

# TESIS DE MÁSTER



MÁSTER EN QUÍMICA

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**SENSOR SOLVATOCRÓMICO PARA  
LENGUAS ELECTRÓNICAS ÓPTICAS  
DE UN SOLO USO**





*ugr* | Universidad  
de **Granada**

**MEMORIA DE LOS  
CONOCIMIENTOS ADQUIRIDOS EN  
LOS PERIODOS DE  
DOCENCIA E INVESTIGACIÓN  
TUTELADA**

MÁSTER EN QUÍMICA

Área de conocimiento: Química Analítica

Por

José Manuel Sánchez Hernández

Granada, septiembre de 2009.



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>2. PERIODO DE DOCENCIA.....</b>	<b>8</b>
<b>3. PERIODO DE INVESTIGACIÓN TUTELADA.....</b>	<b>10</b>
3.1 <i>Introducción.....</i>	11
3.2 <i>Objetivos.....</i>	14
3.3 <i>Solvatocromismo. Polaridad y Efecto solvatocrómico.....</i>	14
3.4 <i>Espacios de color RGB y HSV.....</i>	16
3.5 <i>Selección de indicadores solvatocrómicos.....</i>	21
3.6 <i>Materiales y reactivos empleados.....</i>	28
3.7 <i>Instrumentación usada.....</i>	29
3.8 <i>Preparación de las membranas.....</i>	30
3.9 <i>Optimización de las membranas.....</i>	33
3.10 <i>Medida de las membranas.....</i>	36
3.10.1 <i>Medidas de absorbancia.....</i>	38
3.10.2 <i>Medidas de color (RGB y H).....</i>	45
3.11 <i>Caracterización analítica.....</i>	52
3.11.1 <i>Calibración.....</i>	53
3.11.2 <i>Límite de detección.....</i>	56
3.11.3 <i>Límite de cuantificación.....</i>	56
3.11.4 <i>Rango dinámico lineal.....</i>	57
3.11.5 <i>Precisión.....</i>	57
3.11.6 <i>Exactitud.....</i>	60
<b>4. PLANTEAMIENTO A CORTO PLAZO.....</b>	<b>62</b>
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>68</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**

La enseñanza y la investigación en todas las áreas de la Química han contado con una gran tradición en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. Hasta 1987, la Facultad de Ciencias era responsable de los estudios de Doctorado en aquellas áreas de su competencia, ofreciéndose una serie de cursos monográficos comunes.

Hasta 1998, año en el que se publicó en el BOE el Real Decreto 778/1998 por el que se regulan los estudios universitarios de Tercer Ciclo, la obtención y expedición del título de Doctor y otros estudios de Postgrado, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, cada Departamento de Química ofertaba su propio programa de Doctorado.

Tras sucesivas adaptaciones a las normativas vigentes, en el año 2005 se obtuvo la Mención de Calidad para el programa de Doctorado interdepartamental “Química”, que, con diversas modificaciones, se viene impartiendo desde hace años en la Universidad de Granada. En el curso académico 2006-2007, el programa de Doctorado “QUÍMICA” se integró en el Espacio Europeo de Educación Superior y de Investigación, pasando a Postgrado una vez lo aprobó el Consejo de Gobierno de la Universidad y lo autorizó la Comunidad Autónoma de Andalucía (BOE 30 Agosto 2006).

Para la valoración de los Períodos de Docencia y de Investigación Tutelada, así como de los conocimientos adquiridos por el graduado, se atenderá a lo dispuesto en los artículos 19 al 23 del título IV de las “Normas Reguladoras de los Estudios de Tercer Ciclo y del Título de Doctor por la Universidad de Granada” y al acuerdo de la Comisión de Doctorado en su sesión de 28 de marzo de 2007, con directrices sobre la evaluación de los trabajos de investigación tutelada en Másteres Oficiales.

## **2. PERIODO DE DOCENCIA**

El alumno deberá cursar 60 créditos europeos (ECTS) para obtener el título de Máster en Química por la Universidad de Granada, del total de 72 créditos globales ofertados entre los cuatro Departamentos participantes. El Máster consta de enseñanza teórica (48 créditos ECTS) y Tesis de Máster (24 créditos ECTS). La enseñanza teórica se integra en tres módulos. Los dos primeros, de 12 créditos cada uno, tienen carácter troncal. El tercer módulo, de 24 créditos, incluye las materias optativas, y el alumno, en colaboración con el profesor-tutor asignado, seleccionará 12 créditos de los 24 ofertados.

Durante el curso 2008-2009 personalmente me matriculé y he cursado los 60 créditos ECTS, en las asignaturas que se especifican a continuación.

<b>MODULO 1</b>			
<b>ASIGNATURA</b>	<b>TIPO</b>	<b>C</b>	<b>DEPARTAMENTO</b>
<b>Técnicas separativas avanzadas</b>	Troncal	3	Química Analítica
<b>Espectroscopía avanzada</b>	Troncal	3	Química Física
<b>Determinación estructural de compuestos orgánicos</b>	Troncal	3	Química Orgánica
<b>Química de la coordinación: estructura electrónica, propiedades y técnicas de caracterización y estudio</b>	Troncal	3	Química Inorgánica

<b>MODULO 2</b>			
<b>ASIGNATURA</b>	<b>TIPO</b>	<b>C</b>	<b>DEPARTAMENTO</b>
<b>Sensores químicos</b>	Troncal	3	Química Analítica
<b>Avances en química orgánica</b>	Troncal	3	Química Orgánica
<b>Avances en química física</b>	Troncal	3	Química Física
<b>Sólidos biocompatibles. Biomateriales</b>	Troncal	3	Química Inorgánica

<b>MODULO 3</b>			
<b>ASIGNATURA</b>	<b>TIPO</b>	<b>C</b>	<b>DEPARTAMENTO</b>
<b>Control analítico ambiental y alimentario</b>	Optativa	2	Química Analítica
<b>Química bioinorgánica</b>	Optativa	2	Química Inorgánica
<b>Caracterización físico - química de adsorbentes</b>	Optativa	2	Química Inorgánica
<b>Química orgánica verde y bio - transformaciones</b>	Optativa	2	Química Orgánica
<b>Espectroscopía atómica analítica</b>	Optativa	2	Química Analítica
<b>Química organometálica</b>	Optativa	2	Química Inorgánica

<b>MODULO 4</b>			
<b>ASIGNATURA</b>	<b>TIPO</b>	<b>C</b>	<b>DEPARTAMENTO</b>
<b>Tesis de máster</b>	Obligatoria	24	Química Analítica

### 3. PERIODO DE INVESTIGACIÓN TUTELADA

En el presente curso académico 2008-2009, me matriculé en el Máster en Química de la Universidad de Granada, con el objetivo de comenzar los estudios de tercer ciclo, dentro de un proyecto presentado en el programa de doctorado "Lenguas electrónicas ópticas de un solo uso", bajo la dirección de los profesores de esta investigación tutelada, Dr. D. Luís Fermín Capitán Vallvey y Dr. D. Ignacio de Orbe Payá.

A continuación se describe brevemente el trabajo que se pretende desarrollar así como los objetivos del mismo.

*El objetivo es la preparación de lenguas electrónicas<sup>1,2,3</sup> de tipo óptico de un sólo uso para su lectura mediante instrumentación portátil que sirvan para la caracterización de productos diversos. En la actualidad existe la necesidad, y hay un mercado potencial, de instrumentación portátil para la determinación "in situ" y simultánea de diversos analitos o para la identificación y caracterización de productos. Las aplicaciones de estos dispositivos son amplias existiendo diversos instrumentos comerciales. Así en alimentación para identificación y caracterización de bebidas alcohólicas, aceites, quesos, carnes, aguas, en agricultura para fertirrigación o para evaluación de maduración de frutos.*

*Para ello el principal propósito que nos hemos planteado es el desarrollo de una lengua óptica basada en una matriz de sensores, orientado específicamente para la caracterización de bebidas alcohólicas como vinos, cerveza, licores, etc. donde la información dada por cada sensor es complementaria y la combinación de todos los resultados de los sensores genera una **huella digital única**. Dicho sensor estará asociado a un método apropiado de reconocimiento de pautas y/o calibración multivariante para el procesamiento de datos a través de la correspondiente instrumentación desarrollada para dicha finalidad (ésta reconoce un patrón de especies, característico de un determinado tipo de muestra y la podrá clasificar).*

A continuación se presenta una memoria detallada del trabajo de investigación llevado a cabo con tal propósito durante este periodo de iniciación a la investigación.

### **3.1 Introducción**

Una de las tendencias actuales en Química Analítica es el desarrollo de metodología analítica que pueda ser usada donde se necesite por parte del usuario sin que sea necesaria una cuidadosa toma de muestra, conservación, transporte y ejecución del análisis en el laboratorio analítico por parte de personal especializado.

Entre las posibles soluciones a este problema, que se han ensayado, una de ellas es el uso de métodos rápidos de análisis que se puedan llevar a cabo *in situ*. Con este tipo de sistemas de análisis se pasa de obtener la información en el laboratorio, a conseguirla en el lugar donde se necesite. De las diversas formas de llevar a cabo este tipo de métodos, una de las más interesantes es la utilización de ensayos rápidos. Estos últimos permiten llevar a cabo análisis químicos de forma rápida, simple, económica y sin necesidad de personal cualificado, sin ser precisa una toma y tratamiento de las muestras y sin el transporte de éstas hasta un laboratorio convencional para su análisis, provisto de la instrumentación necesaria.

La información que ofrece este último tipo de procedimientos puede utilizarse tanto para la obtención rápida de información cualitativa y/o cuantitativa, como para discriminar la presencia de un constituyente en una muestra por encima de una determinada concentración, de manera que permita seleccionar sólo las muestras de interés y se reduzca de manera considerable el número de muestras a tomar y enviar al laboratorio.

También presentan interés para el control de procesos donde el problema no sea la precisión sino la monitorización de valores límites. Igualmente, puede ser una buena solución en muestras con componentes muy lábiles, pues se obvia todo el proceso de conservación de muestras. Incluso pueden servir para una primera estimación de niveles en el establecimiento de estrategias de análisis en un problema dado.

De forma general, con este tipo de sistemas rápidos de análisis no se evita el uso del laboratorio analítico certificado, que emplea metodología de referencia, sino que se establece un primer escalón en la obtención de información química, racionalizando de esta manera la utilización del laboratorio.

Estos ensayos rápidos se basan habitualmente en el empleo de reacciones (químicas, bioquímicas o inmunológicas) y algunos otros procesos aprovechables en determinadas condiciones que dan lugar a un efecto observable visualmente (color desarrollado, extensión de la zona coloreada) o fácilmente medible (colorimetría, fotometría, reflectometría, fluorescencia, volumetría, etc.).

Los análisis mediante pruebas rápidas pueden realizarse de dos formas: en disolución o en fase sólida. Los sistemas de fase sólida, también llamados tiras reactivas, sensores de gota plana o sensores de un solo uso, se pueden describir como elementos analíticos autocontenidos. Mas concretamente se pueden considerar como elementos analíticos integrales que habitualmente se presentan como películas o almohadillas delgadas que contienen todos los reactivos necesarios para un ensayo, situados dentro de la almohadilla o film de matriz polimérica y en estado seco (seco al tacto). Estas zonas reactivas o matrices poliméricas se encuentran adheridas a pequeñas tiras de material plástico que actúan de soporte y permiten su utilización.

Siguiendo esta estrategia de análisis, surge nuestra intención de desarrollar una lengua óptica basada en una matriz de sensores (sensor array)<sup>4,5,6,7</sup>, orientado específicamente a la caracterización de bebidas alcohólicas como vinos, cerveza, licores, etc. En ellos la información originada por cada sensor es complementaria y la combinación de todos los resultados de los sensores genera una **huella digital única**. Dicho sensor estará asociado a un método apropiado de patrón de reconocimiento y/o calibración multivariante para el procesamiento de datos a través de la correspondiente instrumentación desarrollada para dicha finalidad, pues reconoce un patrón de especies, característico de un determinado tipo de muestra y la puede clasificar.

El uso del análisis de datos multivariado combinado con el empleo de sensores de baja selectividad, constituye una herramienta muy poderosa en la tecnología de medida analítica. Estos sistemas se refieren a menudo a sentidos artificiales (olfato y gusto), porque funcionan de una manera similar a los sentidos humanos. Son conocidos como narices electrónicas y lenguas electrónicas. Los principios de medida de estos sistemas se basan principalmente en técnicas electroquímicas como potenciometría, amperometría, y conductometría. También se utilizan las técnicas ópticas basadas en la absorción de radiación a longitudes de onda específicas o el uso de la resonancia de plasmón de superficie. Los dispositivos sensores de masa (basados en cristales piezoeléctricos) también se han utilizado.

Una **lengua electrónica**<sup>1,2</sup> es un instrumento analítico compuesto por un conjunto de sensores con baja selectividad química (no son sensores diseñados para un analito en concreto sino que responden a muchos analitos) y, por tanto, con sensibilidad parcial (cross-sensitivity) para diferentes componentes en disolución.

Los aspectos más importantes del comportamiento del sensor son su **estabilidad** y una adecuada buena sensibilidad cruzada (**cross-sensitivity**), que se define como la respuesta reproducible de un sensor a tantas especies (generalmente en disolución) como sea posible, aunque para cada sensor el patrón de respuesta a diferentes especies sea distinto. Una vez que la lengua electrónica (“artificial”) se ha configurado y se ha calibrado, mediante una serie de procesos de entrenamiento y validación, será capaz de determinar la composición cuantitativa (el contenido de múltiples especies) y de reconocer (**distinguir, clasificar e identificar**) muestras complejas de distinta naturaleza. Una característica única de estos dispositivos es la posibilidad de mantener una correlación entre el resultado obtenido por la lengua electrónica y la percepción humana.

Después de una calibración apropiada, la lengua electrónica puede producir los resultados de la misma forma que lo hace el conjunto sensorial humano del gusto: consiste en registrar pautas o patrones de las características simples y complejas, caracterizando, por ejemplo, el sabor de productos diferentes. La lengua electrónica obtiene a partir de información genérica, aunque distinta, de cada sensor una información química como puede ser: análisis multicomponente, discriminación entre productos (por ejemplo, identificación de alimentos estropeados), clasificación (por ejemplo, clasificación de aceites por tipos), agrupamiento de productos naturales (así quesos o vinos), reconocimiento (por ejemplo, asignación de quesos desconocidos a categorías previamente establecidas) e incluso objetivización de análisis sensorial (por ejemplo, comparación de la astringencia de vinos entre paneles de cata y matrices de sensores).

El número de sensores de los que debe constar el conjunto de sensores es variable y depende de la complejidad del problema a resolver, siendo necesario en ocasiones el empleo de sensores redundantes para incrementar la confiabilidad de las medidas.

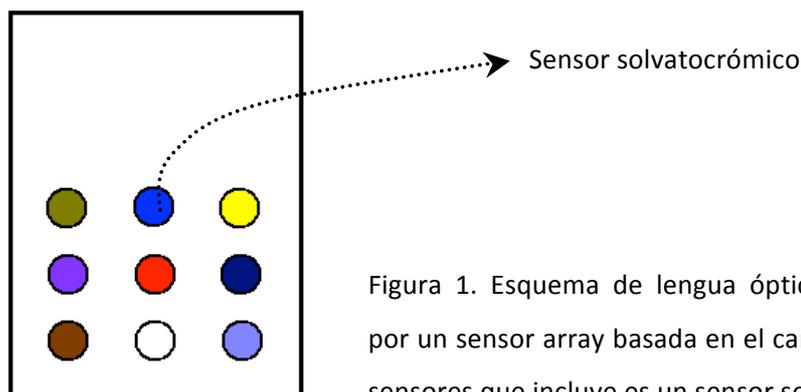


Figura 1. Esquema de lengua óptica colorimétrica formada por un sensor array basada en el cambio de color. Uno de los sensores que incluye es un sensor solvatocrómico.

### **3.2 Objetivos**

El objetivo de esta Tesis de Máster se centra en desarrollar un sensor solvatocrómico que nos permita estudiar mezclas de disolventes con el propósito de determinar el porcentaje de alcohol etílico presente en mezclas y en bebidas alcohólicas, basándonos en el cambio de color que sufrirá el indicador solvatocrómico en función del porcentaje de etanol. Este sensor que por definición es de baja selectividad, será uno de los que se incluyan en la preparación de la lengua electrónica a la que hemos aludido en la Introducción.

Aunque nuestra intención sea medir el porcentaje de etanol, no descartaremos la posibilidad de medir otras mezclas de disolventes, ya que este indicador es sensible a cambios en la polaridad de la disolución. Partimos de la suposición de que en una bebida alcohólica, la polaridad del medio viene dada principalmente por la mezcla alcohol etílico – agua, siendo la contribución a la polaridad de la disolución de otros componentes mínima y por lo tanto descartable (en caso de que esta suposición no sea cierta buscaremos y propondremos algún tipo de tratamiento que permita su corrección).

### **3.3 Solvatocromismo. Polaridad y efecto solvatocrómico**

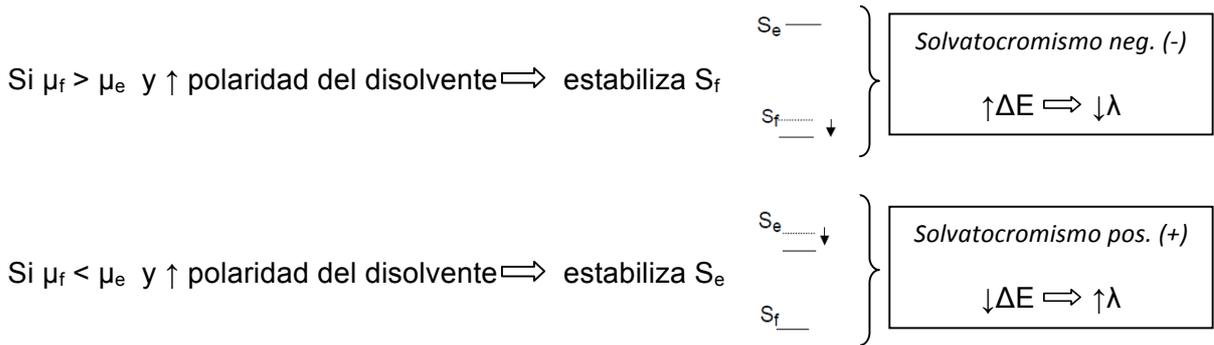
Cuando se emplea el término “polaridad” referido a un determinado disolvente, la mayoría de los químicos saben, de forma intuitiva, lo que éste significa. Sin embargo, la caracterización de los disolventes mediante su polaridad es todavía un problema no totalmente resuelto. Por polaridad puede entenderse:

- a) El momento dipolar permanente de un compuesto (propiedad microscópica).
- b) Su constante dieléctrica (propiedad macroscópica).
- c) La suma de todas las propiedades moleculares responsables de las interacciones disolvente-soluto (electrostáticas, enlaces de hidrógeno, etc.).

Se han elaborado numerosos procedimientos para cuantificar la polaridad de los disolventes. Uno de ellos está basado en los efectos solvatocrómicos que muestran algunas sustancias. El solvatocromismo se puede describir como la capacidad que tiene una sustancia química conteniendo grupos cromóforos para cambiar de color dependiendo de la polaridad del disolvente. Con este fenómeno se puede medir la diferencia entre el estado basal y el estado excitado donde el disolvente actúa como un campo eléctrico constante aplicado sobre el soluto en cuestión (indicador solvatocrómico), con una intensidad directamente proporcional a la magnitud de su constante dieléctrica ( $\epsilon$ ); Así el cambio de posición y algunas veces de intensidad de una banda electrónica de absorción o emisión en el espectro UV-Visible varía con la polaridad del disolvente.

- ✓ Obtenemos un solvatocromismo negativo (-) cuando ocurre un desplazamiento hipsocrómico de la banda o desplazamiento hacia el azul (menor longitud de onda  $\lambda$ , mayor  $\Delta E$ ) y ocurre normalmente cuando aumenta la polaridad del disolvente.
- ✓ Obtenemos un solvatocromismo positivo (+) cuando ocurre un desplazamiento batocrómico de la banda o desplazamiento hacia el rojo (mayor longitud de onda  $\lambda$ , menor  $\Delta E$ ).

Que el cambio de color sea debido a un solvatocromismo positivo o negativo dependerá de la polaridad de la molécula en su estado basal. Cada sustancia exhibirá un efecto solvatocrómico distinto debido a los momentos dipolares ( $\mu_f$  y  $\mu_e$ ) del estado fundamental ( $S_f$ ) y del estado excitado ( $S_e$ ). Cuando aumenta la polaridad del disolvente, se estabiliza en mayor medida el estado más polar. Si  $\mu_f > \mu_e$ , el compuesto tendrá un comportamiento solvatocrómico negativo, mientras que si  $\mu_f < \mu_e$ , el compuesto tendrá un comportamiento solvatocrómico positivo. Este fenómeno permite usar el máximo de absorción ( $\lambda_{max}$ ) de determinados compuestos para saber la polaridad de disolventes dada la correlación lineal entre la polaridad y la  $\lambda_{max}$ .



Según el principio de Franck-Condon (los átomos no cambian de posición durante la absorción de radiación), el estado excitado del disolvente no está en equilibrio con el estado excitado de la molécula de soluto. De hecho, la transición de transferencia de carga del estado fundamental de pares de iones origina el cambio más grande en el espectro de absorción y por lo tanto, los compuestos con este tipo de bandas de absorción (bandas de transferencia de carga) son muy útiles para la medida de la polaridad del disolvente.

### 3.4 Espacios de color RGB y HSV

El color es una percepción, y como tal, puede ser interpretada de forma distinta según la persona que esté observando dicho color. Si por ejemplo, se les muestra a dos personas el mismo objeto y se les pregunta cuál es su color, cada uno dará su respuesta que puede coincidir o puede aproximarse. Esto es debido a lo anteriormente comentado. Pero el color no sólo depende de la persona que está observando dicho objeto, sino también de otros factores que son ajenos al espectador como son la iluminación bajo la que se ve el objeto, el tamaño del mismo, el fondo sobre el que se mira o el ángulo de visión.

Debido a esto, se definieron lo que se denominan los atributos del color que son el tono, la luminosidad (o brillo) y la saturación. Por medio de ellos se puede definir de alguna manera cada color de forma más precisa.

A partir de estos atributos se definieron los llamados espacios de color. Cada espacio de color nos ofrece una manera de clasificar los distintos colores por medio de distintas coordenadas en función del espacio de color tomado. La nota común a todos los espacios de color es que se puede ver de forma distinta cómo varían los atributos de color anteriormente señalados (tonalidad, luminosidad o brillo y saturación).

La diferencia existente entre un espacio de color y otro, además de que en algunos casos unos espacios de color son la evolución lógica de otros para así solucionar problemas que presentaban los anteriores, es que cada espacio de color se utiliza para realizar medidas de color a distintos cuerpos.

Las coordenadas de color son los valores numéricos que definen a un color dentro de un espacio de color. Obviamente, estos valores son distintos de un espacio a otro, ya que se trata de unidades diferentes, aunque hay una serie de ecuaciones que permiten pasar las coordenadas de color de un espacio a otro. Dichas coordenadas de color se pueden obtener de dos maneras, a través de medidas de absorción y a través de las medidas de transreflectancia y reflectancia.

En nuestro caso vamos a obtener las coordenadas de color a partir de medidas de transreflectancia trabajando con un escáner convencional en modo transparente.

Un espacio de color define un modelo de composición del color. Por lo general un espacio de color viene definido por una base de  $N$  vectores (por ejemplo, el espacio RGB lo forman 3 vectores: Rojo, Verde y Azul), cuya combinación lineal genera todo el espacio de color. Los más generales intentan englobar la mayor cantidad posible de los colores visibles por el ojo humano, aunque existen espacios de color que intentan aislar tan solo un subconjunto de ellos.

Existen espacios de color de:

- Una dimensión: escala de grises, escala Jet, etc.
- Dos dimensiones: sub-espacio rg, sub-espacio xy, CIELAB, CIELUV, etc.
- Tres dimensiones: espacio **RGB**, **HSV**, YCbCr, YUV, Y'I'Q', etc.
- Cuatro dimensiones: espacio CMYK.

De todos ellos, *los espacios de color de tres dimensiones son los más extendidos y los más utilizados*. En ellos, un color se especifica usando tres coordenadas, o atributos, que representan su posición dentro de un espacio de color específico<sup>8</sup>. Estas coordenadas no nos dicen cuál es el color, sino que muestran dónde se encuentra un color dentro de un espacio de color en particular.

➤ **Espacio de color RGB.** La descripción RGB (*Red, Green, Blue*) de un color hace referencia a la composición del color en términos de la intensidad de los colores primarios con que se forma: el rojo, el verde y el azul. Es un modelo de color basado en la síntesis aditiva, con el que es posible representar un color mediante la mezcla por adición de los tres colores luz primarios (ver figura 2). Aunque utilicen un mismo modelo de color, sus espacios de color pueden variar considerablemente.

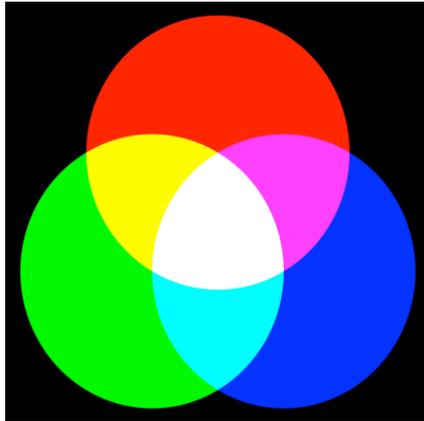


Figura 2. Mezcla aditiva de colores.

Para indicar con qué proporción mezclamos cada color, se asigna un valor a cada uno de los colores primarios, de manera que, por ejemplo, el valor 0 significa que no interviene en la mezcla y, a medida que ese valor aumenta, se entiende que aporta más intensidad a la mezcla. Aunque el intervalo de valores podría ser cualquiera (valores reales entre 0 y 1, valores enteros entre 0 y 37, etc.), es frecuente que cada color primario se codifique con un byte (8 bits). Así, de manera usual, la intensidad de cada una de las componentes se mide según una escala que va del 0 al 255.

Por lo tanto, el rojo se obtiene con (255, 0, 0), el verde con (0, 255, 0) y el azul con (0, 0, 255), obteniendo, en cada caso un color resultante monocromático. La ausencia de color (lo que nosotros conocemos como color negro) se obtiene cuando las tres componentes son 0, (0, 0, 0).

La combinación de dos colores a nivel 255 con un tercero en nivel 0 da lugar a tres colores intermedios. De esta forma el amarillo es (255, 255, 0), el cian (0, 255, 255) y el magenta (255, 0, 255).

Obviamente, el color blanco se forma con los tres colores primarios a su máximo nivel (255, 255, 255).

RGB es el modo por defecto para las imágenes de Photoshop. Los monitores de ordenador muestran siempre los colores con el modelo RGB. Cabe destacar que el modelo de color RGB no define por sí mismo lo que significa exactamente rojo, verde o azul, razón por la cual los mismos valores RGB pueden mostrar colores notablemente diferentes en diferentes dispositivos que usen este modelo de color.

➤ **Espacio de color HSV.** El espacio HSV (*Hue, Saturation, Value* – Tonalidad, Saturación, Valor), también llamado HSB (*Hue, Saturation, Brightness* – Tonalidad, Saturación, Brillo), define un modelo de color en términos de sus componentes constituyentes en coordenadas cilíndricas (ver figura 3):

- *Tonalidad*, se refiere al tono del color (como rojo, azul o amarillo). Se representa como un grado de ángulo cuyos valores posibles van de 0 a 360° (aunque para algunas aplicaciones se normalizan del 0 al 100% o de 0 a 1). Cada valor corresponde a un color. Ejemplos: 0° es rojo, 60° es amarillo y 120° es verde.
- *Saturación*. Se representa como la distancia al eje de brillo negro-blanco. Los valores posibles van del 0 al 100%. A este parámetro también se le suele llamar "pureza" por la analogía con la pureza de excitación y la pureza colorimétrica de la colorimetría. Cuanto menor sea la saturación de un color, mayor tonalidad grisácea habrá y más decolorado estará. Por eso es útil definir la insaturación como la inversa cualitativa de la saturación.
- *Valor* del color, o el *brillo* del color. Representa la altura en el eje blanco-negro. Los valores posibles van del 0 al 100%. El 0 siempre es negro. Dependiendo de la saturación, 100 podría ser blanco o un color más o menos saturado.

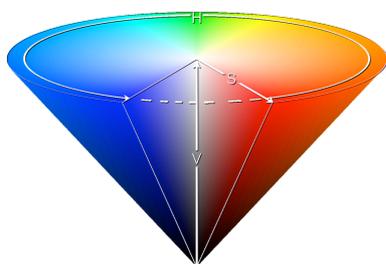


Figura 3. Representación cónica del modelo HSV. Permite la visualización del espacio de color HSV en una sola figura.

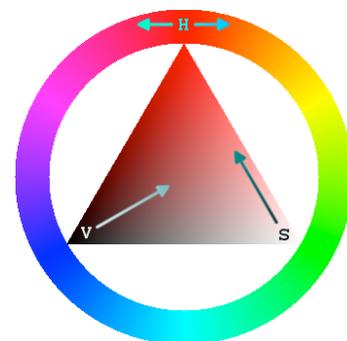


Figura 4. Rueda de color HSV, muestra las coordenadas de color H, S y V.

Cuando necesitamos elegir un color adecuado para alguna de nuestras aplicaciones, resulta muy útil usar la rueda de color HSV (ver figura 4). En ella la tonalidad (H) se representa por una región circular; una región triangular separada, puede ser usada para representar la saturación y el valor del color. Normalmente, el eje horizontal del triángulo (correspondiente a la base del triángulo) denota la saturación (S), mientras que el eje vertical (o altura del triángulo) corresponde al valor o brillo del color (V). Para comprender adecuadamente esa breve explicación comparar ambos modelos, cónico y circular (figuras 3 y 4). De este modo, un color puede ser elegido al tomar primero la tonalidad H de la región circular, y después seleccionar la saturación S y el valor o brillo V del color deseado de la región triangular.

El modelo HSV fue creado en 1978 por Alvy Ray Smith. Se trata de una transformación no lineal del espacio de color RGB, y se puede usar en progresiones de color.

Para calcular las componentes del espacio HSV se usan las siguientes ecuaciones, a partir de las componentes del espacio de color RGB, siendo:

- Coordenada H:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{si } MAX = MIN : & H \rightarrow \text{no definido;} \\ \text{si } MAX = R, \text{ y } G \geq B : & H = 60^\circ \times \frac{G - B}{MAX - MIN} + 0^\circ; \\ \text{si } MAX = R, \text{ y } G < B : & H = 60^\circ \times \frac{G - B}{MAX - MIN} + 360^\circ; \\ \text{si } MAX = G : & H = 60^\circ \times \frac{B - R}{MAX - MIN} + 120^\circ; \\ \text{si } MAX = B : & H = 60^\circ \times \frac{R - G}{MAX - MIN} + 240^\circ; \end{array} \right.$$
- Coordenada S:

$$\left\{ \begin{array}{ll} \text{si } MAX = 0 : & S = 0 \\ \text{en otro caso :} & S = 1 - \frac{MIN}{MAX} \end{array} \right.$$
- Coordenada V:

$$V = MAX$$

El sistema RGB propone la creación y reproducción del color por cromosíntesis aditiva<sup>7</sup>. Sólo existe una única combinación (sólo una) de los 3 colores primarios que iguala el color observado<sup>8</sup>; esta es la ley de aditividad:

$$\text{Color} = R + G + B$$

Sin embargo, el sistema HSV fue un modelo propuesto por la investigación tecnológica industrial, (dentro del ámbito de ciencia de la imagen) para la descripción referencial de la apariencia del color conforme a la definición del “*espacio de color independiente del dispositivo*”, mientras que la precisión del sistema RGB sí depende del dispositivo<sup>9</sup>.

El sistema colorimétrico RGB presenta dos problemas a la hora de especificar un color:

- 1- La necesidad de que la especificación del color pudiera evaluar directamente la luminosidad/claridad de la muestra sin necesidad de realizar ningún cálculo extra.
- 2- Puesto que las funciones colorimétricas<sup>10</sup>  $\bar{r}(\lambda), \bar{g}(\lambda), \bar{b}(\lambda)$  muestran valores negativos (en algunos casos), el cálculo del color de la muestra implica el manejo de cantidades negativas no siempre comprensibles por todos los usuarios.

El conjunto R, G, B nos evalúa el color percibido en conjunto pero ninguno permite evaluar característica alguna por separado, en especial la luminosidad.

En el sistema HSV el tono (H) y la saturación (S) permanecen constantes independientemente de nivel de iluminación.

### **3.5 Selección de indicadores solvatocrómicos**

En esta etapa nos centramos en la búsqueda bibliográfica de posibles indicadores solvatocrómicos que pudiesen ser de utilidad para nuestro propósito. A continuación se argumentan tanto los criterios de selección que nos han llevado a escoger algunos de los indicadores que podrían servirnos teniendo en cuenta sus características, como los que nos han llevado a descartar otras opciones.

Hay una amplia gama de indicadores solvatocrómicos<sup>15</sup>, tanto compuestos que presentan un efecto solvatocrómico positivo, como compuestos que presentan un efecto solvatocrómico negativo. Sin embargo, la selección de dichos compuestos se encuentra limitada por la región del espectro UV-Vis en la que las propiedades de

absorción de la molécula cambien en función de la polaridad del medio y dicho cambio se encuentre entre 380nm – 750nm aproximadamente<sup>11</sup> (región visible del espectro). Es decir, que ésta será la principal característica que debemos utilizar para la elección, descartando indicadores fluorescentes y otros que presenten cambio en la región del IR cercano.

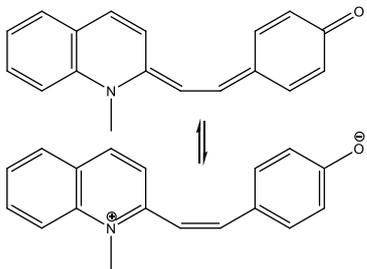
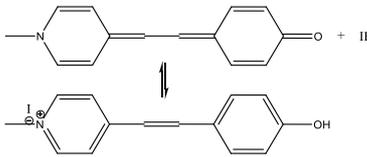
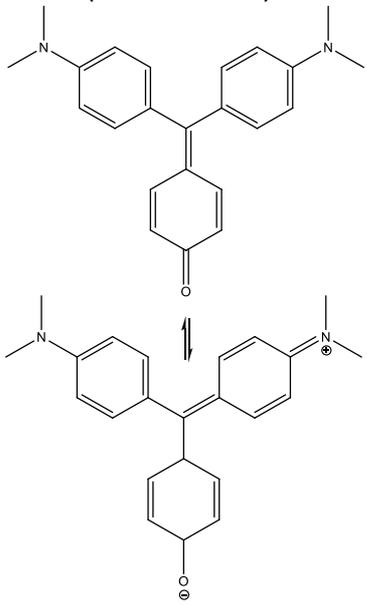
Además otro criterio de selección que debemos emplear se refiere a su comportamiento, y a la diferencia de comportamiento en agua y etanol, ya que esas mezclas son las que vamos a estudiar<sup>12</sup>.

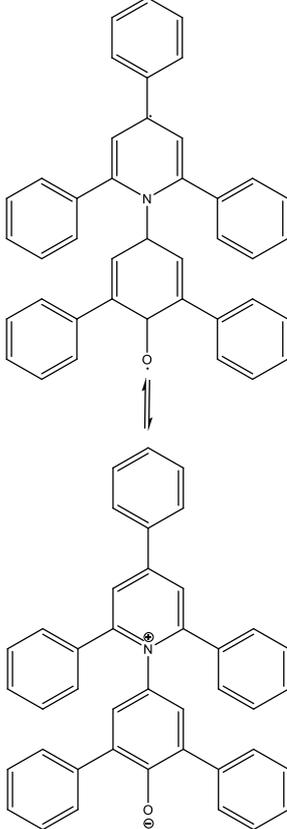
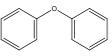
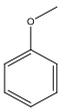
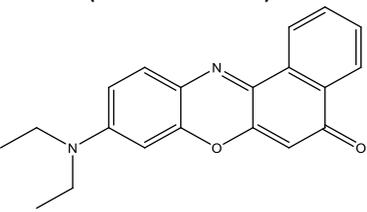
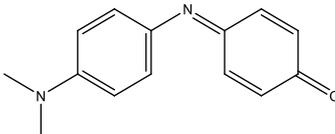
Ambos disolventes son polares, por lo que ya partimos de la premisa de que el cambio en el que se verá implicado el indicador será de un disolvente muy polar como es el H<sub>2</sub>O a otro menos polar que sería el EtOH.

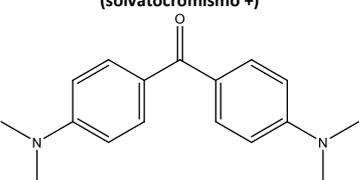
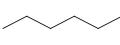
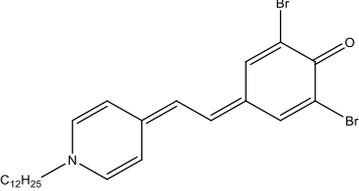
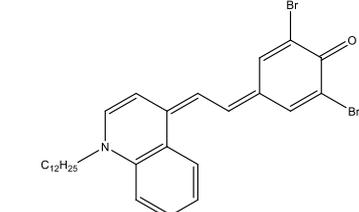
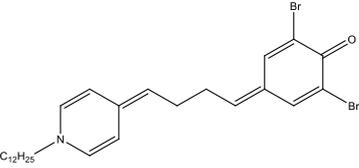
También debemos considerar datos de bibliografía, ya que éstos están referidos al indicador en disolvente polar y disolvente no polar, teniendo en cuenta que la polaridad de un disolvente se mide con la constante dieléctrica  $\epsilon$  y que ésta depende de la temperatura<sup>13</sup>, tendremos en cuenta la  $\epsilon$  a temperatura ambiente (20°C-25°C). Es por ello que sólo debemos tomar estos datos como orientativos, pues nuestra intención es usar dicho indicador en una membrana permeable con soporte polimérico, en el que éste estará en presencia de otros componentes, que cambiarán y condicionarán la polaridad del cóctel disolución modificando el entorno en el que se va a encontrar el indicador, condiciones que no se conocerán hasta posteriores etapas de estudio.

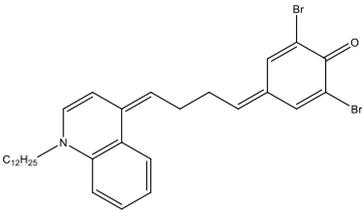
En la siguiente tabla (Tabla 1) se recogen los indicadores solvatocrómicos más habituales y sus características.

Tabla 1. Descripción de algunos indicadores solvatocrómicos que presentan absorción en el UV-Vis.

INDICADOR SOLVATOCRÓMICO	DISOLVENTE	CONSTANTE DIELECTRICA ( $\epsilon$ )	MÁXIMO DE ABSORCIÓN ( $\lambda_{\max}$ nm)	COLOR	DISPONIBILIDAD COMERCIAL
<b>2-(4'-hidroxiestiril)-N-metil-quinolinio betaina<sup>14</sup></b> <b>(solvatocromismo -)</b> 	CHCl <sub>3</sub>	4.8	585	azul tinta	original no derivado si
	EtOH	24.3	?	?	
	H <sub>2</sub> O	80.4	410	rojo sangre	
<b>Yoduro de 4-(4'-hidroxiestiril)-N-metil-piridinio<sup>14</sup></b> <b>(solvatocromismo -)</b> 	n-BuOH	17.8	535	púrpura	original no derivado si
	n-PrOH	20.1	405	rojo	
	EtOH	24.3	?	?	
	MeOH	32.6	395	naranja	
	H <sub>2</sub> O	80.4	385	amarillo	
<b>4,4'-bis(dimetilamino)fucsina<sup>14</sup></b> <b>(solvatocromismo +)</b> 	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> -CH <sub>3</sub>	2.4	485	naranja	no disponible
	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	20.7	500	rojo	
	EtOH	24.3	?	?	
	MeOH	32.6	555	púrpura	
	H <sub>2</sub> O	80.4	?	?	

INDICADOR SOLVATOCRÓMICO	DISOLVENTE	CONSTANTE DIELECTRICA ( $\epsilon$ )	MÁXIMO DE ABSORCIÓN ( $\lambda_{\max}$ nm)	COLOR	DISPONIBILIDAD COMERCIAL
<b>2,6-difenil-4-(2, 4, 6-trifenilpiridin)fenolato (Reichadt's dye) / (betaína de Reichadt)<sup>15</sup> (solvatocromismo -)</b> 	difenil-éter 	3.9	809.7		si disponible
	anisol 	4.3	770		
	acetona 	20.7	676	verde	
	isopropanol 	18.3	590	azul	
	EtOH	24.3	550	violeta	
	MeOH	32.6	514	rojo	
	H <sub>2</sub> O	80.4	452.9	amarillo	
<b>9-(dietilamino)-5H-benzo[a]fenoxazin-5-ona (rojo nilo)<sup>15</sup> (solvatocromismo +)</b> 	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> 	2.0	390.01	amarillo naranja	si disponible
	EtOH	24.3	?	?	
	H <sub>2</sub> O	80.4	593.12	azul	
<b>4-(4-(dimetilamino)fenilimino)ciclohexa-2,5-dienona (azul fenol)<sup>15</sup> (solvatocromismo +)</b> 	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> 	2.02	551.88	purpura violeta	si disponible
	EtOH	24.3	?	?	
	CF <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	26.5	660.07	verde	
	H <sub>2</sub> O	80.4	?	?	

INDICADOR SOLVATOCRÓMICO	DISOLVENTE	CONSTANTE DIELECTRICA ( $\epsilon$ )	MÁXIMO DE ABSORCIÓN ( $\lambda_{\max}$ nm)	COLOR	DISPONIBILIDAD COMERCIAL
<b>bis(4-(dimetilamino)fenil)metanona</b> (cetona de Michler) <sup>16</sup> (solvatocromismo +) 	$C_6H_{14}$ 	2.0	333.33		si disponible
	$CF_3CH_2OH$	26.5	388.198	amarillo	
<b>2,6-dibromo-4-(2-(1-dodecilpiridin-4(1H)-ilideno)etilideno)ciclohexa-2,5-dienona</b> (merocianina KD-M5) <sup>16</sup> (solvatocromismo -) 	$CHCl_3$	5.5	621	verde	no disponible
	$CH_2Cl_2$	9.1	593	azul-verde	
	EtOH	24.3	516	purpura-violeta	
	MeOH	32.6	489	amarillo-anaranjado	
	$H_2O$	80.4	?	?	
<b>(Z)-2,6-dibromo-4-(2-(1-dodecilquinolin-4(1H)-ilideno)etilideno)ciclohexa-2,5-dienona</b> (merocianina KD-M5) <sup>16</sup> (solvatocromismo -) 	$CHCl_3$	5.5	687	verde	no disponible
	$CH_2Cl_2$	9.1	671	verde	
	EtOH	24.3	603	verde azulado	
	MeOH	32.6	564	violeta	
	$H_2O$	80.4	?	?	
<b>2,6-dibromo-4-(4-(1-dodecilpiridin-4(1H)-ilideno)butilideno)ciclohexa-2,5-dienona</b> (merocianina KD-M11) <sup>16</sup> (solvatocromismo -) 	$CHCl_3$	5.5	723		no disponible
	$CH_2Cl_2$	9.1	681	verde	
	EtOH	24.3	546	purpura-violeta	
	MeOH	32.6	510	rojo	
	$H_2O$	80.4	?	?	

INDICADOR SOLVATOCRÓMICO	DISOLVENTE	CONSTANTE DIELECTRICA ( $\epsilon$ )	MÁXIMO DE ABSORCIÓN ( $\lambda_{\max}$ nm)	COLOR	DISPONIBILIDAD COMERCIAL
<b>(Z)-2,6-dibromo-4-(2-(1-dodecilquinolin-4(1H)-ilideno)butylideno)ciclohexa-2,5-dienona</b> <b>(merocianina KD-M301)<sup>16</sup></b> <b>(solvatocromismo -)</b> 	CHCl <sub>3</sub>	5.5	800		no disponible
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9.1	780		
	EtOH	24.3	648	verde	
	MeOH	32.6	591	azul verdoso	
	H <sub>2</sub> O	80.4	?	?	

Se han descartado gran número de indicadores debido a que no absorben en la región del visible, son fluorescentes (como por ejemplo DMABN<sup>15</sup> o Py<sup>15</sup>) o son de elevada complejidad estructural lo que dificulta económicamente su disponibilidad o su síntesis.

Este conjunto de indicadores solvatocrómicos tienen una característica común, ya que el cambio crómico, en todos ellos se debe a bandas de absorción tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Asimismo se observa que son sistemas aromáticos que presentan un carbonilo (grupo cromóforo) y muchos de ellos son estructuras zwitteriónicas. Las bandas de absorción en la región visible y ultravioleta de los hidrocarburos conjugados suelen estar asociadas a transiciones electrónicas que involucran a los electrones  $\pi$ . Las transiciones de menor energía son aquellas en las que un electrón es promovido desde el último orbital ocupado de carácter  $\pi$  (HOMO) al primer orbital  $\pi$  desocupado (LUMO).

De todos los indicadores anteriormente propuestos, que podríamos interesarnos, debemos buscar los que nos ofrezcan una mayor diferencia de energía ( $\Delta E$ ) entre el nivel fundamental y el nivel excitado que nos garanticen un buen cambio de color, ya que dicha separación entre niveles de energía ( $\Delta E$ ) será la que varía en función de la polaridad del medio, es decir que presenten mayor  $\Delta \lambda_{\text{absorción}}$  al pasar de medio apolar a medio polar.

Características a seguir para la selección del indicador:

- 1- Propiedades crómicas favorables.
- 2- Disponibilidad en el Grupo de Investigación.
- 3- Disponibilidad comercial.
- 4- Relación económica coste / cantidad.

Siguiendo estos criterios se decidió utilizar los dos reactivos siguientes: “betaína de Reichardt” (cuya síntesis se encuentra descrita en bibliografía<sup>17</sup>) y “rojo Nilo” para su uso como indicadores solvatocrómicos, siendo éstos suministrados por Sigma-Aldrich.

También se probaron otros indicadores, disponibles en el Grupo de Investigación, intentando seguir la estructura con esqueleto molecular similar a las anteriores, con una parte estructural quinoloide con carbonilo como grupo cromóforo (ver figura 5) por si nos pudiesen ofrecer utilidad cromática frente a un cambio de polaridad. Los indicadores que se probaron, aprovechando la disponibilidad de éstos fueron los siguientes:

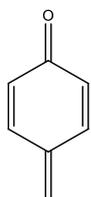
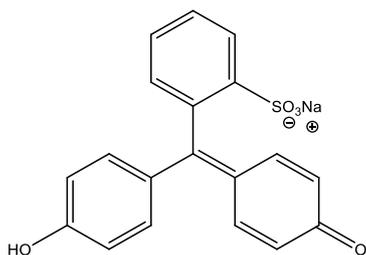


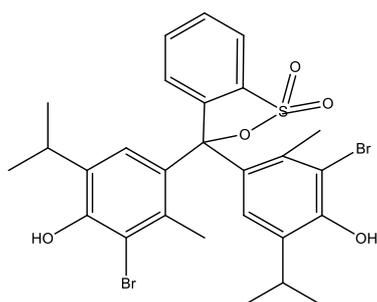
Figura 5. Estructura molecular tipo quinona.



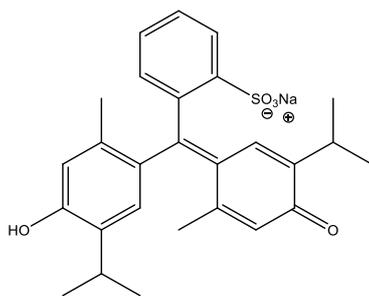
Rojo fenol (indicador halocrómico)

pH=6.8 → amarillo

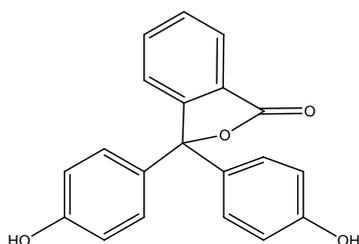
pH=8.2 → rojo



Azul de bromotimol



Azul timol



Fenolftaleína → descartamos su uso pues es incoloro hasta  $\text{pH} \geq 8$ ,  $\text{pH}$  que no se alcanza en mezclas EtOH-H<sub>2</sub>O.

Los resultados experimentales encontrados para estos indicadores se especifican en el apartado 3.8 Preparación de las membranas.

### **3.6 Materiales y reactivos empleados**

#### ✓ **Materiales**

- Matraces aforados de 50mL y 250mL.
- Micropipetas (0.5 - 50 $\mu$ L, 100 - 1000 $\mu$ L, 1 – 5mL)
- Pipetas (5, 10, 25mL)
- Pipeta Pasteur.
- Vasos de precipitado (50, 100 y 250mL).
- Pesarustancias.
- Gradillas.
- Pinzas de plástico, para el manejo (introducción-extracción) de las membranas.
- Viales de vidrio (2mL).
- Tubos de plástico (10mL).
- Láminas de poliéster Mylar, para su uso como soporte sólido de la membrana (Goodfellow, Cambridge, Inglaterra).
- Resto de material habitual en un laboratorio.

**✓ Reactivos**

- Agua desionizada (tipo III), obtenida a partir de un equipo de ósmosis inversa Milli RO12 Plus (Millipore) acoplado a un equipo de refinado Milli Q PLUS 185 (Millipore).
- Etanol absoluto (98%) (Panreac, Barcelona, España).
- Cloruro de polivinilo (PVC) de alto peso molecular (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Poliestireno (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Dibutilfosfato (DBP) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Tributilfosfato (TBP) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- O-nitrofeniloctiléter (NPOE) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Bromuro de tetrabutilamonio (BrTBA) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Tetrahidrofurano (THF) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Acetato de celulosa (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Etilenglicol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- 2,6-Difenil-4-(2,4,6-trifenilpiridinio)fenolato, Reichardt's dye (reactivo de Reichardt o indicador de Reichardt) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- 9-(diethylamino)-5H-benzo[a]fenoxazin-5ona, Nile Blue A Oxazone, Nile Red (Rojo Nilo) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Fenolsulfonftaleína, Rojo fenol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- 3',3''-Dibromotimolsulfonftaleína, Azul de bromotimol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).
- Timolsulfonftaleína, Azul timol (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España).

**3.7 Instrumentación usada**

- Balanzas analíticas Ohaus Discovery DV215CD y Ohaus Pioneer PA2102, con rango de pesada de 0-81 y 0-2100 g y precisión 0,01 mg y 0,01 g, respectivamente.
- Sistema centrífugo para preparación de membranas, Spin-Coater.
- Espectrofotómetro ultravioleta-visible de diodos en fila HP 8453.
- Soporte metálico de diseño propio, para la medida de absorbancia de las membranas.

- Escáner HP, modelo Scanjet 3400C.
- Escáner MICROTEK, modelo ScanMaker i900.
- pH-metro digital CRISON, modelo Basic 20, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.

### ➤ **Software**

- UV-Visible Chemstation Software (Agilent Technologies).
- ScanRn (v1.23) (Para scanner HP Scanjet 3400C).
- Silver Fast (v6.6.0r4) (Para ScanMaker i900).
- Adobe Photoshop CS (v8.0.1).
- MATLAB R2006b (v7.3.0.267), con aplicación específica programada para el tratamiento de imágenes para obtención de la coordenada H.

## **3.8 Preparación de las membranas**

En la preparación de las membranas sensoras se distinguen principalmente dos etapas: una etapa experimental en la que se preparan las membranas realizando las pruebas necesarias hasta que se consigue optimizar las cantidades de los componentes que constituyen la disolución (o cóctel), y otra etapa en la que se usa dicho sensor optimizado en su finalidad analítica.

Para la disposición de las membranas, se prepara el cóctel correspondiente con todos los reactivos necesarios en un vial de vidrio de 2 mL de volumen aproximadamente. De este cóctel disolución se toman 20  $\mu$ L con una micropipeta y se depositan en un soporte sólido plástico (Mylar) mientras éste gira a una velocidad constante, técnica conocida como recubrimiento por giro (Spin-Coating). El soporte no siempre tiene que ser plástico; puede ser vidrio, cuya superficie, en ocasiones ha de ser activada con ácido, por lo que generalmente se utiliza plástico como soporte sólido para la membrana, ya que resulta más cómodo y económico.

El equipo utilizado para la preparación de las membranas es el Spin-Coater descrito en el apartado anterior, que girará a unas determinadas rpm, previamente optimizadas (200 – 300 rpm aproximadamente). Esta velocidad de giro permite la extensión de la gota y el reparto homogéneo de los componentes del cóctel debido a la fuerza centrífuga que experimenta dicha gota (ver figura 6). Una vez la “gota” adquiere las dimensiones requeridas, aproximadamente 1cm de diámetro, se deja un

tiempo en reposo para que se evapore el disolvente, generalmente se usa THF aprovechando su elevada volatilidad (p.e.=66°C). Una vez evaporado el disolvente obtenemos la membrana sensora, compuesta por la lámina soporte de Mylar y la zona sensora sólida y seca, constituida por los componentes necesarios para reconocer al analito, que adopta una forma circular (ver figura 7).

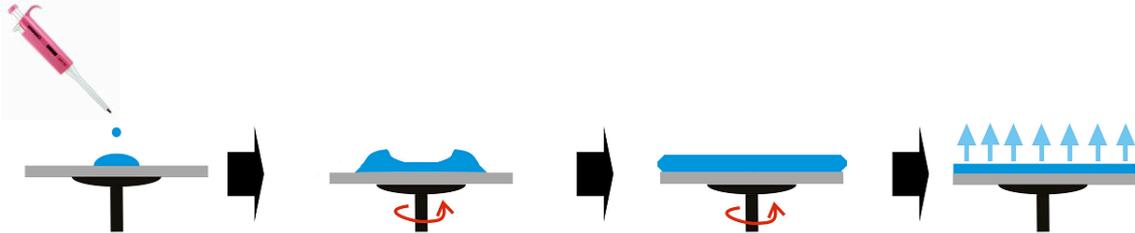


Figura 6. Etapas del proceso Spin-Coating: deposición de la disolución, giro, homogeneización, y evaporación del disolvente.

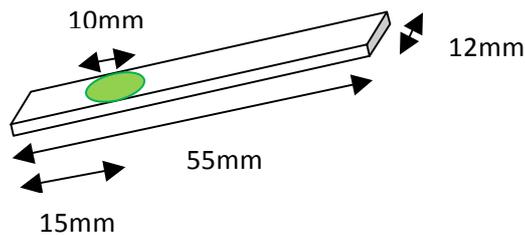


Figura 7. Dimensiones del soporte y de la membrana sensora.

Este tipo de sensores se caracteriza principalmente por la inmovilización (fijación) de una sustancia indicadora que interaccionará con el analito mostrando un cambio en alguna propiedad medible. El indicador químico se fijará en la matriz polimérica (ver figura 8) mediante interacciones hidrofóbicas, interacciones iónicas o por enlace covalente.

La composición del cóctel generalmente consta de:

- Polímero<sup>18</sup>: se emplea para fijar el indicador, es decir, lo inmoviliza en la red polimérica que se forma (ej. PVC). Los polímeros con baja temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) generalmente no necesitan plastificantes, sin embargo a menudo estos compuestos son apolares, y por lo tanto serán malos disolventes de ligandos polares, ionóforos, indicadores y analitos. Por ello será necesario adicionar un plastificante. También aporta rigidez a la membrana, y contribuye a la densidad de la disolución del cóctel.
- Plastificante<sup>19</sup>: proporciona cierta porosidad a la membrana, para que ésta sea permeable a la disolución que se mide, ya que el polímero que fija a la sustancia indicadora resulta impermeable (hidrofóbica) (ej. NPOE, TBP...).
- Indicador: sustancia responsable del cambio de color cuando se produce la interacción analito-indicador.
- Sal lipofílica: se usa en caso de que tengamos compuestos cargados en la membrana para mantener la electroneutralidad de la misma.
- Disolvente: para disolver la mezcla, éste se evaporará una vez se haya formado la membrana (ej. THF).

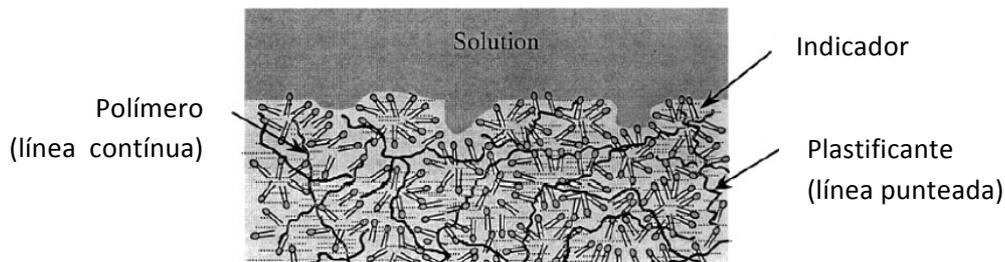


Figura 8. Estructura de la membrana polimérica.

Continuando con nuestro principal objetivo, el desarrollo de un sensor solvatocrómico, sólo se ensayaron los siguientes indicadores solvatocrómicos de todos los descritos en el apartado 3.5: betaína de Reichardt, rojo Nilo, rojo fenol, azul bromotimol, azul timol y fenolftaleína (el uso únicamente de estos indicadores ya quedó justificado en el apartado 3.5).

Se realizaron numerosas pruebas con los indicadores anteriormente citados, cambiando tanto la composición de los componentes (indicador, polímero, plastificante, sal...) como la cantidades de éstos. Es por ello, que al ser un proceso experimental del tipo “ensayo - error” se omiten los resultados encontrados para aquellos indicadores que no mostraron un cambio significativo de color, presentaron lixiviación u otros inconvenientes que no permitían su uso y aprovechamiento como sensores solvatocrómicos para nuestro propósito (incluida la fenolftaleína, que ni siquiera llegó a utilizarse, pues se trata de un indicador halocrómico que manifiesta el cambio de color a  $\text{pH} \geq 8$ , siendo el pH de las mezclas etanol – agua muy inferior a éste).

En el siguiente apartado se describen las condiciones y cantidades empleadas en la preparación de los dos posibles sensores solvatocrómicos, ya que los reactivos empleados en la preparación de estas membranas si mostraron un cambio de color aprovechable a priori. Estos dos indicadores que mostraron cambio crómico al pasar de una disolución acuosa a una etanólica fueron, la betaína de Reichardt y el rojo Nilo.

### **3.9 Optimización de las membranas**

Una vez estudiados los indicadores que presentan cambios de color debido al cambio de polaridad que experimentan al pasar de una disolución acuosa a una disolución etanólica, la siguiente etapa es optimizar la composición de los constituyentes de la membrana, tanto en componentes como en cantidad de éstos, para obtener la mejor actividad de la membrana asegurando unos buenos resultados.

Los dos únicos indicadores que mostraron cambio de color, como ya se comentó anteriormente, fueron la betaína de Reichardt (presenta un cambio de verde en  $\text{H}_2\text{O}$  a azul en EtOH) y el rojo Nilo (presenta un cambio de morado/lila en  $\text{H}_2\text{O}$  a púrpura/violeta en EtOH, aunque dicho cambio es débil). Así que para optimizar las membranas que incluían estos reactivos se revisó una amplia bibliografía, de donde se obtuvieron datos orientativos, para posteriormente mejorar composiciones hasta que se encontraron resultados satisfactorios para nuestro interés.

La bibliografía consultada se expone a continuación para ambos indicadores:

- Betaína de Reichardt<sup>20, 21, 22, 23, 24, 25, 26</sup> (Reichardt's Dye → RD).
- Rojo nilo<sup>27, 28, 29, 30, 31</sup> (Nile Red → NR).

Se empleó en ambos casos NPOE como plastificante porque es más apolar que el TBP, según bibliografía<sup>19</sup>.

### **Colorante de Reichardt (cóctel 1)**

Las cantidades están propuestas para un cóctel de 0,5 mL (500  $\mu$ L) de volumen, con el cual se pueden preparar aproximadamente unas 25 membranas (20  $\mu$ L cada una). Para el caso de este indicador se necesitan como mínimo 1,5 mg del mismo, pues por debajo de esta cantidad la coloración de la membrana es muy débil no siendo útil esta coloración para la medida. El volumen de plastificante se ha reducido hasta 12 $\mu$ L, puesto que al ser el componente responsable de la permeabilidad de la membrana, si se aumenta a proporciones mayores empiezan a aparecer manchas de coloración mas intensa una vez que la membrana se introduce en disolución, incluso si se aumenta mucho ( $V \geq 20 \mu$ L) empiezan a observarse fenómenos de lixiviación del indicador.

Tabla 2. Descripción de la composición del cóctel 1.

<b>reactivo</b>	<b>cóctel 1</b>	<b>teórico</b>
<b>indicador</b>	Reichardt Dye	1.5 mg
<b>matriz polimérica</b>	PVC	30 mg
<b>plastificante</b>	NPOE	12 $\mu$ L
<b>disolvente</b>	THF	0.5 $\mu$ L

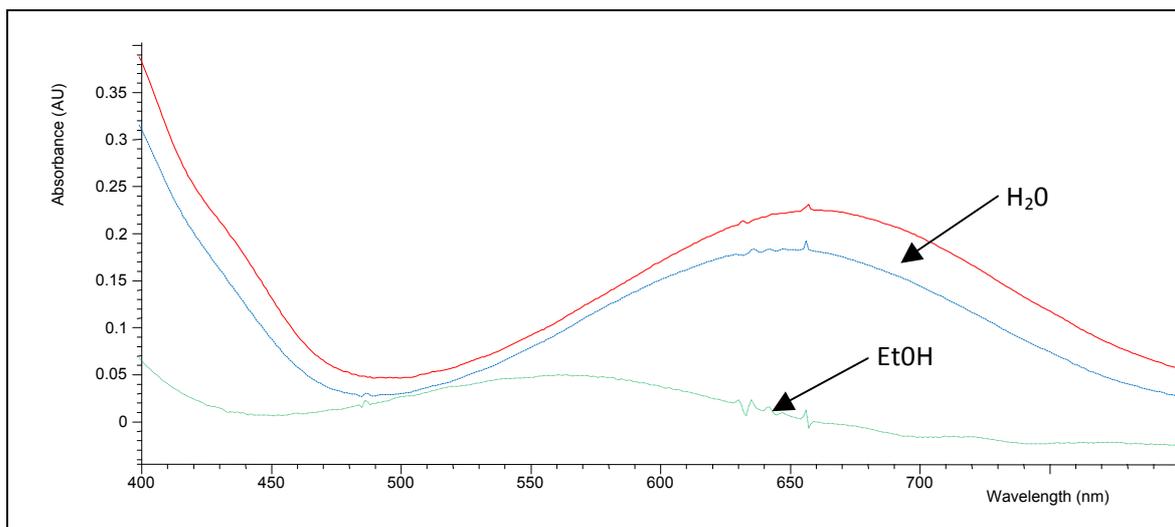


Figura 9. Espectro de la membrana elaborada con el cóctel 1, en aire (membrana seca), H<sub>2</sub>O y EtOH.

En bibliografía, se describe la betaína de Reichardt como un indicador que presenta solvatocromismo negativo, es decir, que absorbe a menores longitudes de onda a medida que aumenta la polaridad del disolvente. Sin embargo, una vez elaborada la membrana observamos un comportamiento invertido, es decir, que éste indicador presenta solvatocromismo positivo absorbiendo a mayores longitudes de onda a medida que aumenta la polaridad del disolvente como se puede observar en la figura 9. De alguna forma el indicador se ve afectado por el entorno químico que le rodea, bien el plastificante (NPOE), bien el polímero (PVC) o ambos. Pero dicho fenómeno que tiene lugar no es nuestro objeto de investigación, por ello no prestaremos mayor atención más que al cambio de color que se produce, que es realmente lo que nos interesa.

### **Rojo Nilo (cóctel 2)**

En este caso el volumen del cóctel también se ha concretado en 0,5 mL ya que con este volumen de disolvente se produce la completa disolución de todos los componentes sin problema alguno. Para este caso sólo es necesario una pequeñísima cantidad de indicador pues presenta una fuerte coloración. Con cantidades de indicador mayores la membrana presenta demasiada coloración resultando casi opaca a la radiación del espectrofotómetro, provocando una saturación del detector cuando se realizan las medidas de absorbancia debido a un 0% de transmitancia o lo que es lo mismo un 100% de absorbancia.

Tabla 3. Descripción de la composición del cóctel 2.

<b>reactivo</b>	<b>cóctel 2</b>	<b>teórico</b>
<b>indicador</b>	Nile Red	0.5 mg
<b>matriz polimérica</b>	PVC	30 mg
<b>plastificante</b>	NPOE	15 $\mu$ L
<b>disolvente</b>	THF	0.5 $\mu$ L

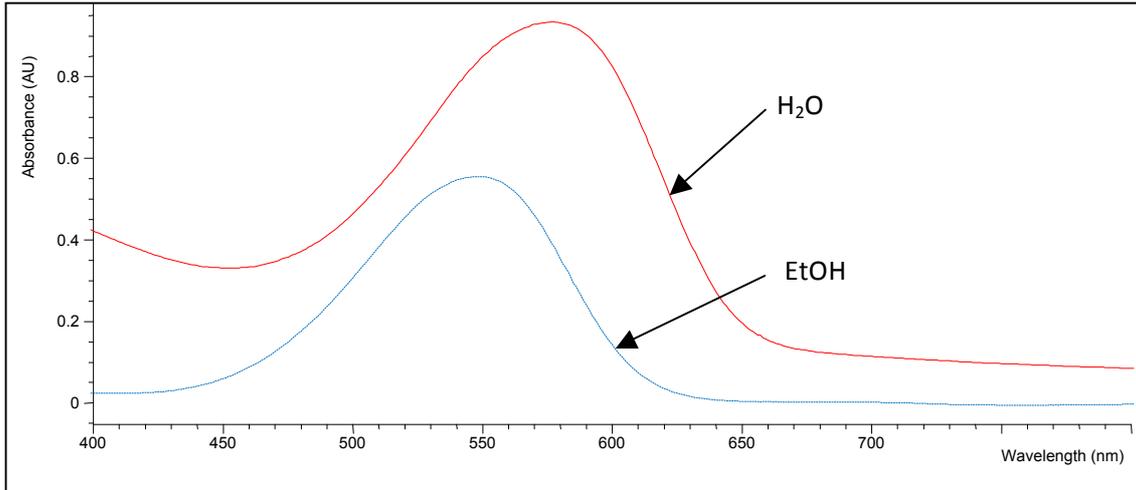


Figura 10. Espectro del indicador rojo nilo en disolución acuosa y en disolución etanólica.

### **3.10 Medida de las membranas**

Se han realizado dos tipos de medidas de las membranas. Por una parte se han realizado medidas de absorbancia con un espectrofotómetro y por otra se han realizado medidas de color con un escáner convencional.

Para el estudio del comportamiento de la membrana sensora frente a mezclas de disolventes H<sub>2</sub>O-EtOH se sumergió la membrana en disoluciones acuosas con contenido en EtOH creciente y se midieron con el espectrofotómetro y con el escáner para observar. Concretamente se tomaron los datos de la membrana sumergida en disoluciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 y 98% (v/v) en EtOH. El motivo de que se hayan tomado más puntos en la zona inicial, concretamente de 0 a 30% en EtOH, se debe al interés en la futura aplicación en muestras reales de bebidas alcohólicas.

La preparación de las membranas ya ha sido descrita en el apartado 3.8. Sin embargo, a la hora de preparar las disoluciones de H<sub>2</sub>O-EtOH hay que tener en cuenta que debemos pipetear la cantidad correspondiente en % (v/v) tanto de H<sub>2</sub>O como de EtOH (como se describe en la tabla 4), ya que si sólo tomamos uno de los disolventes y enrasamos en un matraz aforado hasta volumen final, estaremos cometiendo un error importante a causa de la contracción en volumen que experimenta la disolución, es decir que el volumen final de la disolución es menor que la suma de los volúmenes de H<sub>2</sub>O y EtOH. Este fenómeno que se observa en el caso de mezclas H<sub>2</sub>O-EtOH radica en que ocurre una interacción más eficiente entre las moléculas de H<sub>2</sub>O-EtOH

que las interacciones que existían entre H<sub>2</sub>O-H<sub>2</sub>O y EtOH-EtOH (el resultado es una disminución de la energía del sistema).

$$\% (v/v) = \frac{V_{\text{soluto}}}{V_{\text{disolucion}}} \cdot 100$$

Tabla 4. Tabla resumen de los volúmenes de disolvente mezclados en matraces de 50 mL (volumen final < 50mL, excepto para 0 y 98%).

<b>% EtOH (v/v)</b>	<b>V<sub>H2O</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>EtOH</sub> (mL)</b>
<b>0</b>	50	0
<b>5</b>	47.5	2.5
<b>10</b>	45	5
<b>15</b>	42.5	7.5
<b>20</b>	40	10
<b>25</b>	37.5	12.5
<b>30</b>	35	15
<b>40</b>	30	20
<b>50</b>	25	25
<b>60</b>	20	30
<b>70</b>	15	35
<b>75</b>	12.5	37.5
<b>80</b>	10	40
<b>90</b>	5	45
<b>98</b>	0	50

Tanto en las medidas de absorbancia como en las medidas de color se han realizado dos tipos de estudios. Uno intramembrana, en el que se estudia la dispersión de los resultados debido al propio instrumento y a la ligera variación de la posición de la membrana. Este estudio se realiza midiendo un conjunto de (n) veces la misma membrana. También se realiza un estudio intermembrana en el que se comprueba la variabilidad de los resultados debida a las membranas. Éste se realiza midiendo un conjunto de membranas en las mismas condiciones.

En ambos casos tanto en medidas de absorbancia como en medidas de color se utiliza el parámetro alfa ( $\alpha$ ) para obtener los datos normalizados entre 0 y 1, con el fin de facilitar la comparación entre los resultados obtenidos.

- Parámetro alfa en medidas de absorbancia  $\alpha = \frac{A - A_{min}}{A_{max} - A_{min}}$ ; ;  
(Siendo A el valor de la absorbancia medida).

- Parámetro alfa en medidas de color:  $\alpha = \frac{H - H_{min}}{H_{max} - H_{min}}$  ;  
(Siendo H el valor del parámetro H medido).

### **3.10.1 Medidas de absorbancia**

A continuación se muestran los resultados experimentales encontrados tras realizar la experiencia con un espectrofotómetro UV-Visible HP 8453 (ver figura 11) midiendo la absorbancia de las membranas en un soporte metálico de diseño propio como el que se muestra en la figura 12.



Figura 11. Espectrofotómetro y disoluciones medidas.



Figura 12. Soporte metálico para la medida de absorbancia de las membranas.

Las medidas absorbancia se han tomado a la longitud de onda del máximo de absorción correspondiente a 660nm para el caso de las membranas preparadas con el coctel 1 (Reichardt Dye) y de 545nm para el caso de membranas preparadas, y se observa su disminución a medida que la membrana se sumerge en disoluciones de concentración creciente en EtOH. A todas las medidas de absorbancia se le restó el fondo a 850nm para eliminar el ruido instrumental y obtener la absorbancia neta.

### ✓ **RD cóctel 1. Estudio intramembrana**

Tabla 5. Absorbancia máxima y mínima de la membrana.

% EtOH	$A_{\max}$ 660nm (UA)	% EtOH	$A_{\min}$ 660nm (UA)
0	0.2225	98	$5.14 \cdot 10^{-2}$

Tabla 6. Datos experimentales obtenidos.

% EtOH	$\alpha$	SD	% EtOH	$\alpha$	SD
0	0.9965	0.0024	50	0.1010	0.0261
5	0.8887	0.0119	60	0.0575	0.0091
10	0.6168	0.0012	70	0.0613	0.0235
15	0.6785	0.0071	75	0.0296	0.0111
20	0.5900	0.0541	80	0.0051	0.0042
25	0.3482	0.0084	90	0.0321	0.0053
30	0.2985	0.0120	98	0.0337	0.0092
40	0.1208	0.0357			

(n=4)

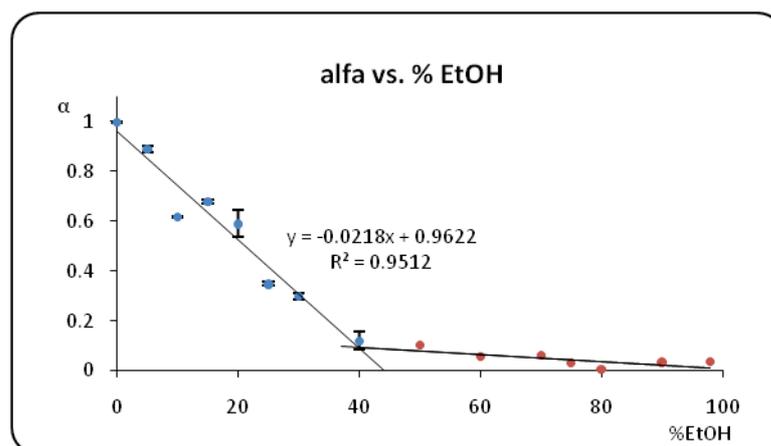


Figura 13.

Podemos observar en la figura 13, cómo alfa disminuye en función del % en EtOH. Sin embargo esta disminución lineal sólo se mantiene hasta un 40%, ya que a partir de aquí la membrana sensora no experimenta un cambio de color significativo, el azul observado a partir de 50% es prácticamente constante. Si no representamos el

punto correspondiente a 15% de EtOH (porque se desvía de la linealidad), la linealidad mejora ligeramente como se muestra en la figura 14.

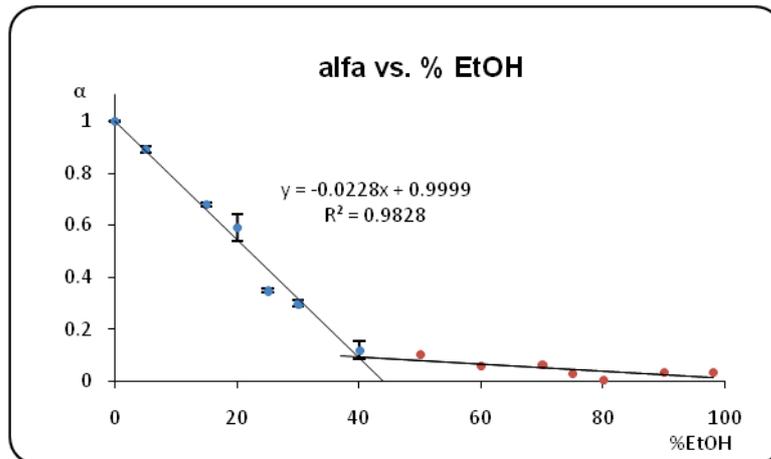


Figura 14.

✓ **RD cóctel 1. Estudio intermembrana**

Tabla 7. Absorbancia máxima y mínima de la membrana.

% EtOH	A <sub>max</sub> 660nm (UA)	% EtOH	A <sub>min</sub> 660nm (UA)
0	0.3987	98	0.0958

Tabla 8. Datos experimentales obtenidos.

% EtOH	α	SD	% EtOH	α	SD
0	0.8117	0.2115	50	0.1666	0.0642
5	0.7016	0.1883	60	0.1503	0.0832
10	0.6363	0.1863	70	0.1301	0.0728
15	0.5340	0.1680	75	0.1122	0.0793
20	0.4988	0.1680	80	0.0889	0.0936
25	0.4336	0.1563	90	0.1666	0.0642
30	0.3652	0.1515	98	0.1503	0.0832
40	0.2695	0.1346			

(n=5)

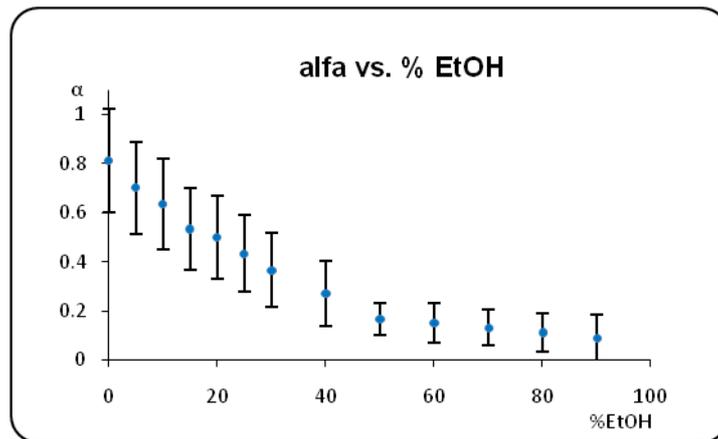


Figura 15.

Vemos que en la figura 15, la respuesta de la membrana en función del % de EtOH lógicamente es la misma, pero en esta figura (gráfica  $\alpha$  vs. EtOH) podemos observar cómo la desviación estándar aumenta debido a una mayor dispersión de los datos. Esto se debe principalmente a dos motivos:

- La apariencia de cada membrana es distinta inevitablemente, aunque en el proceso de preparación se intenta que todas tengan la mayor similitud posible. Sin embargo, esto no se consigue totalmente porque en el centro de la membrana aparece una zona más clareada que en el resto del círculo, siendo esta zona más clara distinta en cada membrana (ver figura 16). Las membranas fueron preparadas de forma manual ya que el equipo spin-coater sufrió una avería durante este periodo.

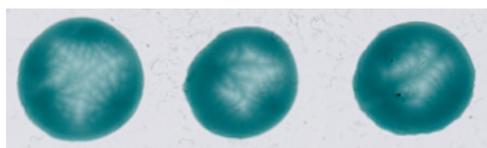


Figura 16. Imagen de 3 membranas en la que se puede observar como la zona central presenta un perfil diferente en cada membrana.

- Para medir la absorbancia es necesario introducir todas las membranas en el soporte metálico del espectrofotómetro exactamente de la misma forma. Aunque el soporte plástico de la membrana tiene las mismas dimensiones que el soporte metálico (ver figuras 7 y 12) pueden existir pequeñas variaciones de posición de una membrana a otra que sumado al hecho anteriormente comentado aumentan la desviación de las medidas.

En las siguientes figuras se muestra la linealidad correspondiente, si tomamos sólo la serie de puntos hasta 40% (figura 17) o si la tomamos hasta 50% (figura 18) mejorando ligeramente la linealidad en éste último caso, no obteniendo, sin embargo

un coeficiente de correlación lineal ( $r$ ) suficientemente bueno, amén de que estos puntos siguen estando acompañados de barras de error grandes, debido a la gran dispersión que presentan los datos obtenidos (recordamos que para considerar  $r$  suficientemente bueno para una determinación analítica deberá ser igual o superior a  $r \geq 0,999$ . En las figuras representadas no se muestra el coeficiente de correlación lineal  $r$ , sino el coeficiente de determinación  $R^2$  que también nos proporciona una medida de la bondad del ajuste además de una medida de la capacidad explicativa de la ecuación de regresión).

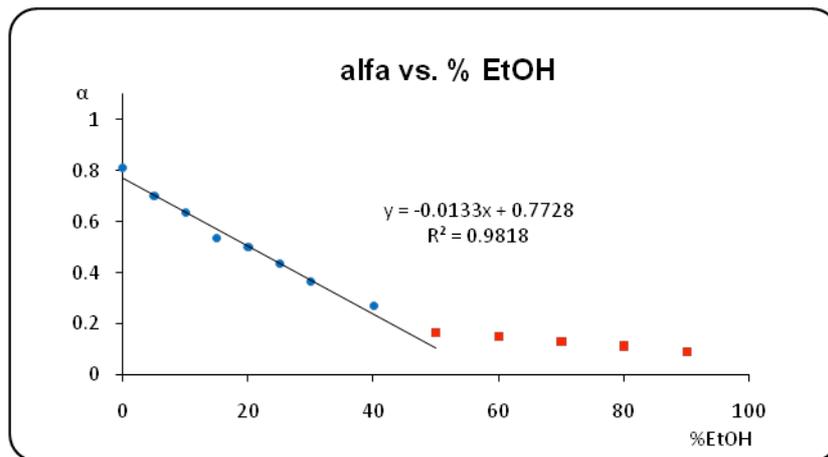


Figura 17.

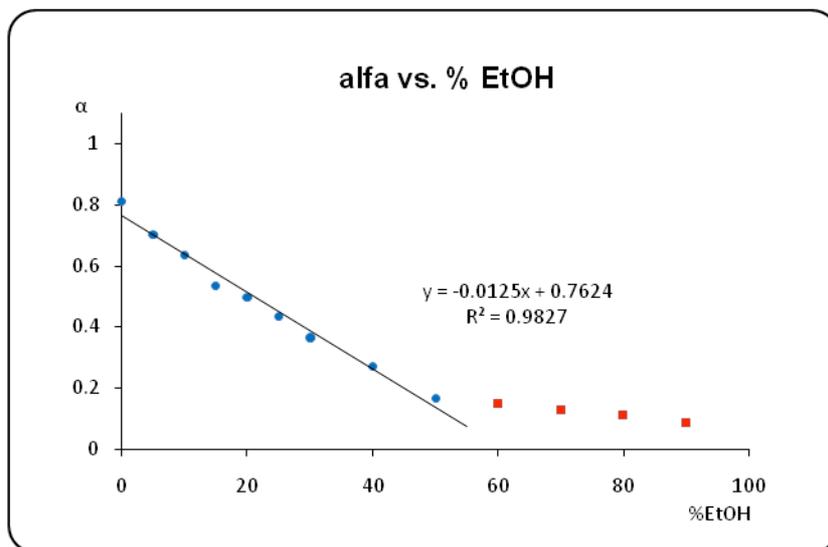


Figura 18.

✓ **NR cóctel 2. Estudio intramembrana.**

Tabla 9. Absorbancia máxima y mínima de la membrana.

% EtOH	A <sub>max</sub> 545nm (UA)	% EtOH	A <sub>min</sub> 545nm (UA)
0	0.4892	98	0.4189

Tabla 10. Datos experimentales obtenidos.

% EtOH	$\alpha$	SD	% EtOH	$\alpha$	SD
0	0.9847	0.0084	50	0.5356	0.0170
5	0.9684	0.0062	60	0.4573	0.0178
10	0.9303	0.0082	70	0.3414	0.0182
15	0.9406	0.0151	75	0.2165	0.0222
20	0.9732	0.0407	80	0.1582	0.0058
25	0.8646	0.0151	90	0.1137	0.0203
30	0.7569	0.0139	98	0.0236	0.0211
40	0.6252	0.0159			

(n=4)

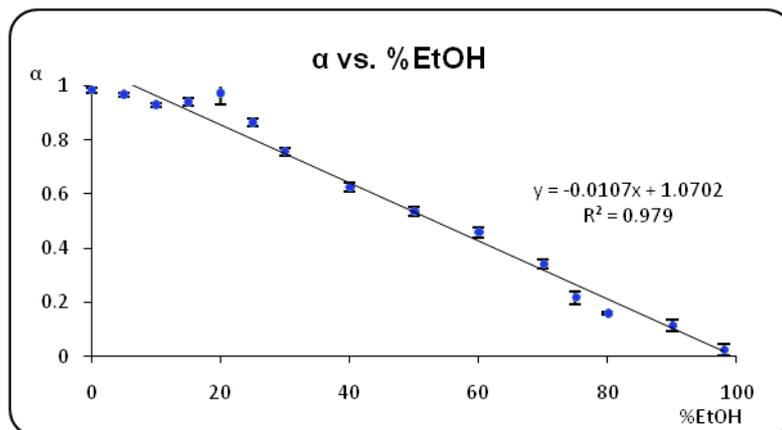


Figura 19.

Aunque se observa dependencia lineal entre el parámetro alfa y el contenido en EtOH de la disolución, la variación de absorbancia de la membrana es muy pequeña como se observa en la tabla ( $\Delta A = 0.07$  UA), esto se debe a que la membrana experimenta un cambio de color muy tenue ya que pasa de un morado/lila a 0% a un púrpura/violeta a 98% de EtOH, tonalidades de color muy próximas entre sí. Sería, en consecuencia una variación insuficiente para una determinación analítica precisa.

✓ **NR cóctel 2. Estudio intermembrana.**

Tabla 11. Absorbancia máxima y mínima de la membrana.

% EtOH	A <sub>max</sub> 545nm (UA)	% EtOH	A <sub>min</sub> 545nm (UA)
0	0.4127	98	0.1344

Tabla 12. Datos experimentales obtenidos.

% EtOH	α	SD	% EtOH	α	SD
0	0.7264	0.1546	50	0.5772	0.0682
5	0.8011	0.1396	60	0.5925	0.1357
10	0.7722	0.2025	70	0.3882	0.2629
15	0.7707	0.0774	75	0.5779	0.1069
20	0.5923	0.1909	80	0.5803	0.1296
25	0.7029	0.1827	90	0.5230	0.1651
30	0.5917	0.0819	98	0.5385	0.1200
40	0.7122	0.2250			

(n=5)

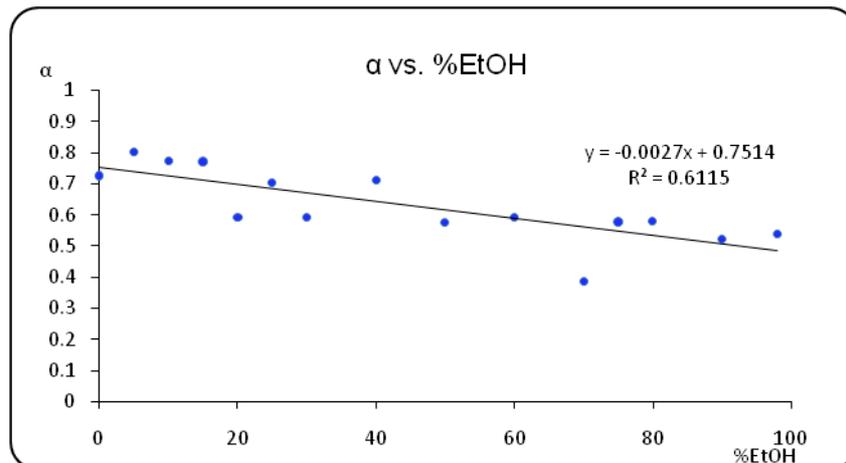


Figura 20.

Vemos que en la figura 20, la respuesta de la membrana en función del % de EtOH es muy irregular, además la desviación estándar de cada punto es excesiva debido a una mayor dispersión de los datos. Esto se debe principalmente a tres motivos:

- La apariencia de cada membrana es distinta inevitablemente, aunque en el proceso de preparación se intenta que todas tengan la mayor similitud posible. Sin embargo, esto no se consigue totalmente porque en el centro de la membrana aparece una zona más clareada que en el resto del círculo, siendo esta zona clara distinta en cada membrana (ver figura 21).

Las membranas fueron preparadas de forma manual ya que el equipo spin-coater se averió durante este periodo como antes se ha indicado.

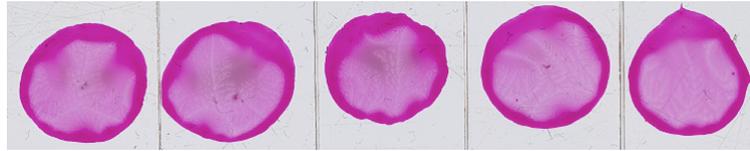


Figura 21. Imagen de 5 membranas en la que se puede observar como la zona central presenta un perfil diferente en cada membrana.

- Para medir la absorbancia es necesario introducir todas las membranas en el soporte metálico del espectrofotómetro exactamente de la misma forma. Aunque el soporte plástico de la membrana tiene las mismas dimensiones que el soporte metálico (ver figuras 7 y 12) pueden existir pequeñas variaciones de posición de una membrana a otra que sumado al hecho anteriormente comentado aumentan la desviación de las medidas.
- El cambio de color que experimenta la membrana en el intervalo de concentraciones de EtOH de 0% a 98% es muy pequeño, ya que son tonalidades de color muy parecidas.

### **3.10.2 Medidas de color (RGB y H)**

Las medidas de color se realizaron con un escáner convencional, en modo transmisión, estudiando principalmente la coordenada de color H (correspondiente al espacio de color HSV descrito en el apartado 3.4) como parámetro analítico.



Figura 22. Escáner ScanMaker i900 con el que se han realizado las medidas de color.

El valor de H oscila entre  $0^\circ$  y  $360^\circ$  correspondientes a la circunferencia de color que se muestra en la figuras 3 y 4, sin embargo este valor se divide entre  $360^\circ$  para obtener un valor normalizado entre 0 y 1. Este valor comprendido entre 0 y 1 es el que se utiliza en el cálculo del parámetro  $\alpha$  que dependerá de un valor máximo y un valor mínimo de H. El valor obtenido del parámetro alfa es comparativo entre las experiencias que se realicen, sin embargo H en cada caso tendrá valores muy similares aunque pueden diferir ligeramente entre sí debido a pequeñas variaciones en la preparación del coctel, consecuencia de la dificultad que supone la pesada de cantidades de productos en el orden de los miligramos. Así el parámetro alfa nos permite ver los datos reescalados entre 0 y 1.

Tanto el estudio intramembrana como intermembrana se realizaron atendiendo a la coordenada H, pero también se estudió previamente las coordenadas RGB obtenidas manualmente con el programa Adobe Photoshop CS (v8.0.1) a partir de cada imagen independiente.

#### ✓ **RD cóctel 1. Estudio RGB**

Estudiamos el cambio de color que sufre la membrana desde el espacio de color RGB evaluando la variación de estas coordenadas de forma independiente.

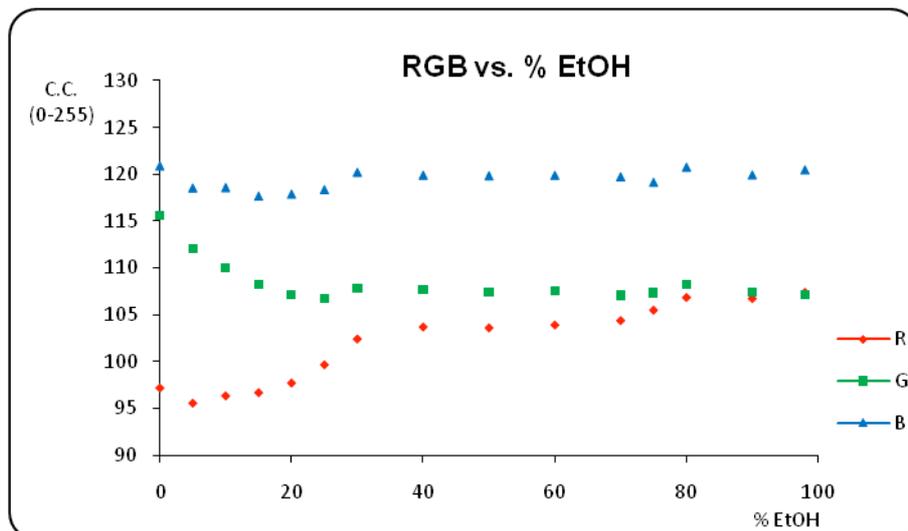


Figura 23.

En la figura 23 están representadas la variación de las coordenadas RGB, donde podemos ver como la coordenada de color B permanece prácticamente constante, y el cambio de color de la membrana se debe a la variación de las coordenadas R y G, las cuales prácticamente igualan su valor y permanecen prácticamente constantes a partir de disoluciones con un 40% de contenido en EtOH.

✓ **RD cóctel 1. Estudio intramembrana**

Tabla 13. Valores de H mínima y máxima de la membrana.

% EtOH	$H_{\min}/360^\circ$	% EtOH	$H_{\max}/360^\circ$
0	0.5246	98	0.6335

Tabla 1 4. Datos experimentales obtenidos.

%EtOH	$\alpha$	SD	% EtOH	$\alpha$	SD
0	0.0101	0.0090	50	0.7622	0.0123
5	0.1345	0.0098	60	0.7973	0.0246
10	0.2513	0.0065	70	0.8352	0.0553
15	0.3617	0.0089	75	0.8353	0.0499
20	0.4509	0.0071	80	0.8459	0.0195
25	0.5383	0.0056	90	0.8915	0.1038
30	0.6013	0.0126	98	0.7089	0.1396
40	0.7022	0.0235			

(n=5)

En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos de escanear 5 veces una misma membrana, donde podemos observar un rango lineal entre 0 y 30% de EtOH. Este tramo lineal (figura 25) se podría utilizar para la determinación del contenido en EtOH de una disolución.

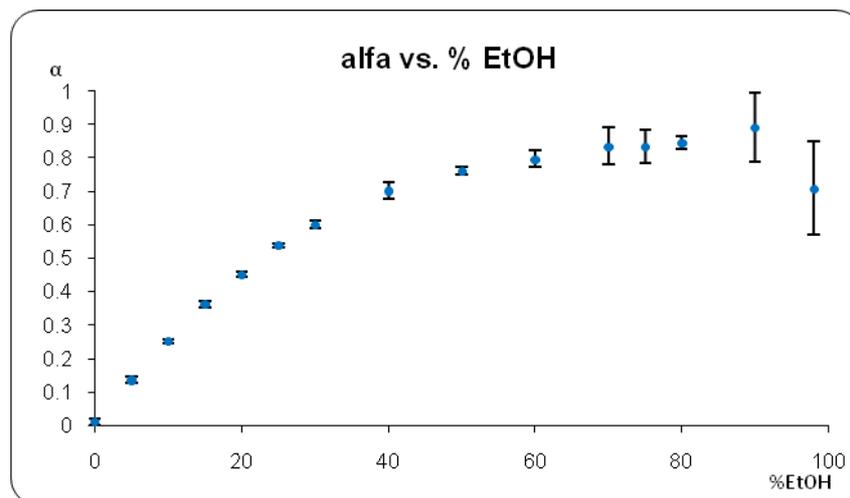


Figura 24.

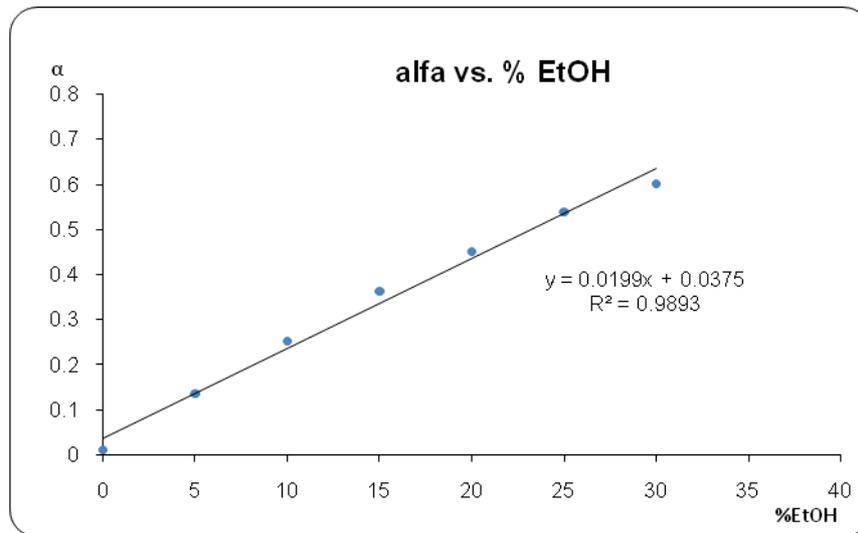


Figura 25.

✓ **RD cóctel 1. Estudio intermembrana**

Tabla 15. Valores de H mínima y máxima de la membrana.

% EtOH	H <sub>min</sub> /360°	% EtOH	H <sub>max</sub> /360°
0	0.5234	98	0.6468

Tabla 16. Datos experimentales obtenidos.

% EtOH	α	SD	% EtOH	α	SD
0	0.0201	0.0109	50	0.6903	0.0120
5	0.1184	0.0114	60	0.7387	0.0231
10	0.2227	0.0068	70	0.7896	0.0096
15	0.3167	0.0077	75	0.7988	0.0282
20	0.3946	0.0173	80	0.8070	0.0389
25	0.4869	0.0065	90	0.8950	0.0331
30	0.5360	0.0146	98	0.8717	0.0975
40	0.6380	0.0147			

(n=10)

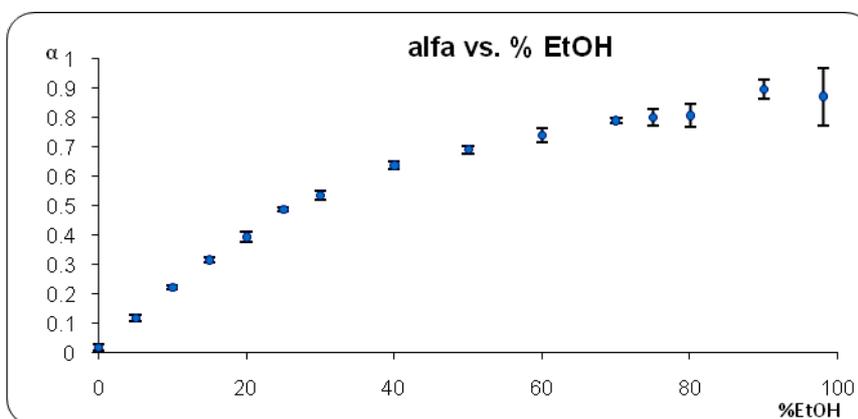


Figura 26.

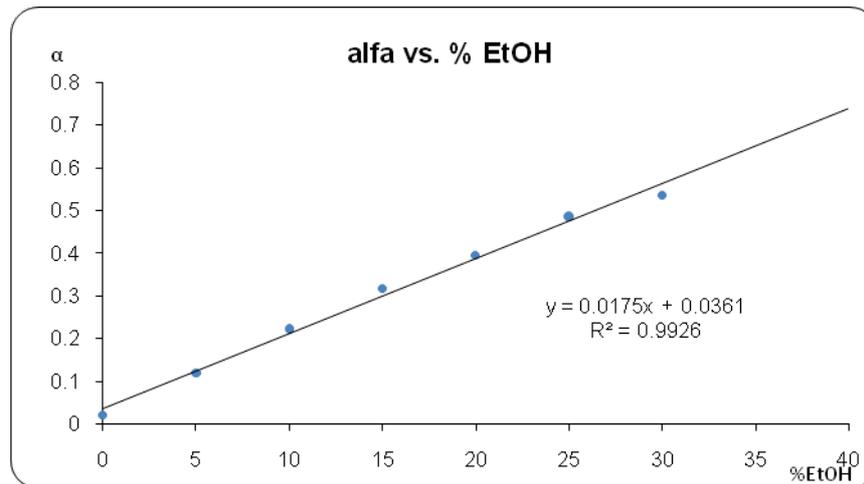


Figura 27.

En las figuras 26 y 27 observamos el mismo comportamiento, pero la linealidad mejora sensiblemente debido a que se ha trabajado con más datos.

Se intentó linealizar la función que se muestra en la figura 26 con StatGraphics Plus 4.1, para ver si respondía a algún modelo lineal, sin obtener buenos resultados.

En la figura 28 se observa un estudio independiente de 5 membranas donde todas siguen un mismo comportamiento excepto a elevadas concentraciones de EtOH, esta mayor dispersión de los datos se debe a que las membranas comenzaron a tener unas zonas punteadas de coloración más intensa que aparecieron a elevados porcentajes de EtOH. Este hecho se puede atribuir a un exceso de plastificante, ya que posteriormente se pudo corregir reduciendo la cantidad del mismo hasta 12  $\mu\text{L}$  de NPOE, no produciéndose ya este fenómeno. De todos modos ésta zona queda fuera del tramo lineal por lo que es un hecho que carece de importancia.

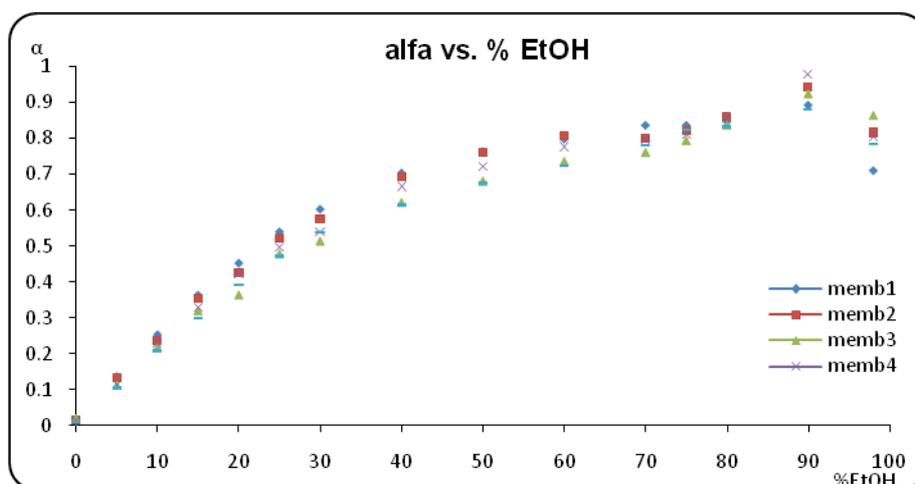


Figura 28.

### ✓ **NR cóctel 2. Estudio RGB**

Estudiamos el cambio de color que sufre la membrana desde el espacio de color RGB evaluando la variación de estas coordenadas de forma independiente.

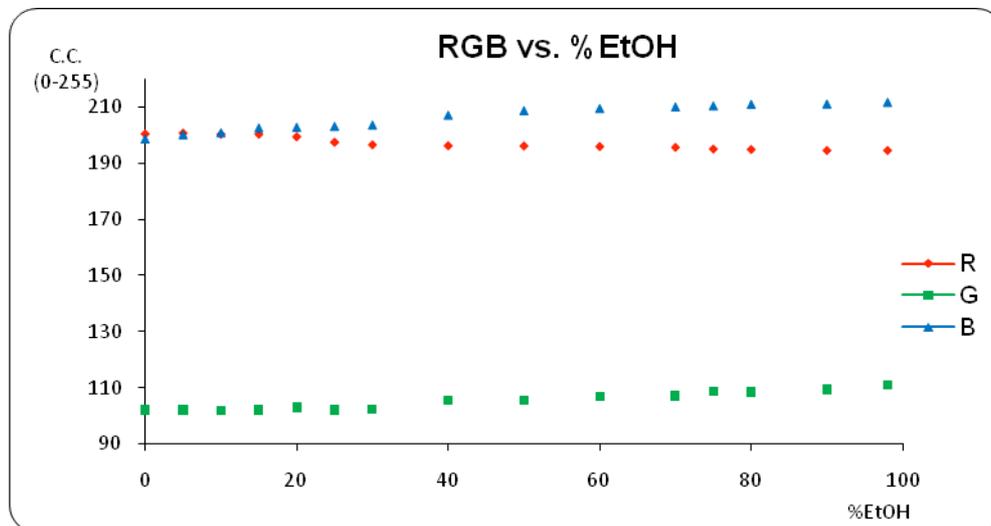


Figura 29.

En la figura 29 están representadas la variación de las coordenadas RGB, donde podemos ver cómo la coordenada de color G permanece prácticamente constante, y el cambio de color de la membrana se debe a la variación de las coordenadas R y B, las cuales varían sus coordenadas muy poco. Esto se debe a que el cambio de color está entre tonalidades muy próximas (el cambio de color de la membrana es de morado/lila en H<sub>2</sub>O a púrpura/violeta en EtOH).

### ✓ **NR cóctel 2. Estudio intramembrana**

En este caso no se disponen de los datos suficientes correspondientes al estudio intramembrana. Debido a un comportamiento no ideal de este tipo de membrana, se descartó dicho estudio ya que no nos va a proporcionar utilidad alguna para nuestro objetivo. Cada membrana por separado presenta un comportamiento irregular proporcionando gran dispersión de los datos obtenidos.

✓ **NR cóctel 2. Estudio intermembrana**

Tabla 17. Valores de H mínima y máxima de la membrana.

% EtOH	H <sub>min</sub> /360°	% EtOH	H <sub>max</sub> /360°
0	0.8453	98	0.8017

Tabla 18. Datos experimentales obtenidos.

% EtOH	$\alpha$	SD	% EtOH	$\alpha$	SD
0	0.7120	0.0392	50	0.3886	0.3431
5	0.6695	0.0694	60	0.3680	0.3153
10	0.6555	0.0603	70	0.2379	0.2407
15	0.6138	0.0767	75	0.3029	0.2758
20	0.5514	0.0736	80	0.3058	0.2564
25	0.5603	0.2562	90	0.2787	0.2875
30	0.5603	0.2562	98	0.2787	0.2875
40	0.4781	0.3249			

(n=5)

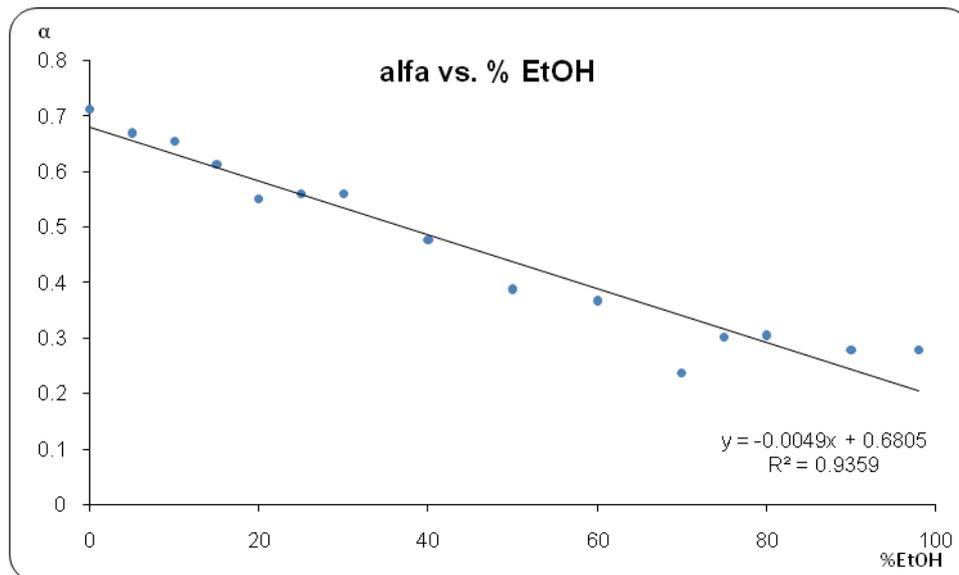


Figura 30.

En esta gráfica (figura 30) estudiamos la variación de color de estas membranas con el aumento de % en EtOH. Sin embargo, cada punto está acompañado por una desviación estándar considerable. Si analizamos los datos de cada membrana por separado, figura 31, vemos claramente cómo las membranas que se desvían del comportamiento propio son la 1 y la 3.

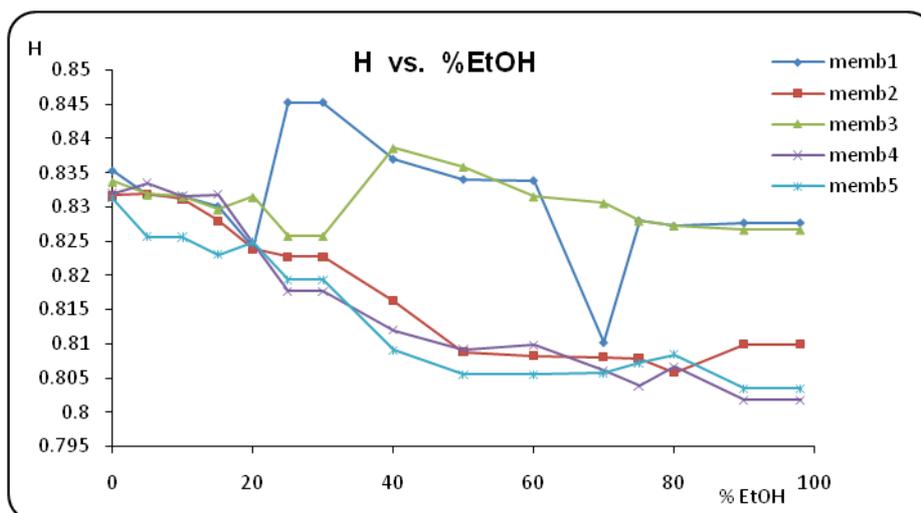


Figura 31.

Sin embargo, si volvemos a analizar los datos descartando los correspondientes a las membranas 1 y 3, lo único que conseguimos es una sustancial disminución en la desviación estándar de cada punto, pero no se consigue una mejora en la linealidad, por lo que excluimos la posibilidad de usar estas membranas para el diseño de un sensor solvatocrómico debido a un comportamiento muy irregular.

La irregularidad y la gran dispersión de los datos se deben a que el cambio de color es pequeño, la coordenada H varía muy poco y la desviación estándar del promediado de los datos asociado a cada medida está dentro de este rango de cambio de H, es decir no ofrece precisión alguna para proponer un método para determinación de EtOH en disoluciones.

### **3.11 Caracterización Analítica**

A continuación se presenta la caracterización analítica<sup>32</sup> correspondiente a las membranas elaboradas a partir del cóctel 1, usando la betaína de Reichardt como indicador solvatocrómico, ya que son las que mejores resultados nos han aportado para cumplir con nuestro objetivo en las pruebas previas realizadas. A partir de este estudio podremos evaluar los criterios de calidad.

Aunque se han realizado algunos intentos para elaborar membranas reproducibles a partir de un spin-coater diseñado usando un agitador magnético para dicho fin, esta iniciativa no nos ha aportado la solución que esperábamos, pues seguimos sin obtener membranas reproducibles, debido a que el soporte giratorio oscila, no consiguiéndose realmente un giro circular homogéneo.

Por consiguiente, vamos a realizar tanto el calibrado como la precisión y la exactitud sólo con las medidas de color, pues en absorbancia no obtendremos buenos resultados debido a la no homogeneidad de la membrana obteniendo mayor dispersión en los datos.

### **3.11.1 Calibración**

Vamos a hacer el calibrado analizando la evolución de la coordenada H dependiente del color de la membrana a medida que aumenta el contenido en EtOH de las disoluciones patrón. Para ello vamos a tomar los puntos a 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50% de EtOH. No merece la pena utilizar patrones de mayor concentración en EtOH porque a partir de un 40% se ve claramente cómo se pierde la linealidad de los datos.

En la siguiente figura, se muestra el color que adopta la membrana a 0, 50 y 98% de EtOH así como el valor de  $H/360^\circ$ , observando cómo el cambio importante de H se produce de 0 a 50% de EtOH aproximadamente ( $\Delta H=0,0878$ ), siendo el cambio de color que experimenta de 50 a 98% más pequeño ( $\Delta H=0,0361$ ), debido a la estabilización de la tonalidad de color que adquiere la membrana.



Figura 32. Imagen de la membrana y valor de H a 0, 50 y 98% de EtOH.

Tabla 19. Datos experimentales obtenidos en el calibrado.

% EtOH	H/360°	SD	% EtOH	H/360°	SD
0	0.5007	0.0007	30	0.5671	0.0017
5	0.5113	0.0023	35	0.5736	0.0014
10	0.5269	0.0014	40	0.5811	0.0005
15	0.5345	0.0007	45	0.5852	0.0015
20	0.5478	0.0006	50	0.5890	0.0007
25	0.5573	0.0007			(n=4)

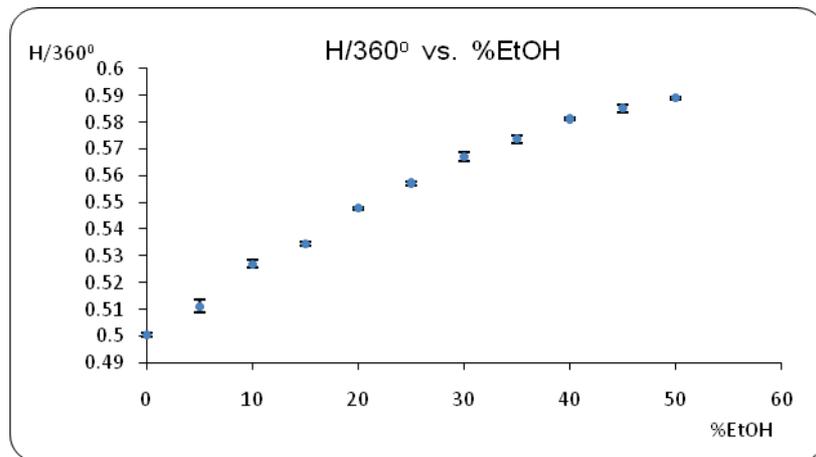


Figura 33.

En la figura 33 se observa la evolución de la coordenada H en función del tanto por ciento de EtOH, donde se puede ver cómo a partir de un 30 - 40% se pierde la linealidad. A continuación vamos a estudiar hasta qué tanto por ciento de Et-OH presenta buena linealidad la función de calibrado.

Figura 34, recta de calibrado hasta 40% de EtOH. Se obtiene un buen coeficiente de correlación lineal r, aunque mejorable.

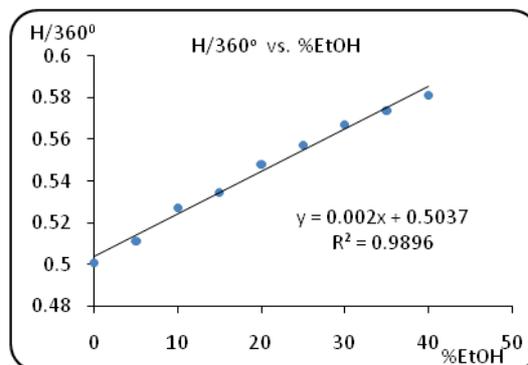


Figura 34.

Figura 35, recta de calibrado hasta 35% de EtOH. Se observa como mejora la linealidad ( $r = 0.992$ ).

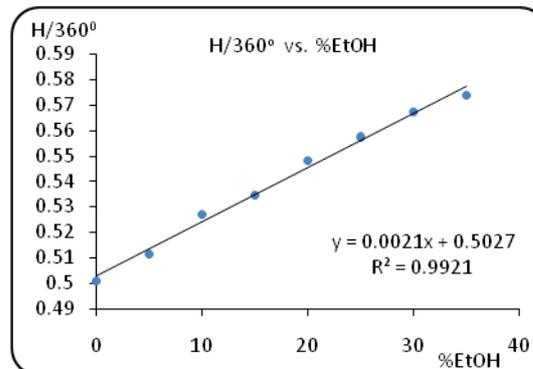


Figura 35.

Figura 36, recta de calibrado hasta 30% de EtOH. Se observa como mejora la linealidad ( $r = 0.995$ ).

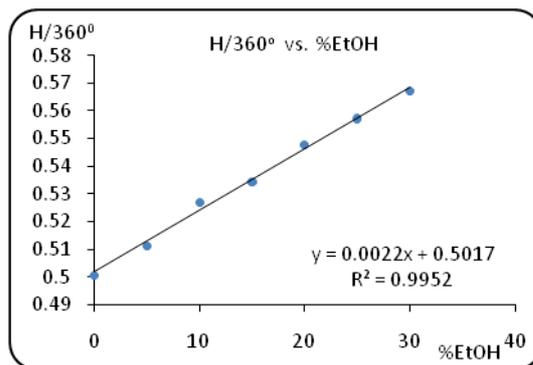


Figura 36.

Tomando como recta de calibrado la recta correspondiente a la figura 36 cuya ecuación de calibrado corresponde a:

$$\frac{H}{360^\circ} = 0.0022 + 0.5017 \cdot [\%EtOH]$$

$$(r = 0.995)$$

Continuamos con la caracterización analítica calculando el rango dinámico lineal, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud.

### **3.11.2 Límite de Detección (LD)**

El límite de detección mínimo (LD) ó la concentración mínima detectable es un parámetro estadístico que se define como la cantidad o concentración más pequeña del analito que produce una señal significativamente diferente de la señal del ruido de fondo. Experimentalmente, el límite de detección se determina involucrando todos los factores que afectan la medida y se define, en general, para obtenerlo en unidades de concentración como:

$$LD = \frac{3\sigma_b}{m}$$

Donde,  $\sigma_b$  es la desviación estándar del blanco, y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración del sistema. Este criterio es recomendado por la IUPAC.

Tabla 20. Datos experimentales del blanco.

% EtOH	H/360°	SD
Blanco 0	0.5007	0.0007

$$LD = \frac{3\sigma_b}{m} = \frac{3 \cdot 0.0007}{0.0022} = 0.9 \%EtOH$$

### **3.11.3 Límite de Cuantificación (LQ)**

El límite de cuantificación (LQ) corresponde a la cantidad o concentración de analito a partir de la cual es confiable realizar determinaciones cuantitativas y se define como:

$$LQ = \frac{10\sigma_b}{m}$$

Donde,  $\sigma_b$  es la desviación estándar del blanco, y  $m$  es la pendiente de la curva de calibración del sistema.

Tabla 21. Datos experimentales del blanco.

% EtOH	H/360°	SD
Blanco 0	0.5007	0.0007

$$LQ = \frac{10\sigma_b}{m} = \frac{10 \cdot 0.0007}{0.0022} = 3 \%EtOH$$

### 3.11.4 Rango Dinámico Lineal (RDL)

El Rango Dinámico Lineal se define como el intervalo de la recta de calibrado (intervalo de concentraciones de analito) en el que es aplicable el método analítico. Esta comprendido entre el límite de cuantificación (LOQ, limit of quantify) y el límite superior del intervalo lineal (LOL, limit of linearity) que es donde la recta pierde su linealidad (ver figura 37).

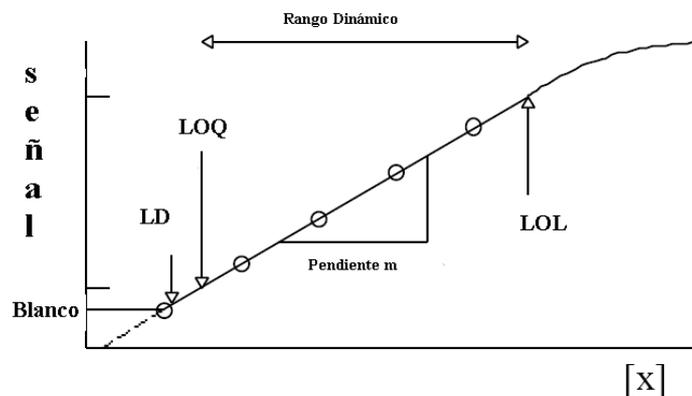


Figura 37. Rango Dinámico Lineal.

En nuestro caso el RDL está comprendido ente el LQ = 3% EtOH y el LOL= 30% EtOH.

### 3.11.5 Precisión

La precisión expresada como desviación estándar relativa (DER) de un cierto número de medidas repetidas, es un parámetro indicativo del grado de incertidumbre que debemos esperar en los resultados analíticos.

Se pueden definir dos tipos de precisión, precisión intramembrana que indica la precisión de la medida utilizando una misma membrana (repetitividad), y la precisión intermembrana que indica la variabilidad que introduce el empleo de membranas diferentes, es decir indica la variabilidad introducida en la construcción de las membranas.

Para establecer la precisión del procedimiento propuesto para la determinación del % de EtOH, que se expresará como desviación estándar relativa (DER), se realizó un estudio a tres niveles en la zona baja, media y alta de la recta de calibrado. Las concentraciones que se utilizaron para esta experiencia fueron 5, 20 y 30% de EtOH.

**a) Precisión intramembrana.** Se realizó un estudio de la precisión usando una misma membrana en introduciéndola en cada una de las disoluciones de contenido en EtOH propuesto anteriormente. Se repitió el proceso con la misma membrana 5 veces.

Tabla 22. Precisión intramembrana para medidas de color.

% EtOH	H/360°					DER (%)
	1	2	3	4	5	
5	0.5383	0.5378	0.5355	0.5359	0.5395	0.31
20	0.5744	0.5737	0.5736	0.5725	0.5743	0.13
30	0.5921	0.5885	0.5894	0.5907	0.5898	0.23
40	0.6050	0.6026	0.6038	0.6036	0.6030	0.15

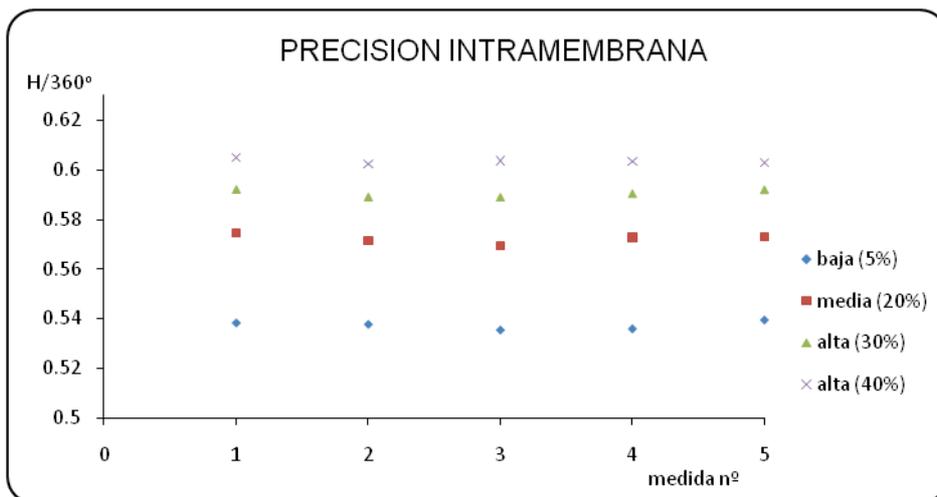


Figura 38.

En esta gráfica (figura 38) observamos que la precisión que nos ofrece una misma membrana es bastante buena, observándose ligeramente una mayor DER en los valores de H correspondientes a baja concentración de EtOH, pero demasiado

pequeña como para deducir que se deba a algún motivo en concreto. La DER observada es la propia asociada a cualquier medida.

**b) Precisión intermembrana.** En este caso se utilizan diez membranas elaboradas a partir del mismo coctel (de composición optimizada), y se sumergen en las distintas disoluciones de concentración de EtOH baja, media y alta. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla 23. Precisión intermembrana para medidas de color.

EtOH %	H/360°										DER (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
5	0.5131	0.5126	0.5087	0.5112	0.5114	0.5125	0.5092	0.5138	0.5108	0.5143	0.36
20	0.5477	0.5485	0.5467	0.5504	0.5493	0.5485	0.5470	0.5502	0.5476	0.5503	0.25
30	0.5669	0.5671	0.5663	0.5663	0.5668	0.5661	0.5654	0.5672	0.5666	0.5705	0.24
40	0.5795	0.5784	0.5778	0.5783	0.5792	0.5792	0.5792	0.5705*	0.5753	0.5810	0.26

(\* valor rechazado)

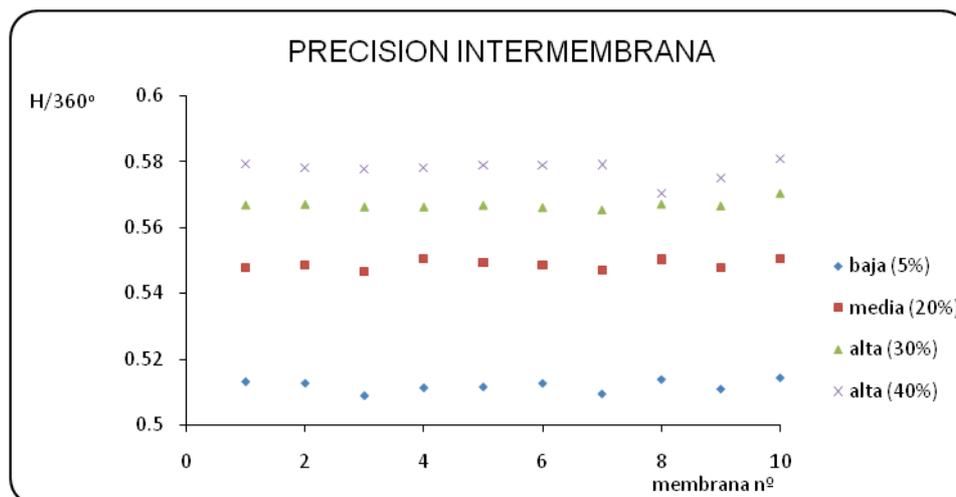


Figura 39.

En esta gráfica (figura 39) observamos la precisión que nos ofrecen distintas membranas confirmando que es bastante buena. La DER observada es la propia asociada a cualquier medida. Por tanto, aunque no disponemos de un sistema para elaborar membranas reproducibles, éste parece no ser un problema pues las membranas difieren en forma entre sí como se puede ver en la figura 40, pero el valor de H que se obtiene de cada membrana es un promedio de toda la zona coloreada, es decir no importa tanto la forma de cada membrana si todas ellas toman el mismo color, cosa que ocurrirá si éstas proceden de un mismo cóctel.



Figura 40. Imagen de las 10 membranas con las que se ha estudiado la precisión intermembrana, donde se observa que no todas tienen la misma forma ni el mismo diámetro.

### 3.11.6 Exactitud

La exactitud entendida como la proximidad entre el valor obtenido o medido y el valor real, la vamos a evaluar midiendo disoluciones patrón conocidas de 5, 20 y 30% de EtOH.

Tabla 24. Exactitud de las medidas de color.

EtOH %	H/360°	[EtOH] %	[EtOH] <sub>m</sub> %	SD	t <sub>exp</sub>	t <sub>crit</sub> (α=0,05)	t <sub>exp</sub> <t <sub>crit</sub>	veracidad	$[\text{EtOH}] \pm \frac{SD \cdot t}{\sqrt{n}}$
5	0.5124*	4.8823*							
5	0.5055*	1.7075*							
5	0.5088	3.2199							
5	0.5072	2.5103							
5	0.5083	2.9987							
5	0.5073	2.5282	2.8142	0.3525	12.400	2.571	NO	NO	2.81 ± 0.45%
20	0.5463	20.2726							
20	0.5452	19.7529							
20	0.5451	19.7069							
20	0.5465	20.3412							
20	0.5457	19.9928							
20	0.5472	20.6720	20.1231	0.3738	0.807	2.571	SI	SI	20.12 ± 0.39%
30	0.5684	30.3158							
30	0.5679	30.1095							
30	0.5670	29.6787							
30	0.5676	29.9560							
30	0.5669	29.6161							
30	0.5660	29.2092	29.8142	0.3956	1.050	2.571	SI	SI	29.81 ± 0.41%

\* valores rechazados.

Si  $t_{exp} > t_{crit}$ , el valor verdadero y el valor medio difieren significativamente, es decir el valor medio es erróneo, no es veraz, debido a un error sistemático. Es lo que ocurre cuando empleamos un 5% de EtOH, aunque desconocemos cual puede haber sido el error cometido.

Si  $t_{exp} < t_{crit}$ , el valor verdadero y el valor medio no difieren significativamente, es decir el valor medio es correcto, es veraz y no habrá signos de que se haya cometido un error sistemático. Se puede concluir que los resultados a 20 y 30% de EtOH tienen buena exactitud.

Los resultados expresados en función del coeficiente de variación (CV%) o desviación estándar relativa (DER%) son:

Tabla 25. Exactitud de las medidas de color expresado en función del C.V.

% EtOH	% [EtOH]	C.V.(%)	n
5	2.8	12.52	4
20	20.1	1.86	6
30	29.8	1.33	6

La exactitud que presenta este tipo de sensores es relativamente buena, pues no podemos exigir una excelente precisión y exactitud a este tipo de sistemas, ya que se diseñan con un objetivo principal orientador y/o clasificatorio de la muestra analizada. El analista es el que debe tomar la decisión de si la muestra reúne las condiciones para que sea analizada más exhaustivamente con un método de referencia. Estos sensores se desarrollan con la intención de tomar decisiones de tipo disyuntivo (por ejemplo, muestra contaminada: si o no), pero si además de una información cualitativa podemos obtener información cuantitativa aproximada, tanto mejor.

#### 4. PLANTEAMIENTO A CORTO PLAZO

A partir de ahora y tras los resultados encontrados con los indicadores ensayados, vamos a continuar con el proyecto de desarrollar una lengua electrónica, diseñando el resto de sensores para evaluar otros posibles parámetros (pH, cationes alcalinos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , y otros metales de transición como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ...).

No obstante, vamos a continuar ampliando el estudio del sensor solvocrómico en cuanto a lo referente a estudios de estabilidad temporal del indicador de Reichardt y otros posibles indicadores, ya que la betaína de Reichardt ha sido ampliamente utilizada para fines similares, aunque en bibliografía no se ha encontrado que éste haya sido empleado en una membrana de soporte polimérica como la presentada por nosotros, sino directamente en disolución realizando medidas de absorbancia.

Como posibles alternativas hemos planteado la posibilidad de probar dos indicadores, que ya fueron planteados en el apartado 3.5, el azul fenol (figura 41, y el 2-(4'-hidroxistiril)-N-metil-quinolinio betaína (figura 42).

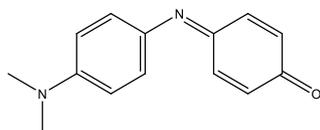


Figura 41. Azul fenol

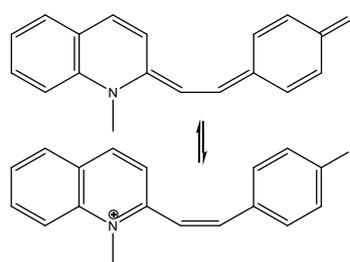


Figura 42. 2-(4'-hidroxistiril)-N-metil-quinolinio betaína

Tras este periodo de investigación hemos podido concluir que para que un indicador nos ofrezca un buen cambio en el parámetro H, debe presentar un buen cambio de color. Para que un indicador nos garantice un buen cambio de color en el que la coordenada de color H sea aprovechable como parámetro analítico, debe presentar un espectro de absorción UV-Visible del tipo del que se muestra en la figura 43, que es el que se corresponde con el indicador 2-(4'-hidroxistiril)-N-metil-quinolinio betaína. Es decir, que el máximo de absorción se desplace considerablemente de una longitud de onda determinada a otra mayor o menor, al pasar de un medio polar a otro apolar, pero que dicho desplazamiento del máximo de absorción sea aproximadamente mayor de unos 100nm.

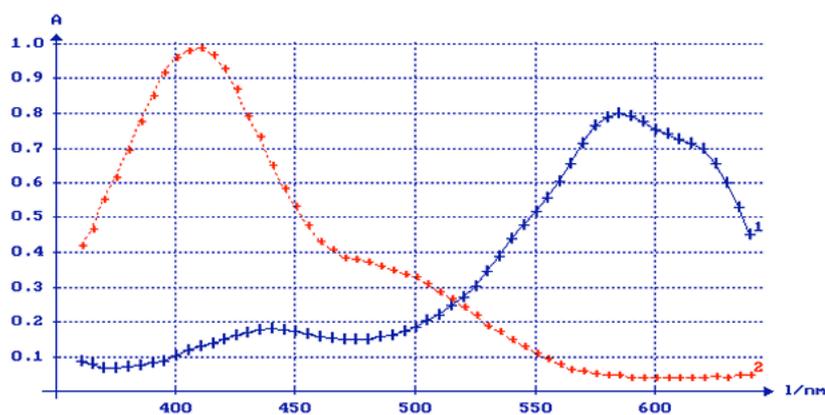


Figura 43. Espectro de absorción de 2-(4'-hidroxiestiril)-N-metil-quinolinio betaína en cloroformo (1) y agua (2).

Lo que hemos observado hasta ahora, es que los indicadores empleados presentan espectros de absorción UV-Vis, con un desplazamiento del máximo y disminución del mismo pequeño (<50nm). Esto implica que sí existe un cambio de color pero, la coordenada H será poco aprovechable. Esto es lo que ha ocurrido con el rojo Nilo que muestra un espectro de absorción UV-Vis del tipo que muestra la figura 10 (apartado 3.9). Sin embargo con la betaína de Reichardt teníamos un cambio de color de verde a azul con un espectro del tipo que muestra la figura 9 (apartado 3.9), tal que, como ya se ha demostrado sólo nos sería útil para mezclas de disolventes agua - etanol hasta un  $\approx 30\%$  de EtOH.

No obstante estos dos nuevos indicadores que hemos propuesto para su posible utilización en un sensor solvatocrómico presentan algunas características que debemos estudiar previamente y plantear su potencial aplicación para tal fin.

Ahora bien, el inconveniente que nos presenta el azul fenol es que tiene un desplazamiento del máximo de absorción al cambiar de medio polar (2,2,2-trifluoroetanol  $\epsilon=26.6$ ) a no polar (ciclohexano  $\epsilon=2.02$ ) de  $\Delta\lambda=108.19\text{nm}$  (ver tabla 1, del apartado 3.5). Si a este hecho le sumamos que el agua tiene una constante dieléctrica de  $\epsilon=80.4$ , al ser un indicador que presenta el fenómeno de solvatocromismo positivo al aumentar la polaridad, también aumentaría la longitud de onda de absorción, siendo el cambio de color inapreciable o nulo, pues seguiríamos viendo el verde inicial que presentaría en EtOH ( $\epsilon=24.3$ ). Como parte positiva podemos comentar que este indicador está disponible comercialmente a un precio económico en relación cantidad-precio.

Por otra parte, el 2-(4'-hidroxiestiril)-N-metil-quinolinio betaína, parece ser una buena opción como alternativa pues presenta un espectro del tipo que nos interesaría (ver figura 43). A priori, predecimos que se podría aprovechar este cambio de color que sufre el indicador en su paso de un medio apolar (cloroformo  $\epsilon=4.81$ ) a un medio polar ( $H_2O$   $\epsilon=80.4$ ), siendo la variación en el máximo de absorción de  $\Delta\lambda=175nm$ , aunque nosotros partiríamos de un medio parcialmente polar (EtOH  $\epsilon=24.3$ ) por lo que dicha variación sería menor, partiríamos de una  $\lambda>410nm$ . Sin embargo este indicador (figura 44) no se encuentra disponible comercialmente, aunque sí está disponible un derivado suyo (figura 45).

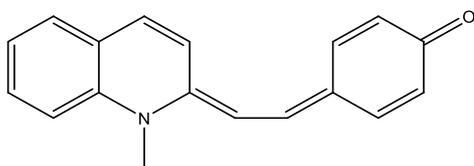


Figura 44. 2-(4'-hidroxiestiril)-N-metil-quinolinio betaína. No disponible comercialmente.

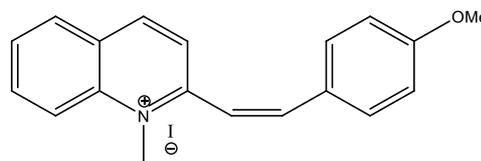
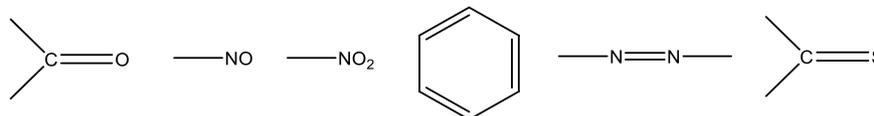


Figura 45. Yoduro de 2-(4'-metoxistiril)1-metilquinolinio. Derivado disponible comercialmente.

*La absorción UV-Vis se debe a los grupos cromóforos (principalmente carbonilos, nitros, nitrilos, aromáticos, azos y tiocarbonilos) por ello todos los indicadores presentados hasta ahora tienen algún grupo cromóforo (frecuentemente carbonilo). Sin embargo, la molécula que pretendíamos usar, probablemente no presentará absorción en el UV-Vis de forma que no nos proporcione la utilidad que queremos (o por lo menos no de igual forma que el compuesto original) porque se ha cambiado el grupo carbonilo por un metoxilo. Además no muestra información de absorción UV-Vis en el catalogo de Sigma-Aldrich por lo que no disponemos de datos para confirmar si presenta absorción en el UV-Vis y a qué longitud de onda.*



Pero este derivado (figura 45) presenta un metoxilo en lugar del carbonilo, por lo que es lógico pensar que si pierde este grupo cromóforo, el cambio crómico diferirá respecto de lo que teóricamente hemos previsto. Una posibilidad sería comprarlo y hacer una oxidación del metoxilo a carbonilo, suponiendo que no se den reacciones secundarias. Alternativa arriesgada pues estamos hablando de un producto caro y del

cual sólo contamos con 250 mg por cada unidad, recuperando una cantidad menor de producto si la reacción fuese viable. Por ello barajamos la posibilidad de sintetizarlo, conscientes de la complejidad que implicaría esta alternativa.

Otra posibilidad que hemos planteado, es usar el compuesto 4-[(1-Metil-4(1H)-piridinilideno)etilideno]-2,5-ciclohexadien-1-ona hidratado (figura 46), el cual si está disponible comercialmente y tiene un precio asequible. Si nos fijamos en la estructura molecular conserva cierta similitud con el compuesto presentado en la figura 46, que es el que nos interesa. Además este compuesto presenta absorción en UV-Vis a  $\lambda_{\text{max}} = 443\text{nm}$ .

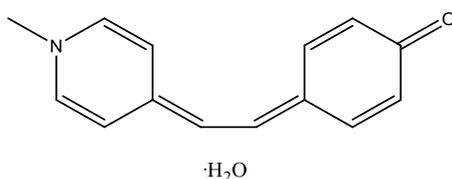


Figura 46. Estructura del 4-[(1-Metil-4(1H)-piridinilideno)etilideno]-2,5-ciclohexadien-1-ona hidratado

## **5. CONCLUSIONES**

En esta Memoria se ha detallado el estudio llevado a cabo sobre un sensor solvatocrómico, basado en el cambio de color que sufre la membrana sensora en función del cambio de polaridad del medio. Se ha enfocado en la determinación de alcohol en mezclas etanol-agua, con la intención de desarrollar una futura lengua óptica para bebidas alcohólicas donde éste sería un parámetro a determinar.

Para ello se han estudiado dos posibles indicadores y planteado algunos otros indicadores alternativos. De los dos indicadores investigados se ha medido el cambio de absorbancia con un espectrofotómetro y de color con un escáner convencional, que opera por reflexión siendo los datos de color mejores que los de absorbancia, debido a un problema de inhomogeneidad en las membranas, derivado de su preparación manualmente, que impedía obtener membranas reproducibles, problema que no ha afectado a las medidas de color por transreflectancia realizadas con un escáner, donde se evaluó la evolución de la coordenada de color H (tonalidad) como parámetro analítico. De este hecho se puede concluir pues, que la forma de la membrana no afecta a la medida, ya que el software que se utiliza para obtener el valor de H promedia el color de toda la membrana sin que su homogeneidad afecte a dicho valor.

De los resultados obtenidos podemos concluir que uno de los indicadores, el rojo Nilo, no nos proporciona buenos resultados debido a que su variación de color es mínima (morado/lila → púrpura/violeta) y el parámetro H que mide la tonalidad de color, por tanto, varía muy poco, impidiendo garantizar buena precisión en los resultados. Sin embargo, el otro indicador solvatocrómico estudiado, la betaína de Reichardt, cuyo cambio de color está comprendido entre verde y azul, ofrece unos resultados bastante buenos, precisos aunque de limitada exactitud, sobre todo a bajas concentraciones, pero no siendo aplicable a disoluciones que superen un 30% en el contenido de EtOH.

Como próximo objetivo nos hemos marcado probar otros indicadores alternativos, previo estudio teórico, para ampliar el rango de medida e innovar en cuanto a indicadores solvatocrómicos se refiere.

Además nos planteamos evaluar la efectividad de este sensor solvatocrómico desarrollado para la determinación de alcohol en bebidas aplicándolo sobre muestras reales como pueden ser vino, cerveza, vodka y otras, estudiando a su vez si la

membrana se afecta por otros componentes de la matriz y si sería necesario un tratamiento previo de la muestra para su decoloración, dilución, etc.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Yuri Vlasov, Andrey Legin, Alisa Rudnitskaya.  
*Electronic tongues and their analytical application.*  
Anal Bioanal Chem, **373**, 136-146 (2002).
- [2] Yuri Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, and A. D'amico.  
*Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids.*  
Pure And applied Chemistry, **77**, 1965-1983 (2005).
- [3] John J. Lavigne, Steve Savoy, Marvin B. Clevenger, Jason E. Ritchie, Bridget McDoniel, Seung-Jin Yoo, Eric V. Anslyn, John T. McDevitt, Jason B. Shear, and Dean Neikirk.  
*Solution-Based Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array: Toward the Development of an "Electronic Tongue".*  
Journal American Chemical Society, **120**, 6429-6430 (1998).
- [4] Patrycja Ciosek and Wojciech Wroblewski.  
*Sensor arrays for liquid sensing – electronic tongue systems.*  
The Royal Society of Chemistry, **132**, 963-978 (2007).
- [5] Aaron T. Wright and Eric V. Anslyn.  
*Differential receptor arrays and assays for solution-based molecular.*  
The Royal Society of Chemistry, **35**, 14–28 (2006).
- [6] Kiyoshi Toko. Review article.  
*A taste sensor.*  
Measurement Science and Technology, **9**, 1919-1936 (1998).
- [7] Chen Zhang and Kenneth S. Suslick.  
*A Colorimetric Sensor Array for Organics in Water.*  
Journal American Chemical Society, **127**, 11548-11549 (2005).
- [8] Gallego y J. C. Sanz.  
*Atlas cromatográfico.*  
Editorial H. Blume.
- [9] Eduardo J. Gilabert.  
*Medida del Color.*  
Universidad politécnica de Valencia.
- [10] Jon Y. Hadberg Ph. D.  
*Acquisition and Reproduction of Color Images. Colorimetric and Multispectral Approaches.*  
Universal Publisher, US.

- [11] Enrique Hita Valverde.  
*El mundo del color. Desde lo perceptivo y artístico a lo científico.*  
Universidad de Granada. Monográfica.
- [12] Yingguang Wu, Masaaki Tabata.  
*Characterization of Solvent Polarity of aqueous mixed solvents by using solvatochromic indicators.*  
The Japan society for Analytical Chemistry. Analytical Sciences, **17**, supplement (2001).
- [13] Fernando Jiménez Muñoz, Daniel Carreño Cifuentes, Fleming Martínez Rodríguez.  
*Parte I. Índice de refracción y constante dieléctrica aparente.*  
Determinación de algunas constantes fisicoquímicas de mezclas ternarias solventes de uso farmacéutico.
- [14] Peter Keusch.  
*Organic Chemistry Demonstration Experiment.* University of Regensburg.  
[http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische\\_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Video-e.htm](http://www.chemie.uni-regensburg.de/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Video-e.htm)
- [15] Christian Reichardt.  
*Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators.*  
American Chemical Society. Chemical reviews, **94**, No 8 (1994).
- [16] Daniel Citterio, Takashi Kawada, Jun Yagi, Tomonori Ishigaki, Hideaki Hisamoto, Shin-ichi Sasaki, Koji Suzuki.  
*Molecular design, characterization, and application of multiinformation dyes for optical chemical sensing IV. Multiinformation dyes with extended spectral sensitivity in the near-infrared spectral range.*  
Analytica Chimica Acta, **482**, 19-28 (2003).
- [17] Bruce R. Osterby and Ronald D. Mckelvey.  
*Convergent synthesis of Betaine-30, a Solvatochromic dye.*  
Journal of Chemical Education, **73**, 260-261 (1996).
- [18] Gerhard J. Mohr.  
*Materials and Polymers in Optical Sensing.*  
Institute of Physical Chemistry.
- [19] Rudolf Eugster, Thomas Rosatzin, Bruno Rusterholz, Barbara Aebersold, Urs Pedrazza, Denise Rüegg, Angela Schmid, Ursula E. Spichiger, Wilhelm Simon.  
*Plasticizers for liquid polymeric membranes of ion-selective chemical sensors.*  
Analitica Chimica Acta, **298**, 1-13 (1994).
- [20] Taihe Deng and William E. Acree Jr.  
*Selection of an Analysis Wavelength: An Interesting Example Involving Solvatochromism and the Zwitterionic Dimroth-Reichardt's Betaine ET-30 Dye.*  
Journal of Chemical Education, **76**, No 11, 1555-1556 (1999).

- [21] P. G. Jasien, L. L. Weber.  
*A CIS study of solvent effects on the electronic absorption spectrum of Reichardt's dye.*  
Journal of Molecular Structure (Theochem), **572**, 203-212 (2001).
- [22] T. William Bentley and In Sun Koo.  
*Role of hydroxyl concentrations in solvatochromic measures of solvent polarity of alcohols and alcohol–water mixtures—evidence that preferential solvation effects may be overestimated.*  
The Royal Society of Chemistry. Organic and Biomolecular Chemistry, **2**, 2376-2380 (2004).
- [23] Erwinb Uncel and Srinivasan Rajagopal.  
*Solvatochromism and Solvent Polarity Scales.*  
American Chemical Society. Accounts of Chemical Research, **23**, 226-231 (1990).
- [24] Christian Reichardt.  
*Solvents and Solvent Effects: An Introduction.*  
Organic Process Research & Development, **11**, 105-113 (2007).
- [25] N. O. Mchedlov-Petrosyan, Yu. V. Isaenko, and S. T. Goga.  
*Reichardt Betaines as Combined Solvatochromic and Acid-Base Indicators in Microemulsions.*  
Russian Journal of General Chemistr, **74**, No. 11, 1741-1747 (2004). Translated from Zhurnal Obshchei Khimii, **74**, No. 11, 1871-1877 (2004).
- [26] A. M. Mehranpour and S. Hashemnia.  
*Solvatochromism in Binary Solvent Mixtures by Means of a Penta-tert-butyl Pyridinium N-Phenolate Betaine Dye.*  
Journal of the Chinese Chemical Society, **53**, 759-765 (2006).
- [27] Wen-Ge Han, Tiqing Liu, Fahmi Himo, Alexei Toutchkine, Donald Bashford, Klaus M. Hahn,[b] and Louis Noodleman.  
*A Theoretical Study of the UV/Visible Absorption and Emission Solvatochromic Properties of Solvent-Sensitive Dyes.*  
Chemphyschem, **4**, 1084-1094 (2004).
- [28] Jerry F. Deye and T. A. Berger.  
*Nile Red as a Solvatochromic Dye for Measuring Solvent. Strength in Normal Liquids and Mixtures of Normal Liquids with Supercritical and Near Critical Fluids.*  
American Chemical Society. Analytical Chemistry, **62**, No. 6, 615-622 (1990).
- [29] Adrian J. Carmichael and Kenneth R. Seddon.  
*Polarity study of some 1-alkyl-3-methylimidazolium ambient-temperature ionic liquids with the solvatochromic dye, Nile Red.*  
Journal of Physical Organic Chemistry, **13**, 591–595 (2000).
- [30] Christina M. Golini, Brian Wesley Williams, and James B. Foresman.  
*Further Solvatochromic, Thermochromic, and Theoretical Studies on Nile Red.*  
Journal of Fluorescence, **8**, No. 4, 395-404 (1998).
- [31] Ashim Kumar Dutta, Kenji Kamada, Koji Ohta.  
*Spectroscopic studies of nile red in organic solvents and polymers.*

Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry, **93**, 57-64 (1996).

[32] Ramis Ramos, Antonio.

Quimiometría / Guillermo Ramis Ramos, M<sup>a</sup> Celia García Álvarez-Coque.

Síntesis 2001.