviour of a device) has to be generated for every input and output device. Within the workflow, the colour management system compares two profiles, that of the data sender, i.e. a scanner, to that of the data receiver, i.e. a monitor, and calculates a ratio for the conversion which translates the image data into the right colour. To obtain this colour correlation between the scanner and monitor we used an IT8 calibration target [5] which is designed to measure the performance of input devices and generate ICC profiles. With Silverfast software it is possible to manage the colour along with Adobe Photoshop [13]. The advantages of colour management in this study are: 1) it increases the reproducibility between the scanners; 2) it assures a better correspondence between real and virtual colours; and 3) it ensures better discrimination of similar colours between the corresponding concentrations.

## *2.6. Digitising and performing the image acquisition*

The acquisition of an image is probably the most important step in digital imaging. To find the best image conditions that include the analytical information, we studied the influence of the different variables involved such as exposure, contrast and brightness. This study was performed in the scanner preview mode and not with graphic editor software in order to avoid losing information working in 24 bits. While images in 48 bits offer a more resistant tonal range, we preferred to work using scanner preview. We studied nine different ways to obtain the digital image through the optimisation of the scanner parameters, as well as working with the image without any type of treatment, i.e., the scanned image as is. We studied all of these in terms of precision and matching experimental data to the theoretical sigmoidal model. The optimisation procedures studied were the following:

A) *No type of optimisation.* B) *Auto-adjustment using the auto-adjust command:* This is a quick and easy method wherein the highlight/shadow points are automatically optimised; colour cast removal is automatically applied depending on the scanner model and the image type selected. C) *Manual optimisation with four different strategies:* C.1) *Auto-adjust plus manual level adjustment:* with the use of the auto-adjust procedure

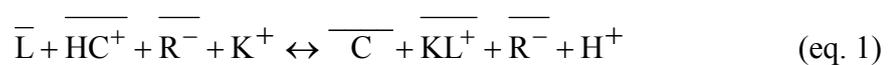
some defects in the histogram window of the different levels may appear. In this way, and in order to obtain maximum sensitivity, it is necessary to make a fine adjustment of the input levels in the different channels using their histogram palette, i.e., by moving one slider towards the end of the last pixel registered in the histogram and the other to the beginning; C.2) *Auto-adjust plus manual level adjustment plus B&W manual correction*: this is the same as the C.1 procedure plus one new step to improve the tonal range, through settling the black and white using two standards, a black matte sheet and a white styrene support; C.3) *Manual level adjustment*: this consists of the same procedure as in C.1 without any prior auto-adjust procedure, thus, all adjustments are manual; C.4) *Manual level adjustment plus B&W manual correction*: manual adjustment selecting the B&W readout from the black and white reference sheets.

The four remaining cases (D.1, D.2, D.3, D.4) were the same as the C cases, but with a new step consisting of the use of gradation curves [32]; [33]. These curves refer to the relationship between input and output, and an x-y graph represents the values of the luminosity of the input pixels (x axis) versus the values of the output pixel (y axis) [32]; [34]. Although there are different ways of using these gradation curves, here we used them to gain detail at the expenses of the clearest and darkest pixels [36]; [35], namely we maintained the slope of the straight line constant at intermediate values and smoothed the beginning and the end of the diagonal towards the nearest vertices. The gradation curve was improved to an S-shape; thus, the result was an image with dynamic depth and sharpness [37] (Figure 1). We use gradation curves for each C case, always after a level adjust step and before B&W correction.

Figure 1

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

The sensing mechanisms of the potassium disposable sensor rely on the ion-exchange equilibrium between the aqueous solution containing potassium ions and the sensing membrane as described by the next equation, in which barred species are in the membrane phase, assuming the formation of a 1:1 potassium complex:



The plasticized PVC sensing membrane contains the  $\text{K}^+$  selective ionophore L, which drives the reaction, the chromoionophore C selective for the  $\text{H}^+$  and a highly

lipophilic anion  $R^-$  that produces ion-exchange properties. According to the sensing scheme, the more potassium is transferred into the bulk membrane, the more chromoionophore is deprotonated and, hence the colour of the membrane turns from acidic form to basic [38].

The ion activities ratio  $a_{H^+}/a_{K^+}$  in aqueous phase is related to the equilibrium constant  $K_{\text{exch}}$  and the experimental parameter  $\alpha$  through the response function:

$$a_{I^{v+}} = \frac{1}{K_{\text{exch}}} \left( \frac{a_{H^+} \alpha}{1 - \alpha} \right)^v \frac{C_R - (1 - \alpha)C_C}{v \left( C_L - \frac{p}{v} (C_R - (1 - \alpha)C_C) \right)^p} \quad (\text{eq. 2})$$

where  $C_L$ ,  $C_C$  and  $C_R$  are the analytical concentrations of ionophore, chromoionophore and lipophilic anion, respectively, and  $p$  is the stoichiometric factor for the complex analyte:ionophore formed and  $v$  is the charge of the potassium cation. The extension of the ion-exchange process, i.e., the recognition process, can be measured by the degree of protonation  $1 - \alpha$  of the chromoionophore ( $[HC^+]/C_C$ ), which is the only measurable species in the membrane phase.

The logarithmic form of equation 2 shows a sigmoidal shape dependence between the activity of the analyte  $a_{I^{v+}}$  and the degree of protonation of chromoionophore. This  $\alpha$  value is evaluated by the optical property measured, which in the case of absorbance is:

$$1 - \alpha = \frac{A - A_C}{A_{HC^+} - A_C} \quad (\text{eq. 3})$$

In the working conditions, the chromoionophore cannot be fully protonated ( $1 - \alpha \cong 0.9$ ) at the working pH (9.0), for which reason we used an effective  $\alpha$  value,  $\alpha_{\text{eff}}$ , in order to use a measurement which gives us the degree of protonation with respect to the pH 9.0 buffer solutions [38]. Thus we calculated the maximum and minimum absorbance values, corresponding to the fully protonated ( $A_{HC^+}$ ) and deprotonated ( $A_C$ ) forms of the chromoionophore, necessary for the calculation of  $\alpha_{\text{eff}}$  values, which were measured by conditioning the disposable sensors in  $2 \times 10^{-2}$  M Tris buffer and  $10^{-2}$  M NaOH.

In our case the colourimetric changes in the sensing membrane were evaluated from the membrane images obtained with a scanner working in reflectance mode,

actually in transreflectance mode. The numerical data can be extracted from the images through the definition of a Region of Interest (ROI) for each sensing area. The colour pixel average, using RGB or CMYK space, for each ROI is used for the estimation of  $\alpha$ .

In this way the normalised parameter  $1-\alpha_{\text{eff}}$  is obtained using the luminosity  $L$  of the sensing zone, defined as the ratio between the average colour intensity of the correct component obtained from histogram ( $I_X$ ) and its maximum value ( $I_0$ ), obtained using a white lid, usually a value near its theoretical maximum value of 255. Using these values it is possible to obtain the effective reflection density, analogous to the absorbance in transmission mode [39], from the channel luminosity.

Thus, the  $1-\alpha_{\text{eff}}$  parameter can be defined as:

$$1-\alpha_{\text{eff}} = \frac{\left(-\log \frac{I_X}{I_0}\right) - \left(-\log \frac{I_{(\text{NaOH})_X}}{I_0}\right)}{\left(-\log \frac{I_{(\text{buffer})_X}}{I_0}\right) - \left(-\log \frac{I_{(\text{NaOH})_X}}{I_0}\right)} \quad (\text{eq. 4})$$

which can be simplified to:

$$1-\alpha_{\text{eff}} = \frac{\log(I_X) - \log(I_{(\text{NaOH})_X})}{\log(I_{(\text{buffer})_X}) - \log(I_{(\text{NaOH})_X})} \quad (\text{eq. 5})$$

The use of effective absorbance, or effective reflection as in the case that the scanner is working by transreflectance, obtained from the scanner has been used by different authors [41]; [40]; [25]; [12]; [13]; [42], but this parameter, as well as the image recorded by a scanner, depends on the characteristics of the object, on the composition of the light which is incident on the object and also on the properties of the recording device. The definition of the analytical parameter  $1-\alpha_{\text{eff}}$  according to eq. 4 has the property to be illuminant independent. This approach is similar to the chromaticity vector defined by Finlayson et al. [32] based on the histogram equalisation technique.

To obtain the disposable sensor image we used a homemade holder of white polystyrene that contains five cell holders to keep the sensors in the same position each time and increase their reproducibility (Figure 2). The disposable sensors were scanned covering them with a white lid in order to enhance the contrast when using a reflective flatbed scanner. The use of a white material to cover the object to be scanned is common [43], although the use of a black sheet has been described for the same purpose [44].

Figure 2

Thus, we transformed the average luminosity of the pixels included in the ROI into estimated reflection densities, which will be used as the scanner's analytical parameter in the theoretical sigmoidal model, and are similar to the expression used in spectrophotometer methodology. A scanner usually captures an image in three colour channels, RGB, and depending on the type of dyes used in the colour mosaic, they will have a different wavelength range and different spectral overlapping. As a first approximation, and considering the transmittance spectra of the sensing zone, with maxima at 482 nm and a second with lower intensity at 660 nm, we can conclude *a priori* that the best channels would be the blue and red channels [45].

There are more than 50 file formats in which images can be saved and stored, with the most common formats being jpeg, gif, png, tiff, bmp and pict. In order to maintain all the colour information translated into numerical information from different channels, needed for colour management, we chose an image format that makes storage possible without loss of information or file compression. Thus, we selected the tiff format which can also be intrinsically supported for all types of hardware environments, such as PC or Macintosh.

### **3.2. Influence of acquisition on the analytical parameter**

To study the different ways of image acquisition, previously described in the Experimental Section, using RGB and CMYK colour spaces, four different disposable sensors were prepared and measured at 10 different potassium concentration levels:  $1 \cdot 10^{-7}$ ,  $1 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-6}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-2}$  and 0.1 M. We select 16 bits per channel as the colour depth and 300 dots per inch (dpi) as the resolution, because these conditions maintain a good image quality and their tonal range is more resistant to possible histogram fractures that could involve the loss of information. Below, we discuss the results obtained using the different types of image acquisition used; in all cases we refer to each optimisation procedure by the number used to describe it in Section 2.6.

**RGB colour space.** As would be expected, the use of the red channel results in an experimental sigmoidal curve displaced to the right, that is, to a high activities range, and thus we discarded this channel because of its lower sensitivity. On the other hand, the use of data coming from the luminosity channel and the grey scale did not fit with the theoretical model. So, we only studied the green and blue channel values.

From the above experimental data coming from the different optimisation procedures studied, we discarded some additional cases: 1) **case B coming from the green and blue channels** shows bad precision as the average of some 20 % of the relative standard deviation (RSD) of  $1-\alpha_{\text{eff}}$ . 2) C.1, C.3, D.1 and D.3 cases, in which there is no black and white correction, due to the lack of relationship with the theoretical curve. Table 1 shows the  $1-\alpha_{\text{eff}}$  average values along with the RSD values for each concentration level obtained in the five remaining cases using blue and green channel data.

Table 1

From the experimental data from the green channel (Table 1) we observed worse results in terms of analytical parameter fit and precision than with the results coming from the blue channel. When we used the manually corrected auto-adjust (case C.2) or manual level adjustment (case C.4) the application range shortened for high concentrations and in similar cases, but when using gradation curves (case D.2) the range also shortened, but for low concentrations. Finally, we selected case D.4, manual correction auto-adjust plus gradation curve and B&W correction, because it offered a good fit with the theoretical model and improved the quality of the digital image. When we compared the results obtained without any image treatment (case A) with the selected case D.4, we found that the range was shorter at high concentrations in case A and had worse precision, generally speaking.

**CMYK colour space.** Similar to the results found for the RGB colour space, we discarded data coming from luminosity, grey scale and yellow and black channels, because there was no relationship with the theoretical model. For the cyan channel data we found the same behaviour as with the red channel in the RGB colour space. Working with the magenta channel data, the best optimisation system was the same D.4 case previously found for RGB, taking into account the application range and precision.

Table 2

We also worked with a modification of the CMYK colour space, namely the P&P from Silverfast, with very similar results over the previous CMYK space; the D.4 cases gave the best results.

In order to select the best colour space using the D.4 protocol, which gave the best results in all cases, we studied the precision in terms of the  $1-\alpha_{\text{eff}}$  signal at three concentration levels ( $1\cdot 10^{-5}$ ,  $1\cdot 10^{-3}$  and  $1\cdot 10^{-2}$  M) using 10 different disposable sensors.

The RGB data show the lowest RSD, between 0.7 and 4.5 %, while CMKY goes from 1.7 to 24 % and P&P CMKY goes from 0.9 to 8.5 %. Thus, we selected the RGB colour space with D.4 acquisition protocol.

We also studied the scanner precision in different positions of the scanner platform. To do this, the scanner glass surface was divided into 15 zones covering the entire surface and using four different disposable sensors equilibrated with a  $1 \cdot 10^{-4}$  M potassium solution. The precision (RSD) of the  $1-\alpha_{\text{eff}}$  signal coming from the sensors was between 2-3 %. Thus, it was possible to use the whole scanner platform.

### 3.3. Treatment image influence

Once the image of the sensor was obtained and stored in tiff format, we studied how different image treatment affects the precision of the signal (luminosity of the blue channel) and analytical parameter ( $1-\alpha_{\text{eff}}$ ). We used nine different strategies [48]; [47]; [46] for improving the image definition using Adobe Photoshop software. These strategies were: (i) sharpen (increase the contrast of adjacent pixels); (ii) sharpen more (increase the contrast three times more than sharpen);(iii) blur (decrease the contrast between adjacent pixels); (iv) blur more (the same as ii); (v) unsharp mask (USM) to control contrast (amount 200, 0.7 radio and threshold 2); (vi) high pass filter [49] (radio equal to 10 fitting the opacity); (vii) consists of applying a USM (300-0.7-5), then using the multiply mode (75 %) but compensating for the darkening by adjusting the midtones with the tool Levels (gamma 1.20); (viii) mask of luminance [46]; (ix) visualization mask [46].

All results for this study are shown in Table 3 including the precision, as RSD, of the blue channel signal of the ROI and  $1-\alpha_{\text{eff}}$  values. Generally speaking, the use of blur and blur more filters (iii and iv strategies) improves the precision but decreases the digital image quality, for which reason it was discarded. The focusing strategies (i, ii, v-ix) create an increase in the RSD values, except with procedure ix. In this last case, the improvement in image definition with no decrease in the precision of the luminosity of the ROI does not lead to better precision of the analytical parameter  $1-\alpha_{\text{eff}}$ . This is due, in this case, to the very definition of this  $1-\alpha_{\text{eff}}$  parameter as a relative luminosity. Consequently, in practice, we did not use any image treatment after acquisition.

Table 3

### 3.2. Measurement area of disposable sensors

To define the area of the image of the disposable sensor which we used to obtain the average luminosity, named the ROI, we conducted two studies, colour distribution and colour symmetry, on the data obtained working with three different sensors at three analyte concentration levels,  $1 \cdot 10^{-8}$ ,  $1 \cdot 10^{-4}$  and  $1 \cdot 10^{-2}$  M, using 48 bits and 300 dpi resolution.

The colour distribution in the circular sensing zone of the sensor was studied dividing the horizontal and vertical diameter into squares of 5x5 pixels each. The average luminosity of each square as a function of  $r/R$  ratio,  $r$  being the radius measured ( $r < R$ ) and  $R$  the radius of the sensing zone, is presented in Figure 3, showing a homogeneous colour distribution along both diameters up to the edge of the sensing area. To analyze the colour symmetry we obtained the average values of concentric circles of increasing radius from the middle of the sensing area [50]. Figure 3 shows the luminosity as a function of the diameter sensing zone ( $\Phi$ ). The highest size of ROI that shows good colour homogeneity and symmetry is that of 80x80 pixels ( $40.69 \text{ mm}^2$ ) from the maximum size of 120x120 pixels ( $91.6 \text{ mm}^2$ ), which involves an average value of working ROI of 5024 pixels.

### 3.4. Analytical characterisation

To characterise the sigmoidal relationship between the analytical parameter  $1 - \alpha_{\text{eff}}$  and potassium activity, a set of 11 potassium standard solutions containing between  $8.8 \cdot 10^{-9}$  and  $7.5 \cdot 10^{-2}$  M in activities ( $1 \cdot 10^{-8}$  and 0.1 M in concentration) were tested with 4 different sensing membranes (Figure 4). The experimental data follow the theoretical model, but with an apparent change in the 1:1 usual stoichiometry of the ionophore:potassium complex [38]. This behaviour can be ascribed to the inability of the scanner to discriminate wavelength, giving luminosity information of very broad wavelength ranges that cover in this case a spectral area corresponding, totally or partially, to the acidic and basic form of the chromoionophore and not only to the protonated form of this chromoionophore as with a spectrophotometer.

Figure 4

For calibration purposes we fit the middle of the sigmoidal function to a linear relationship, defined by means of a lack-of-fit test. To obtain this measurement range, we prepared and measured two series of potassium standards: one in the maximum

slope zone ( $4.37 \cdot 10^{-6}$  to  $8.72 \cdot 10^{-4}$  M in activities) and another in the zone of lowest activity ( $8.74 \cdot 10^{-9}$  and  $8.75 \cdot 10^{-7}$  in activities) using 4 standards in each zone with 4 replicates each. The linear functions obtained were: in the maximum slope zone:  $1-\alpha_{\text{eff}} = -0.6050 - 0.3146 \log a_{\text{K}^+}$ ; and in the minimum slope zone:  $1-\alpha_{\text{eff}} = 0.9526 - 0.0055 \log a_{\text{K}^+}$ . From the intercept of both functions we defined the detection limit DL (Table 4). As upper limit of the measuring range we used the highest value tested that fit the linear range (10mM). The concentration range obtained using the scanner is shorter than the range of the procedure based on measurement with a DAD spectrophotometer due to the apparent change in stoichiometry leading to a lower slope (-0.211 and -0.3146, respectively). Surprisingly, the DL found here is lower than the DL for the DAD spectrophotometer procedure ( $6.58 \cdot 10^{-3}$  and  $1.31 \cdot 10^{-2}$  mM, respectively) due to the displacement of the scanner-based response function to the left.

Table 4

The precision of the proposed instrumental procedure expressed as RSD of  $\log a_{\text{K}^+}$ , was evaluated at three concentration levels ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  M) using 10 different disposable sensors. The RSD range was from 0.45 to 1.80 %, a very acceptable precision considering the measuring system used and better than the results obtained for the same disposable sensor for potassium obtained with different instrumental systems. Thus, with a DAD spectrophotometer range between 3.31 and 7.66 % [38], using a portable electronic photometer it ranges between 1.6 and 2.1 % [51] and using a transfectance spectrophotometer it goes from 2.4 to 7.9 % [52]. These differences in precision, although the disposable sensors are the same and prepared in the same way, can be ascribed to the different areas used for measurement. In this case, we obtain average luminosity from an area of  $40.69 \text{ mm}^2$ , whereas we only use  $5 \text{ mm}^2$  coming from a  $2 \times 2.5$  slit for the DAD spectrophotometer used here for the measurement. The small differences in the sensing membranes are better averaged using a scanner as measurement system.

To demonstrate the trueness of the results given by the proposed measurement system, we prepared an experiment with 10 different disposable sensors working at three potassium concentration levels ( $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  and  $10^{-3}$  M), measuring with the scanner and with the DAD spectrophotometer, using in each case its own analytical parameter and calibration function. The results, expressed as  $\log a_{\text{K}^+}$ , obtained with the digital

scanner were plotted versus those from the DAD spectrophotometer, expecting a unity slope straight line when fitted by the least-squares method ( $y = 0.9897x - 0.0634$ ;  $r^2 = 0.96949$ ). This regression line was checked simultaneously for a slope not different from the unity and an intercept not different from zero, using an F-test [53] ( $F_{\text{cal}}$ : 0.10;  $F_{\text{theo}}$ : 4.46;  $\alpha$ : 0.05; n: 30).

#### 4. CONCLUSIONS

We have applied and demonstrated the viability of a flatbed scanner for the quantification of potassium in aqueous solution using disposable sensors. Using image analysis protocol we optimised the scanner variables. This protocol consists of three different aspects: i) colour management, which relates real colour to generated colour and makes it possible to decrease the scanner influence from one to another; ii) scanner calibration to verify the trueness of the colours generated and iii) image acquisition through the study of different related variables to obtain the maximum imaging information.

The average luminosity of a channel from the sensor image histogram is used to build the analytical parameter, relative luminosity, related through a sigmoidal function to the logarithm of potassium activity. With the described procedure based on a flatbed scanner it is possible to obtain the image of different disposable sensors simultaneously, thus decreasing the analysis time and reducing the possible cost of the analysis through the use of a very common and inexpensive device

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge financial support from the *Ministerio de Educación y Cultura, Dirección General de Enseñanza Superior* (Spain) from Projects CTQ2005-09060-CO2-01 and CTQ2005-09060-CO2-02). Thanks are also due to Paulo Porta for his collaboration.

#### REFERENCES

1. P. Armienti, S. Tarquini, *Lithos* 65 (2002) 273.
2. S. Aydemir, S. Keskin, L.R. Drees, *Geoderma* 119 (2004) 1.

3. A.G. Attaelmanan, E. Borg, H.G. Grondahl, Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod. 91 (2001) 611.
4. K.W. Schulze Ralf, T.R. Rosing Stephan, B. D'Hoedt, Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod. 94 (2002) 388.
5. D.W. Hatcher, S.J. Symons, U. Manivannan, J.Food Eng. 61 (2004) 109.
6. A.K. Davis, B.D. Farrey, S. Altizer, J.Therm.Biol. 30 (2005) 410.
7. D. Miriello, G.M. Crisci, J.Cult.Her. 7 (2006) 186.
8. M. Blazsek, O. Istvanfy, S. Roman, Chemicke Listy 98 (2004) 989.
9. B. Lewis, S. Rathman, R.J. McMahon, J.Nut.Biochem. 14 (2003) 196.
10. S.V. Bannur, S.V. Kulgod, S.S. Metkar, S.K. Mahajan, J.K. Sainis, Anal.Biochem. 267 (1999) 382.
11. A.V. Yallouz, Fresenius J.Anal.Chem. 366 (2000) 461.
12. M. Kompany-Zareh, M. Mansourian, F. Ravaee, Anal.Chim.Acta 471 (2002) 97.
13. M. Kompany-Zareh, S. Mirzaei, Anal.Chim.Acta 521 (2004) 231.
14. M. Lonngberg, J. Carlsson, Anal.Biochem. 293 (2001) 224.
15. A. van Amerongen, D. van Loon, L.B.J.M. Berendsen, J.H. Wichers, Clin.Chim.Acta 229 (1994) 67.
16. T. Yuhi, N. Nagatani, T. Endo, K. Kerman, M. Takata, H. Konaka, M. Namiki, Y. Takamura, E. Tamiya, J.Immunol.Methods 312 (2006) 54.
17. D. Martorell, S.T. Siebert, R.A. Durst, Anal.Biochem. 271 (1999) 177.
18. L. Chuang, J.Y. Hwang, H.C. Chang, F.M. Chang, S.B. Jong, Clin.Chim.Acta 348 (2004) 87.
19. Y. Tanaka, T. Nakamoto, T. Moriizumi, Sens.Actuators B B119 (2006) 84.
20. T.A. Taton, C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, Science 289 (2000) 1757.
21. Y. Sun, W.H. Fan, M.P. McCann, V. Golovlev, Anal.Biochem. 345 (2005) 312.
22. J. Petersen, M. Stangegaard, H. Birgens, M. Dufva, Anal.Biochem. 360 (2007) 169.
23. S. Nishizuka, N.R. Washburn, P.J. Munson, BioTechniques 40 (2006) 442,444,446,448.
24. M.C. Janzen, J.B. Ponder, D.P. Bailey, C.K. Ingison, K.S. Suslick, Anal.Chem. 78 (2006) 3591.

25. N.C. Birch, D.F. Stickle, *Clin.Chim.Acta* 333 (2003) 95.
26. J. Gabrielson, I. Kuhn, P. Colque-Navarro, M. Hart, A. Iversen, D. McKenzie, R. Mollby, *Anal.Chim.Acta* 485 (2003) 121.
27. P.C. Meier, *Anal.Chim.Acta* 136 (1982) 363.
28. W.E. Morf, K. Seiler, B. Rusterholz, W. Simon, *Anal.Chem.* 62 (1990) 738.
29. K. Seiler, W. Simon, *Anal.Chim.Acta* 266 (1992) 73.
30. L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernández-Ramos, P. Alvarez de Cienfuegos, F. Santoyo-Gonzalez, *Anal.Chim.Acta* 481 (2003) 139.
31. L.W. MacDonald, *Displays* 16 (1996) 203.
32. G. Finlayson, S. Hordley, G. Schaefer, G.Y. Tian, *Patt.Recog.* 38 (2005) 179.
33. Silverfast, Herramientas, in *SilverFast Manual*, 2004, p. 87.
34. L. Yu, X. Niu, S. Sun, *Imag.Vis.Comp.* (2005) 1.
35. P. Porta, Ajuste de curvas: Agarraros (2005).  
<http://www.quesabesde.com/camdig/articulos.asp?articulo=111>.
36. R. Fernández, Retoque digital. Ajuste de color usando curvas (2007).  
<http://www.virtual-ub.org/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=29>.
37. Canon INC, Image-quality Improvement Technologies (2007).  
[http://www.canon.com/technology/canon\\_tech/explanation/image\\_processing.html](http://www.canon.com/technology/canon_tech/explanation/image_processing.html).
38. L.F. Capitán-Vallvey, M.D. Fernandez Ramos, M. Al Natsheh, *Sens.Actuators B* B88 (2003) 217.
39. J. Greyson, *J.Autom.Chem.* 3 (1981) 66.
40. A. Abbaspour, M.A. Mehrgardi, A. Noori, M.A. Kamyabi, A. Khalafi-Nezhad, M.N. Soltani Rad, *Sens.Actuators B* B113 (2006) 857.
41. A.P. Goodey, J.J. Lavigne, S.M. Savoy, M.D. Rodriguez, T. Curey, A. Tsao, G. Simmons, J. Wright, S.J. Yoo, Y. Sohn, E.V. Anslyn, J.B. Shear, D.P. Neikirk, J.T. McDevitt, *J.Am.Chem.Soc.* 123 (2001) 2559.
42. M. Lancaster, D.M. Goodall, E.T. Bergstroem, S. McCrossen, P. Myers, *Anal.Chem.* 78 (2006) 905.
43. J. Gabrielson, M. Hart, A. Jarelov, I. Kuhn, D. McKenzie, R. Mollby, *Journal of Microbiological Methods* 50 (2002) 63.
44. G. van Dalen, *Food Res.Intern.* 37 (2004) 51.

45. . R. Huertas, M. Melgosa, F. Martinez-Verdu; A Lapresta-Fernandez; M.D. Fernandez-Ramos; L.F. Capitan-Vallvey. ARGENCOLOR 2004, (2006) 45.
46. P. Porta Mejorar el enfoque (2005). <http://www.quesabesde.com/camdig/articulos.asp?articulo=120>.
47. G.S. Muñoz, M.H. Reichmann, Enfocar con el filtro de paso alto (2001). [http://www.gusgsm.com/enfocar\\_paso\\_alto](http://www.gusgsm.com/enfocar_paso_alto).
48. M.H. Reichmann, High pass sharpening (2007) <http://www.luminous-landscape.com/>.
49. P. Bleic, Digital photographs: From camera to Photoshop (2007). <http://home.comcast.net/~bleicher/>.
50. K.L. Yam, S.E. Papadakis, J.Food Eng. 61 (2004) 137.
51. A.J. Palma, A. Lapresta-Fernandez, J.M. Ortigosa-Moreno, M.D. Fernandez-Ramos, M.A. Carvajal, L.F. Capitan-Vallvey, Anal.Bioanal.Chem. 386 (2006) 1215.
52. I. Orbe Paya, M. Erenas, L.F. Capitan-Vallvey, Sens.Actuators B in press (2006).
53. D.L. Massart, A. Dijkstraand L. Kaufman, Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures: a survey of statistical and mathematical techniques, Elsevier, Amsterdam, 1978.

Table 1. Comparison of  $1-\alpha_{\text{eff}}$  as analytical parameter obtained from green and blue channels of the scanner.

[K <sup>+</sup> ] M (Green Channel)	Acquisition strategies (see text)									
	A		C.2		C.4		D.2		D.4	
	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD %	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD %	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD %	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD %	$1-\alpha_{\text{eff}}$	RSD %
$1 \cdot 10^{-7}$	0.91	2.13	0.92	5.57	0.70	7.71	1.03	1.20	0.82	7.34
$1 \cdot 10^{-6}$	0.82	5.25	0.61	11.03	0.61	16.05	0.91	9.11	0.58	13.60
$5 \cdot 10^{-6}$	0.72	4.83	0.49	9.65	0.30	14.18	0.94	5.99	0.52	12.12
$5 \cdot 10^{-5}$	0.50	7.33	0.24	11.94	0.22	18.02	0.49	13.09	0.19	10.72

1·10 <sup>-4</sup>	0.49	7.71	0.26	16.37	0.13	17.60	0.49	11.09	0.14	13.75
5·10 <sup>-4</sup>	0.43	10.97	0.12	17.69	0.10	22.51	0.30	19.28	0.13	16.34
1·10 <sup>-3</sup>	0.36	13.48	0.13	21.66	0.06	18.33	0.34	17.32	0.10	19.20
1·10 <sup>-2</sup>	0.19	14.63	0.09	19.14	0.03	14.20	0.11	21.23	0.04	11.36
5·10 <sup>-2</sup>	0.04	33.37	0.03	48.32	0.01	28.28	0.01	302.28	0.00	54.31
0.1	0.02	22.82	0.00	73.97	0.00	56.53	0.00	447.81	-0.01	73.79
<b>[K<sup>+</sup>] M (Blue Channel)</b>	<b>1-<math>\alpha_{\text{eff}}</math></b>	<b>RSD %</b>								
1·10 <sup>-7</sup>	0.90	1.27	0.90	1.63	0.87	1.55	0.91	0.88	1.61	0.88
1·10 <sup>-6</sup>	0.79	4.11	0.86	3.85	0.80	4.65	0.84	0.83	4.66	0.83
5·10 <sup>-6</sup>	0.72	3.03	0.83	2.79	0.79	3.41	0.83	0.79	3.42	0.79
5·10 <sup>-5</sup>	0.56	3.24	0.58	3.65	0.59	3.89	0.61	0.59	4.17	0.59
1·10 <sup>-4</sup>	0.40	3.77	0.50	1.66	0.44	3.16	0.44	0.38	2.87	0.38
5·10 <sup>-4</sup>	0.22	3.39	0.22	1.56	0.25	4.16	0.24	0.27	4.67	0.27
1·10 <sup>-3</sup>	0.14	6.07	0.19	3.62	0.21	6.18	0.22	0.22	4.61	0.22
1·10 <sup>-2</sup>	0.02	57.06	0.00	436.25	-0.37	7.57	0.09	0.05	36.68	0.05
5·10 <sup>-2</sup>	0.00	101.55	0.02	21.18	-0.47	4.53	0.04	0.03	34.51	0.03
0.1	-0.01	33.22	0.05	12.86	-0.02	77.92	0.00	-0.03	29.42	-0.03

Table 2. Analytical parameter (1-  $\alpha_{\text{eff}}$ ) obtained for magenta channel from CMYK and P&P CMYK colour space.

<b>[K<sup>+</sup>] M</b>	<b>Acquisition strategies (see text)</b>							
	<b>A</b>		<b>D.4</b>		<b>A</b>		<b>D.4</b>	
	<b>Magenta Channel in CMYK</b>				<b>Magenta Channel in P&amp;P CMYK</b>			
	<b>1-<math>\alpha_{\text{eff}}</math></b>	<b>RSD %</b>						
1·10 <sup>-7</sup>	0.80	5.56	0.88	3.73	0.80	5.42	0.87	7.45
1·10 <sup>-6</sup>	0.49	15.58	0.69	8.33	0.59	13.71	0.75	6.40
5·10 <sup>-6</sup>	0.40	12.59	0.61	5.44	0.48	9.82	0.63	2.65
5·10 <sup>-5</sup>	0.10	25.63	0.30	12.59	0.20	14.31	0.49	7.67

$1 \cdot 10^{-4}$	0.11	15.58	0.17	10.61	0.15	15.04	0.26	11.83
$5 \cdot 10^{-4}$	0.01	35.79	0.09	19.23	0.03	28.16	0.14	20.60
$1 \cdot 10^{-3}$	0.00	72.46	0.03	31.47	0.00	52.77	0.08	232.67
$1 \cdot 10^{-2}$	0.00	431.52	0.00	189.46	0.00	198.50	0.00	124.21
$5 \cdot 10^{-2}$	0.00	60.58	0.00	140.61	0.00	105.32	0.00	48.30
0.1	0.00	59.19	0.00	81.37	0.00	39.52	0.00	44.40

Table 3. Treatment image influence using different strategies for image enhancement.

[K <sup>+</sup> ] M	Strategy (see text)									
	48 bits\300 dpi		i		ii		iii		iv	
	s	RSD %	S	RSD %	s	RSD %	s	RSD %	s	RSD %
$1 \cdot 10^{-8}$	8.20	1.58	12.49	1.82	16.73	1.58	7.15	1.65	6.49	1.56
$5 \cdot 10^{-8}$	7.85	1.14	11.69	1.08	15.62	1.27	6.73	1.33	6.57	1.21
$1 \cdot 10^{-7}$	7.29	1.75	11.14	1.58	15.19	1.90	6.40	1.85	5.86	1.89
$1 \cdot 10^{-6}$	7.92	1.44	11.54	1.33	15.85	1.21	6.57	1.26	6.25	1.19
$5 \cdot 10^{-6}$	8.44	0.99	12.56	1.11	17.24	0.88	7.56	0.94	7.52	0.60
$5 \cdot 10^{-5}$	8.86	3.24	13.42	3.11	18.04	3.25	7.70	3.35	7.55	3.22

$1 \cdot 10^{-4}$	11.32	4.02	16.62	3.63	22.21	3.61	10.32	3.43	10.25	4.10
$5 \cdot 10^{-4}$	13.72	9.15	14.05	8.76	24.98	8.81	12.45	8.73	11.97	8.13
$1 \cdot 10^{-3}$	14.03	10.05	19.32	11.09	25.25	9.22	12.77	10.34	12.31	10.34
$1 \cdot 10^{-2}$	14.45	24.27	19.21	25.98	25.25	26.48	12.88	25.96	12.71	24.75
$5 \cdot 10^{-2}$	13.23	28.30	18.48	24.60	24.34	27.91	12.27	31.01	11.78	26.56
0.1	13.72	104.75	19.14	112.97	25.26	118.25	12.13	120.01	12.41	109.46
[K <sup>+</sup> ] M	Strategy (see text)									
	v		vi		vii		viii		ix	
	s	RSD %	S	RSD %	s	RSD %	s	RSD %	s	RSD %
$1 \cdot 10^{-8}$	13.23	1.98	11.08	1.72	13.32	1.93	11.51	1.66	8.99	1.59
$5 \cdot 10^{-8}$	12.83	1.73	10.74	1.55	12.95	1.40	11.20	1.28	9.13	1.10
$1 \cdot 10^{-7}$	11.77	2.42	10.44	1.97	12.12	2.61	10.48	2.10	8.34	2.95
$1 \cdot 10^{-6}$	12.40	1.69	10.54	1.22	12.73	1.51	11.14	1.58	9.18	1.46
$5 \cdot 10^{-6}$	13.79	1.37	11.56	0.53	13.63	1.25	12.12	1.11	9.74	1.18
$5 \cdot 10^{-5}$	14.34	3.39	12.46	2.44	14.01	3.74	12.89	3.03	10.33	3.11
$1 \cdot 10^{-4}$	18.28	4.29	15.95	4.32	16.15	5.30	16.67	3.76	13.29	3.54
$5 \cdot 10^{-4}$	20.60	9.15	18.67	11.44	14.73	10.99	18.85	9.80	14.99	9.12
$1 \cdot 10^{-3}$	21.26	9.26	18.83	14.39	17.24	12.97	19.38	10.47	15.61	10.21
$1 \cdot 10^{-2}$	20.93	22.11	19.05	87.08	15.65	22.41	19.33	17.79	16.52	13.89
$5 \cdot 10^{-2}$	20.74	52.66	18.05	71.88	14.98	19.15	18.35	17.26	15.65	17.85
0.1	20.87	116.93	18.39	122.44	14.70	123.49	18.84	70.21	15.46	82.20

Table 4. Analytical parameters of the K<sup>+</sup> scanner procedure

Parameter	Value
Intercept	-0.6050

Intercept standard deviation	0.0609	
Slope	-0.3146	
Slope standard deviation	0.0173	
Determination coefficient ( $R^2$ )	0.9706	
Linearity on-line (%)	94.5	
RSD (%)	$1 \cdot 10^{-5}$ M	0.45
	$1 \cdot 10^{-4}$ M	1.52
	$1 \cdot 10^{-3}$ M	1.80
Detection limit (M)	$6.58 \cdot 10^{-6}$	
Linear range (M)	$6.58 \cdot 10^{-6} - 10^{-2}$	

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Gradation curve used. Pairs of values: 0,0; 32,16; 64,43; 128,128; 192,216; 224,239; 255,255.

**Figure 2.** Homemade support used to capture image by the desktop scanner.

**Figure 3.** ROI colour symmetry for 48 bits and 300 dpi. 1) values along x-axis, filled circle, and y axis, filled squares. 2) integration circular zone a) corresponding to  $1 \cdot 10^{-8}$  M; b) corresponding to  $1 \cdot 10^{-4}$  M and c) corresponding to  $1 \cdot 10^{-2}$  M.

**Figure 4.** Theoretical response curve for potassium disposable sensor and experimental data. Solid sigmoid corresponds to  $v=0.5$  and broken sigmoid to  $v=1$ . Dotted line corresponds to detection limit.

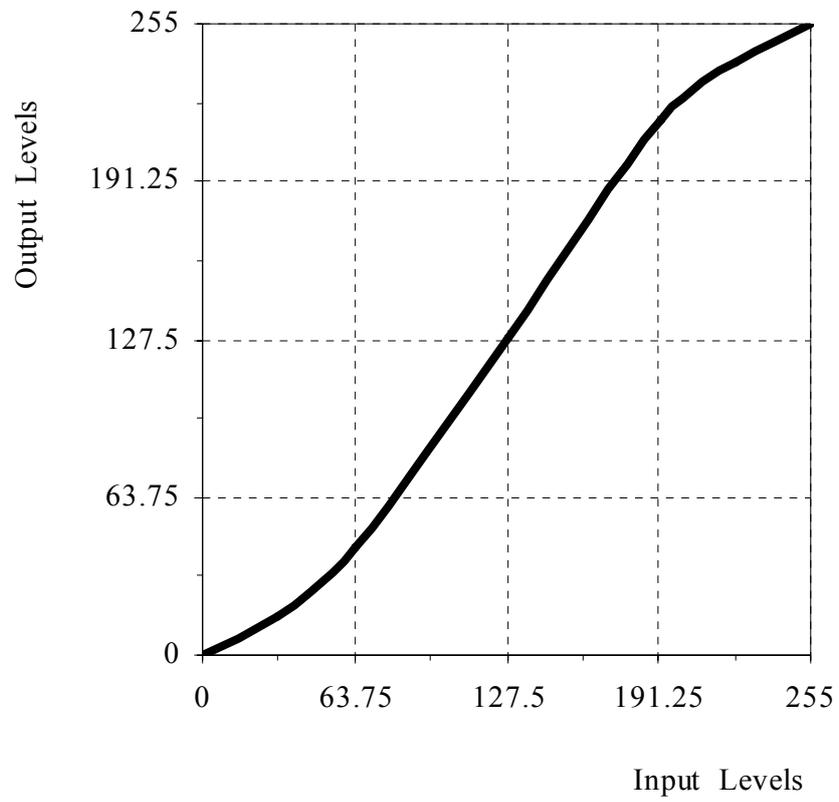


Figure 1

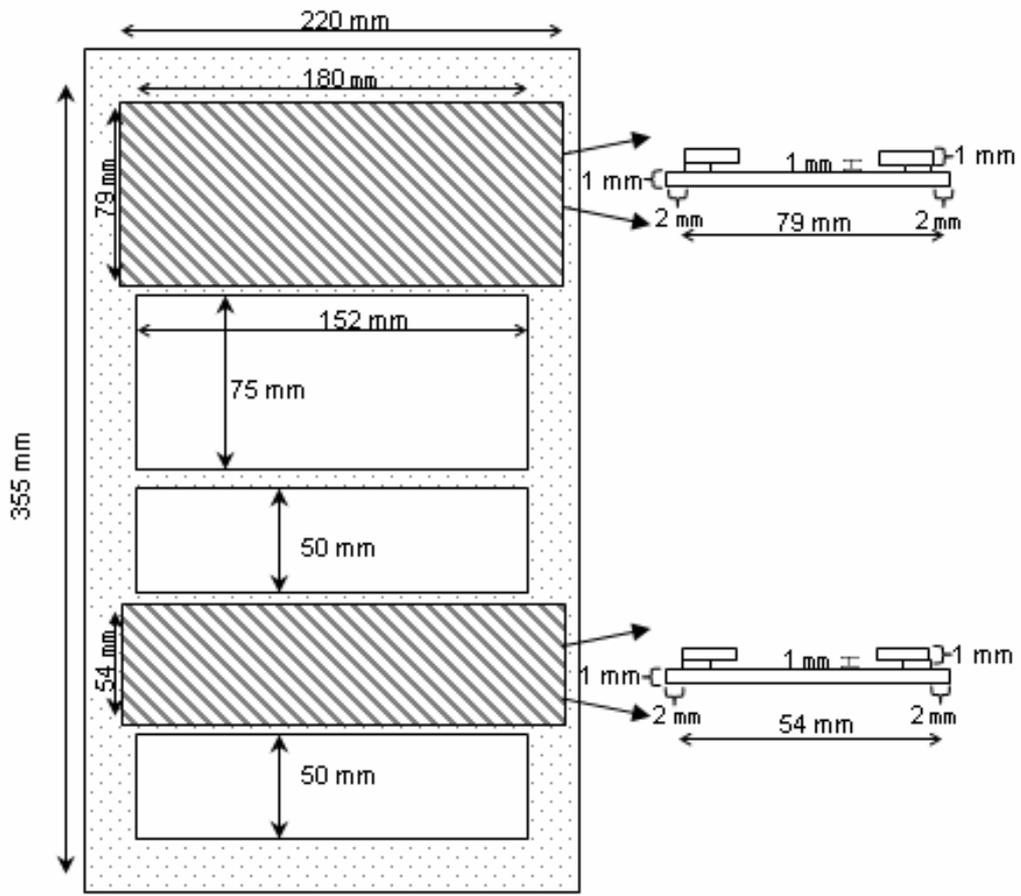


Figure 2

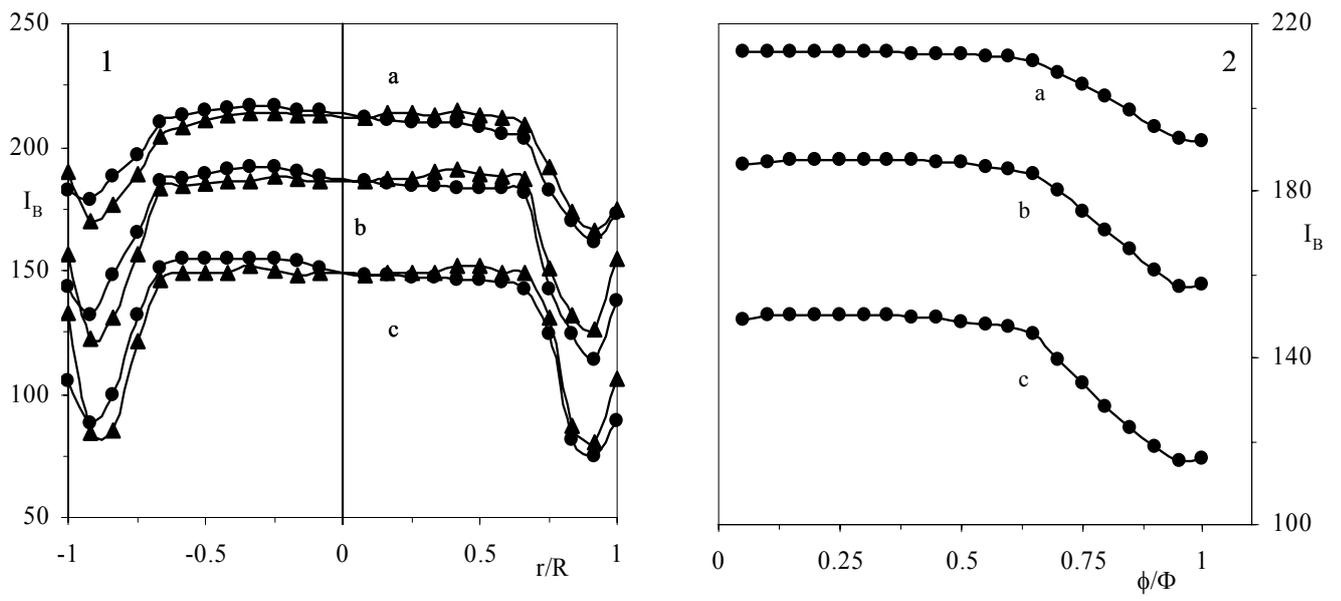


Figure 3

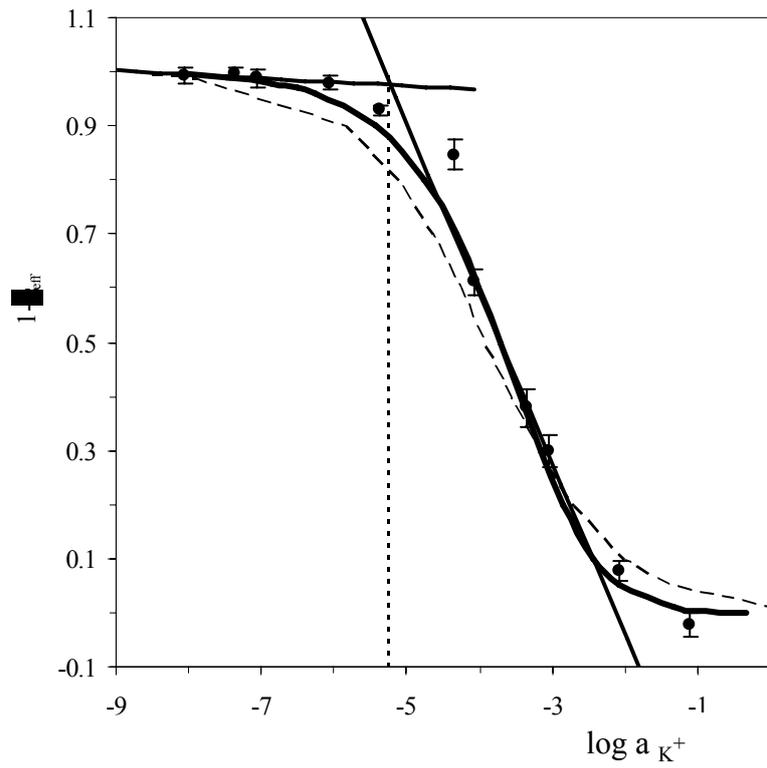


Figure 4

