

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS

**“DESARROLLO DE UN DISPOSITIVO PORTÁTIL DE MEDICIÓN
COLORIMÉTRICA EN EL ESPACIO DE COLOR RGB A PARTIR
DE UN NANOOPTODO REVERSIBLE SELECTIVO A IONES
POTASIO (ISO) BASADO EN IONÓFORO VALINOMICINA
ESTABILIZADO CON PLURONIC F-127 CON APLICACIONES A
SUELOS AGRÍCOLAS”**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON
MENCION EN QUÍMICA**

**ELABORADO POR:
MIGUEL OMAR VILLANUEVA VILLANUEVA**

**ASESOR:
DR. GINO ÍTALO PICASSO ESCOBAR**

LIMA - PERÚ

2024

Agradecimiento

Al grupo de investigación TECMARA (Tecnología de materiales para remediación ambiental)
de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI), Facultad Ciencias.

Especialmente al Dr. Gino Picasso y Dr. Jaime Vega.

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico Tecnológico y de Innovación Tecnológica
(FONDECYT) por la beca doctoral No. 237-2017-FONDECYT

Al Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional de Ingeniería
con el Proyecto Formativo VRI-DIGI 2022 (FC-PF-32-2022)

con el proyecto colaborativo con la Universidad Keele del Reino Unido

Proyecto E041-2018-01-BC (N°227-2018-FONDECYT)

Especialmente al Dr. Aleksandar Radu y Dr. Ernesto Saiz

Finalmente al inmenso apoyo de mi familia
mi madre Mery, mi esposa Gaby y mi hija Nicole

ÍNDICE DE CONTENIDO

Agradecimiento	II
ÍNDICE DE CONTENIDO	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT	XXII
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	26
1.1. Introducción	26
1.2. Justificación social	26
1.2.1. Necesidad de monitoreo de potasio en cultivos	26
1.2.2. Falta de conexión entre universidades y laboratorios analíticos	27
1.3. Justificación científica	27
1.3.1. Necesidad de metodologías portátiles para cuantificar potasio	27
1.3.2. Necesidad de métodos analíticos validados para el monitoreo de potasio en suelos	27
1.4. Estado del arte.....	28
1.4.1. Planteamiento del problema	31
1.4.2. Aporte científico inédito del proyecto	32
1.5. Hipótesis	33
1.6. Objetivos.....	36
1.6.1. Objetivo general	36
1.6.2. Objetivos específicos.....	36
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	38

2.1.	Potasio.....	38
2.1.1.	Importancia del potasio	38
2.2.	Sensor químico	38
2.3.	Optodo	39
2.4.	Componentes de un optodo.....	40
2.5.	Mecanismo de reconocimiento del optodo	42
2.6.	Nano-optodo	52
2.7.	Salas de tetrafenil borato.....	53
2.8.	Reversibilidad de los nano-optodos	55
2.9.	Teoría del color	56
2.10.	Métodos colorimétricos con sensores ópticos	58
2.11.	Captura de imágenes con cámaras digitales.....	59
2.12.	Métodos analíticos basados en la captura de imágenes	61
2.13.	Instrumentación de dispositivos de captura de imágenes	63
2.13.1.	Cámaras digitales	63
2.13.2.	LED	65
2.13.3.	Transductor de señal.....	65
2.14.	Técnicas de caracterización de los nano-optodos	66
2.14.1.	Microscopía electrónica de barrido (SEM)	66
2.14.2.	Dispersión dinámica de luz (DLS)	67
2.14.3.	Efecto Tyndall	68
2.15.	Validación analítica	69
2.16.	Estadística	70
2.16.1.	Estadística descriptiva	70
2.16.2.	Estadística inferencial.....	72

2.16.3. Gráfico de control.....	72
2.16.4. Análisis de regresión lineal.....	73
2.17. Herramientas estadísticas para la validación	74
2.17.1. Prueba de normalidad.....	74
2.17.2. Prueba de t-student	75
2.17.3. Prueba de igualdad de varianzas.....	76
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	78
3.1. Reactivos y materiales	79
3.2. Preparación del optodo	80
3.2.1. Síntesis de la fase sensora del bulk-optodo	80
3.2.2. Síntesis de la fase sensora del nano-optodo	81
3.3. Caracterización del bulk-optodo y nano-optodo.....	82
3.4. Metodología analítica	83
3.4.1. Proceso de medición del bulk-optodo	84
3.4.2. Proceso de medición del nano-optodo	85
3.4.3. Optimización del bulk-optodo y nano-optodo	85
3.4.4. Validación de la metodología analítica	91
3.5. Aplicabilidad a sistemas portátiles basado en captura de imágenes	97
3.5.1. Proceso de captura de imágenes.....	99
3.5.2. Cuantificación de potasio en suelos	100
3.5.3. Efecto del color de la fuente de luz.....	100
3.5.4. Reversibilidad de la fase sensora del nano-optodo	101
3.6. Muestreo y extracción de potasio de los suelos	102
3.7. Diagrama de Gantt	106
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	107

4.1.	Síntesis del bulk-optodo y nano-optodo	107
4.2.	Caracterización del bulk-optodo y nano-optodo.....	108
4.2.1.	Caracterización por UV-VIS.....	108
4.2.2.	Caracterización por DLS.....	110
4.2.3.	Caracterización por SEM	112
4.2.4.	Comprobación del efecto Tyndall.....	113
4.3.	Optimización de la composición del bulk-optodo y nano-optodo	114
4.4.	Optimización de la metodología analítica del bulk-optodo y nano-optodo.....	119
4.4.1.	Optimización de la calibración del modelo sigmoide y modelo lineal del bulk-optodo y nano-optodo	120
4.4.2.	Optimización de la proporción del polímero y plastificante	130
4.4.3.	Optimización del valor de pH y concentración del buffer	132
4.4.4.	Optimización de la cantidad del surfactante	135
4.5.	Validación.....	137
4.5.1.	Normalidad de los datos.....	137
4.5.2.	Selectividad.....	138
4.5.3.	Sensibilidad.....	145
4.5.4.	Precisión.....	146
4.5.5.	Veracidad	155
4.5.6.	Tiempo de respuesta.....	158
4.6.	Uso del Raspberry-pi en la cuantificación de potasio.....	162
4.6.1.	Efecto de la luz.....	171
4.6.2.	Reversibilidad analítica del nano-optodo.....	179
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES		182
CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		188

CAPÍTULO 7. ANEXOS	209
7.1. Matriz de consistencia	209
7.2. Matriz de Operaciones de Variables	211

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes básicos y procesamiento de señal de un sensor químico.	39
Figura 2. Estructura macrocíclica del ionóforo valinomicina en 2D y 3D (Arriba). Formación del complejo valinomicina - ion potasio coordinados octaédricamente en una geometría bipiramidal (Abajo).	43
Figura 3. Esquema experimental de la síntesis del bulk-optodo y nano-optodo.	45
Figura 4. El mecanismo de respuesta del optodo, donde el ionóforo (I) acompleja al ion analito objetivo potasio (K^+) y el cromoionóforo protonado ($C-H^+$) pierde un ion hidrogeno (H^+) dejando al cromoionóforo desprotonado (C), produciendo un cambio de color del cromoionóforo en la fase sensora orgánica del optodo para el a) bulk-optodo, b) nano-optodo y c) los componentes de partida.	46
Figura 5. Cambio estructural del cromoionóforo I (ETH 5294) en diferentes estados de protonación (Arriba). El desplazamiento hipsocrómico de la longitud de onda del optodo desde aproximadamente 660 nm a 540 nm, ante la desprotonación del ETH 5294 durante el intercambio entre un ion potasio (K^+) de la solución muestra y un ion hidrogeno o protón (H^+) de la fase sensora del optodo (Abajo).....	47
Figura 6. Modelo de la curva sigmoide para sensores ópticos, basado en el logaritmo de la actividad de potasio (eje X) y la señal “1- α ” (eje Y).....	50
Figura 7. Estructuras de las micelas de las partículas de nano-optodos estabilizadas con el surfactante Pluronic F-127, donde a = 101 y b = 56 son coeficientes del tamaño del copolímero tribloque.	53
Figura 8. Estructura química a) 2D y b) 3D de 2 moléculas de tetrafenilborato de potasio ($K-TP_4B$), donde los anillos bencénicos están de color rojo y la los orbitales del ion potasio son de color amarillo.....	54
Figura 9. Estructura química del complejo valinomicina- NH^{4+} , representando los seis enlaces entre hidrógenos y grupos carbonilo. Donde los átomos de carbono (verde), oxigeno (naranja) y nitrógeno (celeste). Las distancias son mostradas en Angstrom ($\text{\AA}$).	55
Figura 10. (Derecha) Cuadrante de color para el sistema RGB. (Izquierda) Proyección del vector muestra (s) en una coordenada (b'). (Saiz et al., 2023)	57

Figura 11. Número de publicaciones en el periodo 2000-2022 en la base de datos Scopus con el término de búsqueda “colorimetric analysis”. Derechos de autor Elsevier.	58
Figura 12. Esquema comparativo de técnicas de formación de imágenes en (a) microscopios electrónicos de luz, (b) TEM y (c) SEM.	67
Figura 13. Esquema comparativo de la dispersión de Rayleigh y Mie, según el tamaño de la partícula.	68
Figura 14. Proceso de validación de un método, iniciando con la necesidad de cuantificar un analito, pasando por la validación y optimización, hasta la aplicación de la metodología validada.....	70
Figura 15. Histograma de una distribución normal, en el eje X se muestra la distribución de datos según su desviación estándar.	74
Figura 16. Gráfica de distribución de datos individuales (derecha) y gráfico de caja (izquierda).....	76
Figura 17. Diagrama experimental de la síntesis de la fase sensora del bulk-optodo.	81
Figura 18. Diagrama experimental de la síntesis de la fase sensora del nano-optodo.	82
Figura 19. Diagrama de dispositivo de captura de imágenes por una cámara digital de 5 MP (sensor) y el procesamiento de la señal con un ordenador de placa simple (SBC) <i>Raspberry Pi 4 B</i> y una fuente de luz LED SMD 5050.	98
Figura 20. Diagrama experimental del testeo del proceso de reversibilidad del nano-optodo.	102
Figura 21. Mapas de las zonas agrícolas de a) Fundo El Tambo y b) Fundo Tunapis.	103
Figura 22. Ubicaciones de muestreo en granjas locales del Canta-Lima.	104
Figura 23. Diagrama experimental de la extracción de iones potasio para los suelos.	105
Figura 24. Cambio de color de la fase sensora del bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO) asociado al grado de desprotonación del cromoforo ETH 5294. Forma protonada del optodo de color azul (izquierda). Forma desprotonada del optodo de color rojo (derecha).	107
Figura 25. Proceso de miniaturización del bulk-optodo fijado en un soporte polimérico a un nano-optodo soluble en medio acuoso. Los cambios de color son similares a su contraparte	

bulk.	108
Figura 26. Espectro de absorción molecular UV-vis de los bulk-optodos selectivos a iones potasio (ISO) para diferentes concentraciones desde 1.0 M a 10^{-6} M de potasio.....	109
Figura 27. Espectro de absorción molecular UV-vis de los nano-optodos selectivos a iones potasio (ISO) para diferentes concentraciones desde 1.0 M a 10^{-4} M de potasio.....	109
Figura 28. Perfil de distribución de tamaño de los nano-optodos para 0.5 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (A), en ausencia del optodo (B), 1.0 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (C) y en ausencia del optodo (D).....	111
Figura 29. Imágenes de SEM para los nano-optodos para 0.5 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (A) y 1.0 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (B).	113
Figura 30. Comprobación del efecto Tyndall en soluciones de nano-optodo. En presencia de una fuente de luz (Izquierda). En presencia de un rayo láser (Derecha).	114
Figura 31. Curvas de calibración del modelo sigmoide para diferentes proporciones del ionóforo valinomicina del bulk-optodo (Arriba) y del nano-optodo (Abajo).	116
Figura 32. Curvas de calibración del modelo sigmoide para diferentes proporciones del ionóforo valinomicina e intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio del bulk-optodo (Arriba) y del nano-optodo (Abajo).	117
Figura 33. Curvas de calibración del modelo sigmoide para un aumento del cromoionóforo ETH 5294 del bulk-optodo (Arriba) y del nano-optodo (Abajo).	119
Figura 34. Curvas de calibración del modelo sigmoide del bulk-optodo para diferentes valores del eje Y. Las propuestas para ejes Y se analizaron a diferentes longitudes de onda de absorbancia del optodo (Arriba). Gráficas de calibración para cada propuesta, donde las líneas punteadas representan los intervalos de confianza (IC) e intervalos de predicción (IP) a un nivel de confianza del 95 % (Abajo).	121
Figura 35. Curvas de calibración del modelo sigmoide del nano-optodo para diferentes valores del eje Y. Las propuestas para ejes Y se analizaron a diferentes longitudes de onda de absorbancia del optodo (Arriba). Gráficas de calibración para cada propuesta, donde las líneas punteadas representan los intervalos de confianza (IC) e intervalos de predicción (IP) a un nivel de confianza del 95 % (Abajo).	122
Figura 36. Cambio de color de la fase sensora del bulk-optodos (Arriba) y nano-optodos	

(Abajo) desde azul a rojo proporcional al aumento de la concentración de potasio.	123
Figura 37. Curva de calibración sigmoide del bulk-optodo y nano-optodo a partir del logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$) y de $(1-\alpha)$, donde las barras representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales para cada concentración de potasio y las líneas discontinuas representan los modelos de calibración sigmoide teóricos.....	126
Figura 38. Curva de calibración lineal del bulk-optodo y nano-optodo a partir del logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$) y del $\text{Log } [\alpha/1-\alpha]$, donde las barras representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales para cada concentración y las líneas discontinuas representan los modelos de calibración lineal teóricos.	126
Figura 39. Gráfica del modelo de calibración lineal del bulk-optodo y el análisis de normalidad de los residuales por la metodología espectroscópica UV-Vis.	128
Figura 40. Gráfica del modelo de calibración lineal del nano-optodo y el análisis de normalidad de los residuales por la metodología espectroscópica UV-Vis.	129
Figura 41. Curvas de calibración del modelo sigmoide para distintos valores de pH para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).	133
Figura 42. Curvas de calibración del modelo sigmoide para distintas concentraciones del tampón buffer a pH constante en la solución problema en contacto con el bulk-optodo (arriba) y del nano-optodo (debajo).	135
Figura 43. Curvas de calibración del modelo sigmoide para distintas concentraciones del surfactante Pluronic F-127 en la solución problema en contacto con el nano-optodo.	137
Figura 44. Distribución estadística de los resultados de concentración de potasio obtenidos por el bulk-optodo a 10^{-6} M (a), 10^{-3} M (b), 1.0 M (c) y por el nano-optodo a 10^{-4} M (d), 10^{-2} M (e), 1.0 M (f), incluyendo el histograma y la prueba de normalidad Anderson-Darling.	138
Figura 45. Curvas de respuesta del modelo sigmoide para el ion analito potasio y distintos iones interferentes para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).	140
Figura 46. Gráfica de barras de los porcentajes de recuperación de concentración de potasio en presencia de interferentes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , donde la barra representa la desviación estándar relativa (5 %).	145
Figura 47. Repetibilidad analítica de las mediciones a tres niveles de concentración de	

potasio. Repetibilidad del bulk-optodo a 10^{-6} M (a), 10^{-3} M (b) y 1.0 M (c) de potasio. Repetibilidad del nano-optodo a 10^{-4} M (d), 10^{-2} M (e) y 1.0 M (f) de potasio, donde las líneas punteadas horizontales representan los límites superiores e inferiores según el $RSD_{Horwitz}$ para cada nivel de concentración de potasio y los valores de cuadros coloreados se escapan de los límites de tolerancia.	149
Figura 48. Reproducibilidad analítica de las mediciones a tres niveles de concentración de potasio. Reproducibilidad del bulk-optodo a 10^{-6} M (a), 10^{-3} M (b) y 1.0 M (c) de potasio. Reproducibilidad del nano-optodo a 10^{-4} M (d), 10^{-2} M (e) y 1.0 M (f) de potasio, donde las líneas punteadas representan los límites superiores e inferiores según el $RSD_{Horwitz}$ y los valores de cuadros coloreados se escapan de los límites de tolerancia.	150
Figura 49. Gráfica de cajas de la variabilidad en condiciones de repetibilidad a tres niveles de concentración de potasio para el bulk-optodo y nano-optodo.	152
Figura 50. Gráfica de cajas de la variabilidad en condiciones de reproducibilidad a tres niveles de concentración de potasio para tres analistas diferentes para el bulk-optodo (Arriba) y nano-optodo (Abajo).	154
Figura 51. Gráfica de valores individuales para los métodos de Nano-optodo (NO), Absorción Atómica (AA) y Electrodo selectivo a iones (ISE) para a) Fundo El Tambo y b) Fundo Tunapis de la zona agrícola de Canta-Lima.	157
Figura 52. Variabilidad de las concentraciones de potasio en el transcurso del tiempo a tres niveles de concentración para el bulk-optodo de 1.0 M, 10^{-3} M y 10^{-6} M de potasio (Arriba) y para el nano-optodo de 1.0 M, 10^{-2} M y 10^{-4} M de potasio (Abajo), donde las líneas punteadas representan los límites superiores e inferiores según el $RSD_{Horwitz}$	160
Figura 53. Gráfica de secuencia en el tiempo para la estabilidad del porcentaje de recuperación de la concentración de potasio a varios niveles de concentración para el bulk-optodo (arriba) y nano-optodo (abajo).	162
Figura 54. Curva de color RGB individual según la concentración de potasio como logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{K^+}$), donde los resultados en líneas punteadas son los colores RGB experimentales y las líneas continuas son los colores RGB corregidos.	164
Figura 55. Gráfica de dispersión de entre el logaritmo de la concentración de iones potasio $\text{Log } a_{K^+}$ (Eje X) y la señal de color individual RGB (Eje Y), para los colores individuales experimentales (Arriba) y los colores corregidos (Abajo).	165

Figura 56. Curva de calibración sigmoide del nano-optodo a partir del logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$) y de una función de “1- α ”, donde las barras representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales del UV-Vis, los resultados en líneas punteadas son los colores RGB experimentales y las líneas continuas son los colores RGB corregidos.	166
Figura 57. Curva de calibración sigmoide (arriba) y lineal (abajo) del nano-optodo a partir de los colores RGB experimentales y corregidos, donde las barras verticales representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales del UV-Vis y los resultados en líneas punteadas son los colores RGB experimentales y las líneas continuas son los colores RGB corregidos.	168
Figura 58. Gráfica lineal ajustada para la calibración lineal para el nano-optodo a partir de los colores RGB experimentales, RGB_c y UV-Vis, incluyendo el análisis de normalidad de los residuales.	170
Figura 59. Efecto de la iluminación sobre los nano-optodos en NaOH 10 mM (vial izquierdo) y buffer TRIS 20 mM (vial derecho) en una tira de luz a) LED RGB, b) LED RG, c) LED G, d) LED B, e) LED R y f) LED RB.	175
Figura 60. Curvas de calibración del nano-optodo expuestas bajo diferentes fuentes de luz LED.	176
Figura 61. Correlación entre NaTP_4B (mM) y Log K^+ (M) requerida para la reversibilidad del nano-optodo para K^+ .	180
Figura 62. Curvas de calibración del nano-optodo K^+ para un 1er y 2do ciclo de uso.	181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Publicaciones recientes de los últimos años de sensores ópticos para cuantificar iones potasio en diferentes tipos de técnicas de medición, diferentes composiciones y diferentes tipos de muestras.....	30
Tabla 2. Resumen de los métodos acreditados en Perú por INACAL para determinación de potasio en suelos.....	31
Tabla 3. Planteamiento de la hipótesis general e hipótesis específicas, incluyendo los criterios de aceptación del proyecto de investigación.	35
Tabla 4. Estructuras químicas, nombres y función de los reactivos usados en la síntesis del optodo.	44
Tabla 5. Resumen de la metodología experimental aplicada durante en el desarrollo, caracterización, optimización y validación del bulk-optodo y nano-optodo.....	78
Tabla 6. Reactivos químicos de partida empleados para la síntesis del bulk-optodo y nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO).	79
Tabla 7. Resumen de la metodología experimental aplicada en la optimización y validación del bulk-optodo y nano-optodo.	83
Tabla 8. Propuesta de optimización de la curva de calibración del bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la señal de respuesta del eje Y.....	86
Tabla 9. Propuesta de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la proporción de las concentraciones del ionóforo valinomicina, intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y cromoionóforo ETH 5294.	87
Tabla 10. Propuesta de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la proporción del polímero PVC y plastificante DOS.	88
Tabla 11. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando el contenido másico del plastificante DOS y del polímero PVC.....	89
Tabla 12. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando el valor de pH del buffer.....	89

Tabla 13. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la concentración del buffer.	90
Tabla 14. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la cantidad del surfactante Pluronic F-127.	91
Tabla 15. Validación metodológica de la selectividad del optodo selectivo a diferentes concentraciones de iones potasio (ISO) frente a otros cationes interferentes.	92
Tabla 16. Validación metodológica de la selectividad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) frente a otros cationes interferentes.	93
Tabla 17. Estimación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del optodo selectivo a iones potasio (ISO).	93
Tabla 18. Validación metodológica de la precisión de repetibilidad y reproducibilidad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) para tres niveles de concentración de potasio de 1.0 M, 10^{-3} M y 10^{-6} M para el bulk-optodo y de 1.0 M, 10^{-2} M y 10^{-4} M para el nano-optodo.	94
Tabla 19. Validación metodológica de la veracidad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) por comparación con la espectroscopia de absorción atómica (AA) y el electrodo selectivo a iones (ISE).	95
Tabla 20. Validación metodológica del tiempo de respuesta del optodo selectivo a iones potasio (ISO) por mediciones a diferentes intervalos de tiempo.	96
Tabla 21. Características técnicas de las luces LED SMD-5050.	101
Tabla 22. Caracterización física de las granjas usadas para los muestreos de suelos.	103
Tabla 23. Valores de absorbancia del bulk-optodo para las longitudes de onda de 529 nm, 615 nm y 667 nm a diferentes niveles de concentración de potasio, también se calculó el grado de desprotonación del cromoionóforo I como $1-\alpha$ y la concentración de potasio como el logaritmo de la actividad del potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$).	124
Tabla 24. Valores de absorbancia del nano-optodo para las longitudes de onda de 529 nm, 615 nm y 667 nm a diferentes niveles de concentración de potasio, también se calculó el grado de desprotonación del cromoionóforo como $1-\alpha$ y la concentración de potasio como el logaritmo de la actividad del potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$).	125

Tabla 25. Análisis de regresión: Log K vs Log ($\alpha/1-\alpha$) para bulk-optodo (izquierda) y para el nano-optodo (derecha).....	127
Tabla 26. Característica de la fase sensora del bulk-optodo para diferentes cantidades de polímero PVC y plastificante DOS, manteniendo la misma proporción [1:2]......	130
Tabla 27. Fase sensora del optodo para diferentes proporciones del polímero y plastificante, desde proporciones de [1:1] a [1:3].	131
Tabla 28. Nano-optodos a diferentes cantidades de surfactante pluronic F-127.....	136
Tabla 29. Valores de coeficiente de selectividad del bulk-optodo y nano-optodo para potasio basado en la formación de complejos del ionóforo valinomicina frente a iones interferentes.	141
Tabla 30. Prueba estadística de t-student de 1 muestra para los coeficientes de selectividad de los interferentes, donde la una hipótesis nula es igual a 1, a un nivel de confianza del 95 %.....	142
Tabla 31. Porcentajes de recuperación para tres niveles de concentración de potasio obtenidos por el nano-optodo ante la presencia de tres niveles de concentración de los interferentes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}	143
Tabla 32. Prueba de “ANOVA de un factor” para el nano-optodo, donde la hipótesis nula es todos los valores de porcentaje de recuperación de concentración de potasio en presencia de interferentes son iguales, a un nivel de confianza al 95 %.	144
Tabla 33. Estimación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) a partir de la desviación estándar de un blanco fortificado de 10^{-6} M de potasio para el bulk-optodo y de 10^{-4} M de potasio para el nano-optodo.	146
Tabla 34. Análisis de la repetibilidad en las mediciones del optodo a varios niveles de concentración de iones potasio para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).	148
Tabla 35. Análisis de la reproducibilidad en las mediciones del optodo a varios niveles de concentración de iones potasio para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).	148
Tabla 36. Prueba de ANOVA de un factor para el bulk-optodo y nano-optodo, donde la hipótesis nula es todos los valores de porcentaje de recuperación de concentración de potasio	

en condiciones de repetibilidad son iguales, a un nivel de confianza al 95 %.	151
Tabla 37. Prueba de ANOVA de un factor para el bulk-optodo y nano-optodo, donde la hipótesis nula es todos los valores de porcentaje de recuperación de concentración de potasio en condiciones de reproducibilidad son iguales, a un nivel de confianza al 95 %.	153
Tabla 38. Estudio de veracidad de la metodología de referencia del nano-optodo, Absorción Atómica (AA) y Electrodo selectivo a iones potasio (ISE).	156
Tabla 39. Estadística descriptiva y prueba de ANOVA de un factor para Fundo el Tambo a) 0-30 cm, b) 30-60 cm. Fundo Tunapis c) 0-30 cm y d) 30-60 cm.	158
Tabla 40. Análisis de regresión del modelo de calibración lineal para el nano-optodo a partir de los colores RGB experimentales (RGB), RGB corregidos (RGB _C) y UV-Vis.	169
Tabla 41. Valores de color RGB experimentales del nano-optodo para potasio entre 10^{-4} – 1.0 M, expuesto a diferentes fuentes de luz con los a) LED RGB, b) LED RG, c) LED G, d) LED B, e) LED R y f) LED RB.	172
Tabla 42. Valores de color RGB corregidos del nano-optodo para potasio entre 10^{-4} – 1.0 M, expuesto a diferentes fuentes de luz con los a) LED RGB, b) LED RG, c) LED G, d) LED B, e) LED R y f) LED RB.	173
Tabla 43. Valores de color RGB no corregidos (NC) y corregidos (C) del nano-optodo a diferentes niveles de concentración de potasio, incluyendo también condiciones del optodo protonado (buffer TRIS 20 mM) y desprotonado (NaOH 10 mM), también se muestran los estándares de color blanco y negro.	174
Tabla 44. Prueba estadística de t-student de 1 muestra para la a) pendientes de la curva de calibración, para b) intercepto de la curva de calibración, donde la hipótesis nula es igual a los valores de referencia del UV-Vis, a un nivel de confianza del 95 %. Estadística descriptiva y prueba de ANOVA de un factor para c) pendientes de la curva de calibración, para d) intercepto de la curva de calibración.	178
Tabla 45. Valores de absorbancia y α para el 1er y 2do ciclo de uso del nano-optodo -K ⁺	181

RESUMEN

El potasio es un metal alcalino importante en varios campos de la investigación en áreas como la medioambiental, agrícola y clínica. El potasio es considerado un macroelemento involucrado en el correcto funcionamiento del cuerpo humano. Además, el potasio es un nutriente en los suelos agrícolas relacionado con la calidad de los suelos. La deficiencia de potasio en las plantas es causa de aproximadamente el 70 % de enfermedades en los cultivos. Actualmente, las técnicas de cuantificación de potasio en diferentes matrices se realizan por espectroscopia de plasma acoplado inductivamente (ICP) y absorción atómica (AA). Estas técnicas analíticas no son adecuadas para mediciones portátiles, debido a su complejidad, también se requiere pretratamiento ácido de las muestras, equipamiento y mantenimiento costoso.

Este proyecto persigue el desarrollo de un nano-optodo selectivo y reversible a iones potasio (ISO) con posibilidad de usarlo en mediciones portátiles o *in-situ*. Este fue sintetizado por la miniaturización del bulk-optodo como núcleo de la micela y está recubierto con el surfactante y estabilizador de superficie Pluronic F-127, conformado por tres componentes activos como el ionóforo valinomicina, intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y el cromoionóforo ETH 5294 determinado como la fase orgánica del optodo.

El nano-optodo es selectivo a iones potasio debido a la interacción estéricamente selectiva entre el ionóforo valinomicina y el ion potasio. La elevada selectividad es explicada por la estructura cíclica de la valinomicina con un espacio libre interno coincide con el diámetro iónico del potasio, la adición del cromoionóforo ETH 5294 con propiedades ópticas a diferentes valores de pH es capaz de producir una señal colorimétrica fácilmente medible. El mecanismo de reconocimiento del optodo se basa en la migración de iones potasio desde un medio acuoso a la fase sensora orgánica del optodo, produciendo la desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 y la consecuente liberación de un ion hidrogeno, esto produce un cambio de color del optodo directamente proporcional a la concentración de potasio en solución. La síntesis del nano-optodo se realizó a partir de la miniaturización de su respectivo bulk-optodo, donde el proceso de miniaturización se hizo bajo condiciones de sonicación para generar nano micelas capaces de contener en su interior los componentes activos del optodo. Las ventajas de los nano-optodos sobre los bulk-optodos pueden resumirse en una

fácil preparación, no requieren el uso de solventes orgánicos como THF y no son dependientes del pH del medio.

Los bulk-optodos y nano-optodos se caracterizaron por técnicas de espectroscopia molecular UV-VIS, donde se estudió el cambio del color de la fase sensora según el perfil de desprotonación del cromoionóforo, obteniendo picos de absorción a longitudes de onda aproximados de 540 nm correspondiente a la absorción de la forma desprotonada del cromoionóforo ETH 5294 (C) y longitudes de onda aproximadas de 600 nm y 660 nm para la forma protonada del cromoionóforo ETH 5294 (C-H⁺) con un punto isosbético aproximado a 580 nm de los espectros a todas las concentraciones estudiadas.

Los nano-optodos también se caracterizaron mediante técnicas de identificación estructural como el microscopio electrónico de barrido (SEM) permitiendo la descripción morfológica del nano-optodo, obteniendo formas esféricas coherentes con las micelas esperadas. Adicionalmente, se determinó el perfil de tamaños de los nano-optodos por la técnica de análisis de dispersión dinámica de la luz (DLS), donde se obtuvo tamaños de nano-optodos huecos promedios de 87.0 nm y 82.2 nm, con proporciones de 0.5 % y 1.0 % de surfactante pluronic F-127 respectivamente. Cuando se adicionó 20 µL de cocktail del optodo se obtuvo picos de tamaños de nano-optodos promedio de 412.4 nm y 181.7 nm a proporciones de 0.5 % y 1.0 % de surfactante pluronic F-127 respectivamente.

La optimización de los optodos incluyó el estudio de su composición y aditivos, así como la influencia a diferentes niveles de pH. Se obtuvo una concentración óptima para el bulk-optodo y nano-optodo de 2.40 µM tanto para el ionóforo valinomicina, intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y el cromoionóforo ETH 5294. En el bulk-optodo se evaluó la composición del soporte y relación de los aditivos como 160 mg del polímero PVC y 320 mg del plastificante DOS en una relación [1:2] y la estabilidad de la señal en un rango de pH entre valores de 5.0 y 9.0, obteniendo un valor óptimo al pH 7.00 del tampón TRIS a 20 mM. En el nano-optodo no se aplicó ningún soporte, en cambio, se usó al estabilizador de superficie Pluronic F-127 con una cantidad de 1.0 %. Los resultados optimizados mostraron una buena correlación con los perfiles de desprotonación teórico, estimados a partir de la composición, tanto del bulk-optodo como del nano-optodo.

La validación analítica del bulk-optodo y nano-optodo se efectuó siguiendo las directrices del Instituto Nacional de Calidad (INACAL). Ambos optodos probaron ser altamente selectivos a iones K⁺, con una buena sensibilidad y precisión. Los iones

interferentes (iones Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) obtuvieron coeficientes de selectividad mayores a 1.0, es decir, la interferencia en la concentración de potasio no es superior al 10 %.

La sensibilidad analítica se determinó en el rango de trabajo para el modelo de calibración lineal del bulk-optodo desde $1.0 \text{ M} - 10^{-6} \text{ M K}^+$ con un $\text{LD}_{\text{BO}} = 0.31 \text{ }\mu\text{M}$ ($3.15 \times 10^{-7} \text{ M}$) y para el nano-optodo desde $1.0 \text{ M} - 10^{-4} \text{ M K}^+$ con un $\text{LD}_{\text{NO}} = 30.3 \text{ }\mu\text{M}$ ($3.03 \times 10^{-5} \text{ M}$). La precisión fue verificada en condiciones de repetibilidad (mediciones realizadas por el mismo analista) y condiciones de reproducibilidad (mediciones realizadas por diferentes analistas). El parámetro estudiado fue la desviación estándar relativa (RSD), para el bulk-optodo solo a concentraciones altas de potasio (1.0 M), la desviación fue más alta que el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$, en cambio, para el nano-optodo, el RSD experimental fue menor al $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ en todo el rango de potasio.

La veracidad fue evaluada por comparación de los resultados de potasio de 4 muestras de suelos agrícola de la zona de Canta-Lima, provenientes de dos Fundos El Tambo y Tunapis en dos horizontes de 0-30 cm y 30-60 cm de profundidad. Estos resultados fueron comparados con las metodologías de referencias: Absorción Atómica (AA) y Electrodo selectivo a iones (ISE). En la prueba de ANOVA los valores de *p-value* fueron mayor a 0.05 (nivel de significancia del 95 %), por ende, la metodología aquí desarrollada se considera como veraz para el alcance propuesto como muestras acuosas de extracto de suelos agrícolas en un rango de trabajo de potasio entre $10^{-4} - 1.0 \text{ M}$.

La estabilidad de la señal fue verificada por la trazabilidad de concentración de potasio para el bulk-optodo hasta 2 horas y nano-optodo hasta 48 horas. Para el bulk-optodo a concentraciones entre 10^{-6} M y 1.0 M de potasio fue estable entre 1 y 2 horas, la concentración fue disminuyendo por la pérdida de plastificante de la fase sensora. Para el nano-optodo la concentración fue estable por más tiempo, a concentraciones de 10^{-4} M , 10^{-2} M y 1.0 M de potasio fue estable por 48 horas, 24 horas y 6 horas respectivamente.

Después de optimizado el método de cuantificación de potasio por espectroscopia del UV-Vis, se utilizó esta metodología optimizada con un dispositivo de diseño propio de captura de imágenes para la detección del cambio de color del nano-optodo. El dispositivo usado es un ordenador de placa simple (SBC) *Raspberry Pi 4 B* capaz de convertir la imagen capturada con una cámara digital de 5 MP a una señal en el espacio de color RGB. A partir de las señales de color RGB se empleó una transformación logarítmica para obtener una

correlación lineal entre el color de la fase sensora del nano-optodo y la concentración de potasio.

El dispositivo de medición colorimétrica probó poca dependencia al control estricto de la iluminación externa, se comparó las pendientes e interceptos de las curvas de calibración de los distintos tipos de iluminación. Se obtuvieron valores semejantes de concentraciones de potasio en todo el rango de trabajo ($10^{-5} - 10^{-1}$ M) para las luces de color blanca, rojo, verde, amarilla, azul y magenta, siendo poco precisa para iluminaciones de color rojo a concentración elevadas de potasio (10^{-1} M). Se compararon los resultados de la espectroscopia UV-Vis con los métodos de absorción atómica (AA) y electrodos selectivos de iones (ISE) en las muestras de extracción de iones de potasio del suelo. El análisis estadístico mostró que los resultados analíticos son estadísticamente semejantes para las tres metodologías estudiadas para suelos agrícolas, lo que confirma la fiabilidad del método colorimétrico. La sensibilidad, evaluada por el límite de detección ($LD = 1,03 \times 10^{-5}$) y el límite de cuantificación ($LC = 3,42 \times 10^{-5}$), es consistente con el rango de concentración propuesto ($10^{-5} - 10^{-1}$ M K^+). Este trabajo logró un novedoso hallazgo, con la reversibilidad del nano-optodo para reutilización analítica, esto se logró mediante la extracción de iones K^+ dentro de la micela y posterior precipitación como sal insoluble tetrafenil borato de potasio (KTP_4B), como lo demuestran las curvas de calibración durante un 1er y 2do ciclo de análisis, siendo equivalente entre sí.

En resumen, esta tesis logró desarrollar un dispositivo colorimétrico basado en nano-optodos como sensor analítico y composición Raspberry pi con lenguaje de programación Python como una potente herramienta analítica para cuantificar iones K^+ . Se demostró que el nano-optodo es selectivo a iones potasio (K^+), en presencia de iones interferentes estudiados (Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), también es altamente sensible y preciso, alcanzando límites de detección en el rango de 10^{-5} M y con variabilidad esperada según el RSD Horwitz. La veracidad de la metodología fue corroborada comparando con una metodología de referencia acreditada (AA). Adicionalmente el color desarrollado por el nano-optodo es estable hasta 48 horas y probó que la señal obtenida por el dispositivo colorimétrico es independiente de las condiciones de iluminación externa, demostrando el potencial de este dispositivo colorimétrico para un control ambiental preciso y rentable de iones K^+ en suelos agrícolas.

ABSTRACT

Potassium is an important alkali metal in various fields of research in areas such as environmental, agricultural and clinical research. Potassium is considered a macroelement involved in the proper functioning of the human body. In addition, potassium is a nutrient in agricultural soils related to soil quality. Potassium deficiency in plants is the cause of approximately 70% of crop diseases. Currently, potassium quantification techniques in different matrices are performed by inductively coupled plasma spectroscopy (ICP) and atomic absorption (AA). These analytical techniques are not suitable for portable measurements, due to their complexity, also requiring acid pretreatment of the samples, expensive equipment and maintenance.

This project pursues the development of a selective and reversible nano-optode to potassium ions (ISO) with the possibility of using it in portable or in-situ measurements. It was synthesized by the miniaturization of the bulk-optode as the micelle core and is coated with the surfactant and surface stabilizer Pluronic F-127, consisting of three active components such as the ionophore valinomycin, ion exchanger tetrakis(4-chlorophenyl) potassium borate and the chromium ionophore ETH 5294 determined as the organic phase of the optode.

The nano-optodo is selective to potassium ions due to the sterically selective interaction between the valinomycin ionophore and the potassium ion. The high selectivity is explained by the cyclic structure of valinomycin with an internal free space coinciding with the ionic diameter of potassium, the addition of the chromium ionophore ETH 5294 with optical properties at different pH values is able to produce an easily measurable colorimetric signal. The optode recognition mechanism is based on the migration of potassium ions from an aqueous medium to the organic sensing phase of the optode, producing the deprotonation of the ETH 5294 chromionophore and the consequent release of a hydrogen ion, this produces a color change of the optode directly proportional to the concentration of potassium in solution. The synthesis of the nano-optode was performed from the miniaturization of its respective bulk-optode, where the miniaturization process was done under sonication conditions to generate nanomicelles capable of containing the active components of the optode. The advantages of nano-optodes over bulk-optodes can be summarized in easy preparation, they do not require the use of organic solvents such as THF and they are not dependent on the pH of the medium.

The bulk-optodes and nano-optodes were characterized by UV-VIS molecular spectroscopy techniques, where the color change of the sensing phase was studied according to the deprotonation profile of the chromium ionophore, obtaining absorption peaks at wavelengths of approximately 540 nm corresponding to the absorption of the deprotonated form of the chromionophore ETH 5294 (C) and wavelengths of approximately 600 nm and 660 nm for the protonated form of the chromionophore ETH 5294 (C-H⁺) with an approximate isosbestic point at 580 nm of the spectra at all the concentrations studied.

The nano-optodes were also characterized by structural identification techniques such as scanning electron microscopy (SEM) allowing the morphological description of the nano-optode, obtaining spherical shapes consistent with the expected micelles. Additionally, the size profile of the nano-optodes was determined by the dynamic light scattering (DLS) analysis technique, where average hollow nano-optode sizes of 87.0 nm and 82.2 nm were obtained, with proportions of 0.5 % and 1.0 % of pluronic surfactant F-127 respectively. When 20 μ L of optode cocktail was added, average nano-optode size peaks of 412.4 nm and 181.7 nm were obtained at ratios of 0.5 % and 1.0 % pluronic F-127 surfactant, respectively.

Optimization of the optodes included the study of their composition and additives, as well as the influence at different pH levels. An optimum concentration for the bulk-optodo and nano-optodo of 2.40 μ M was obtained for both the ionophore valinomycin, ion exchanger tetrakis(4-chlorophenyl) potassium borate and the chromium ionophore ETH 5294. In the bulk-optode, the composition of the support and ratio of the additives were evaluated as 160 mg of PVC polymer and 320 mg of DOS plasticizer in a [1:2] ratio and the stability of the signal in a pH range between values of 5.0 and 9.0, obtaining an optimum value at pH 7.00 of the TRIS buffer at 20 mM. In the nano-optode no support was applied, instead, the surface stabilizer Pluronic F-127 was used with an amount of 1.0 %. The optimized results showed a good correlation with the theoretical deprotonation profiles estimated from the composition of both the bulk-optode and the nano-optode.

The analytical validation of the bulk-optode and nano-optode was performed following the guidelines of the National Institute of Quality (INACAL). Both optodes proved to be highly selective to K⁺ ions, with good sensitivity and precision. The interfering ions (Na⁺, Li⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ ions) obtained selectivity coefficients greater than 1.0, i.e., the interference in potassium concentration is not greater than 10 %.

Analytical sensitivity was determined in the working range for the bulk-optode linear

calibration model from $1.0 \text{ M} - 10^{-6} \text{ M K}^+$ with an LD BO = $0.31 \text{ } \mu\text{M}$ ($3.15 \times 10^{-7} \text{ M}$) and for the nano-optode from $1.0 \text{ M} - 10^{-4} \text{ M K}^+$ with an LD NO = $30.3 \text{ } \mu\text{M}$ ($3.03 \times 10^{-5} \text{ M}$). The precision was verified under repeatability conditions (measurements performed by the same analyst) and reproducibility conditions (measurements performed by different analysts). The parameter studied was the relative standard deviation (RSD), for the bulk-optode only at high potassium concentrations (1.0 M), the deviation was higher than the RSDHorwitz, on the other hand, for the nano-optode, the experimental RSD was lower than the RSDHorwitz in the whole potassium range.

The trueness was evaluated by comparing the potassium results of 4 agricultural soil samples from the Canta-Lima area, coming from the two farms El Tambo and Tunapis in two horizons of 0-30 cm and 30-60 cm depth. These results were compared with the reference methodologies: Atomic Absorption (AA) and Ion Selective Electrode (ISE). In the ANOVA test the p-values were greater than 0.05 (95 % significance level), therefore, the methodology developed here is considered to be valid for the proposed scope as aqueous samples of agricultural soil extract in a working range of potassium between $10^{-4} - 1.0 \text{ M}$.

Signal stability was verified by potassium concentration tracing for the bulk-optode up to 2 hours and nano-optode up to 48 hours. For the bulk-optodo at concentrations between 10^{-6} M and 1.0 M potassium was stable between 1 and 2 hours, the concentration was decreasing due to the loss of plasticizer from the sensing phase. For the nano-optode the concentration was stable for a longer time, at concentrations of 10^{-4} M , 10^{-2} M and 1.0 M potassium it was stable for 48 hours, 24 hours and 6 hours respectively.

After optimizing the potassium quantification method by UV-Vis spectroscopy, this optimized methodology was used with a self-designed image capture device for the detection of the color change of the nano-optode. The device used is a Raspberry Pi 4 B single board computer (SBC) capable of converting the image captured with a 5 MP digital camera to a signal in the RGB color space. From the RGB color signals, a logarithmic transformation was employed to obtain a linear correlation between the color of the sensing phase of the nano-optode and the potassium concentration.

The colorimetric measurement device proved little dependence on the strict control of external illumination, the slopes and intercepts of the calibration curves for the different types of illumination were compared. Similar values of potassium concentrations were obtained over the whole working range ($10^{-5} - 10^{-1} \text{ M}$) for white, red, green-, yellow-, blue-

and magenta-colored lights, being inaccurate for red illuminations at high potassium concentration (10^{-1} M). UV-Vis spectroscopy results were compared with atomic absorption (AA) and ion selective electrode (ISE) methods on soil potassium ion extraction samples. Statistical analysis showed that the analytical results are statistically similar for the three methodologies studied for agricultural soils, confirming the reliability of the colorimetric method. The sensitivity, evaluated by the limit of detection ($LOD = 1.03 \times 10^{-5}$) and the limit of quantification ($LOQ = 3.42 \times 10^{-5}$), is consistent with the proposed concentration range ($10^{-5} - 10^{-1}$ M K^+). This work achieved a novel finding, with the reversibility of the nano-optode for analytical reuse, this was achieved by the extraction of K^+ ions within the micelle and subsequent precipitation as insoluble potassium tetraphenyl borate salt (KTP_4B), as demonstrated by the calibration curves during a 1st and 2nd cycle of analysis, being equivalent to each other.

In summary, this thesis succeeded in developing a colorimetric device based on nano-optodes as an analytical sensor and Raspberry pi composition with Python programming language as a powerful analytical tool to quantify K^+ ions. It was demonstrated that the nano-optode is selective to potassium ions (K^+), in the presence of studied interfering ions (Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+}), it is also highly sensitive and accurate, reaching detection limits in the range of 10^{-5} M and with expected variability according to the RSD Horwitz. The veracity of the methodology was corroborated by comparison with an accredited reference methodology (AA). Additionally, the color developed by the nano-optode is stable up to 48 hours and proved that the signal obtained by the colorimetric device is independent of external illumination conditions, demonstrating the potential of this colorimetric device for accurate and cost-effective environmental monitoring of K^+ ions in agricultural soils.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

Los sensores químicos se clasifican según el tipo de señal en sensores electroquímicos y ópticos (Chailapakul et al., 2006). Los sensores ópticos presentan ventajas comparadas con los sensores electroquímicos, al ser menos susceptibles a las interferencias electromagnéticas, además los sensores ópticos se pueden miniaturizar más fácilmente en micro y nano escala.

En la literatura especializada se han reportado sensores químicos para iones objetivos como sodio (Shibata et al., 2018), calcio (Shibata et al., 2019), magnesio (Rahimi et al., 2019), plata y mercurio (Phichi et al., 2020), plomo (Golcs et al., 2021), cobre (Parsaee et al., 2018). También se ha reportado sensores químicos con el uso de fibra óptica (Mortari et al., 2020) y sensores desechables (Reda et al., 2021).

1.2. Justificación social

1.2.1. Necesidad de monitoreo de potasio en cultivos

Un informe del consejo nacional de investigación de los Estados Unidos discutió algunos puntos clave relacionados con el cuidado del medio ambiente por problemas de contaminación surgidos en las últimas décadas. Algunas de las conclusiones del informe fueron realizar los monitoreos ambientales en muestras de agua, suelo y aire con más frecuencia, para poder prevenir los daños ambientales, producto de los desechos industriales (Stern, 2003).

Las regulaciones ambientales se vuelven cada vez más estrictas en los sectores agrícolas (Agricultural soil health and conservation working group, 2018), por ello la química analítica debe desarrollar métodos con buenos niveles de precisión y veracidad, así como métodos de fácil aplicación y accesibilidad para obtener resultados *in situ*.

El monitoreo de nutrientes como potasio en los suelos agrícolas es capaz de mejorar la calidad de las plantas, produciendo el crecimiento óptimo de cultivos (Bamsey et al., 2012), además de optimizar recursos como el uso del agua y el uso de fertilizantes (Gieling et al., 2005). También se ha relacionado un crecimiento lento de los cultivos con la deficiencia de potasio (Benton Jones, 2016), por lo que la investigación de nuevos métodos

para la determinación de potasio mediante técnicas accesibles y portátiles en tierras agrícolas es justificable y con buenas perspectivas de su aplicación en la realidad peruana en un corto plazo.

1.2.2. Falta de conexión entre universidades y laboratorios analíticos

En la realidad peruana aún existe un gran vacío tecnológico y falta de conexión entre las industrias y las universidades, a pesar de la cantidad de investigaciones ha aumentado en las últimas dos décadas (Bermúdez Garcia, 2014; Giachi, 2016).

Los sensores ópticos son metodologías analíticas ideales para implementarse en laboratorios analíticos acreditados. Los sensores ópticos son técnicas analíticas capaces de obtener información analítica de forma simple y rápida, con tiempos cortos de análisis, fácil de manipular, bajo costo de mantenimiento y sin necesidad de personal calificado (Xie & Bakker, 2017).

1.3. Justificación científica

1.3.1. Necesidad de metodologías portátiles para cuantificar potasio

En las publicaciones recientes de sensores ópticos para detectar potasio se puede observar poca presencia de sensores con capacidad de medición portátil. Algunas de las dificultades asociadas a esto es poder alcanzar una buena precisión en la medición analítica (Gsangaya et al., 2020). Los sensores ópticos que reportaron capacidad portátil se soportaron en papel como dispositivos analíticos de papel (PAD) (Gerold et al., 2018) o soportados en superficies de grafeno (R. Wang et al., 2018).

En la industria agronómica peruana se utilizan sensores portátiles comerciales, debido a la necesidad de cuantificar nutrientes o contaminantes en las plantas y suelos *in-situ* (Aqeel-Ur-Rehman et al., 2014). Estos sensores portátiles comerciales no han sido validados apropiadamente según la normativa de INACAL, por no cumplir los requisitos de validación, al no alcanzar niveles de precisión adecuados con errores de medición de $\pm 10\%$ a 20% (Scientific Horiba LAQUA, n.d.).

1.3.2. Necesidad de métodos analíticos validados para el monitoreo de potasio en suelos

Todas las metodologías analíticas deben someterse a un proceso de validación regulado por la normativa de INACAL ISO/IEC 17025:2017 “Requisitos generales para la

competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”. Algunos de los requisitos son exactitud, precisión, selectividad, límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) (Norma Técnica Peruana, 2017). Estos requerimientos deben ser cumplidos por las metodologías desarrolladas por entidades internacionales como *United States Environmental Protection Agency* (EPA) o *American Chemical Society* (ACS) y también por instituciones públicas o privadas como centros de investigación de universidades (Eurolab España Eurachem, 2016).

1.4. Estado del arte

La química para sensores de reconocimiento de cationes comenzó en 1976 con las investigaciones de Pierre Meier de complejación de metales alcalinos con éteres corona y criptandos (Pierre Meier & Michele Dartiguenave, 1976), luego en 1987 las publicaciones de Gibb describieron una membrana con respuesta óptica para la determinación de iones alcalinos en fluidos biológicos (Gibb, 1987). Este tipo de detección en sensores ópticos inicialmente se llamó “reacción heterogénea de pH” (Rittersdorf et al., 1993).

Durante la década de los 90 se desarrollaron electrodos selectivos iones (ISE) con ionóforos a base de macromoléculas cromogénicas de la familia de éteres de corona (Bakker et al., 1997; Bühlmann et al., 1998), usando a la valinomicina como ionóforo de referencia (D. Lee & Thomas, 1994). Con el desarrollo de nuevas tecnologías, se propuso el uso de fibras ópticas para cuantificar potasio en suero fisiológico mediante técnicas de fluorescencia (Shortreed et al., 1997), dos años después se desarrolló sensores para potasio en estado sólido, sobre un soporte de electrodo de vidrio (Bobacka et al., 1999). En los siguientes años, Capitán-Vallvey desarrolló sensores ópticos reversibles para cationes alcalinos en muestras de agua de consumo con límites de detección (LD) de 0.046 mM para calcio (Ca^{2+}) y 0.0125 mM para potasio (K^{+}) (Capitán-Vallvey et al., 2002, 2003).

Las investigaciones más recientes en los sensores ópticos para potasio se presentan en la *Tabla I*. En esta se describe investigaciones mayoritariamente en sistemas de detección fluorométrico (Baranowska-Korczyn et al., 2019; Du et al., 2020; Ruckh et al., 2016; Stelmach et al., 2019; L. Wang et al., 2016, 2019), así como sensores aplicados en muestras de origen biológico (Du & Xie, 2017; Gerold et al., 2018; Lookadoo et al., 2021; Soda et al., 2019a; Tenjimbayashi et al., 2016; R. Wang et al., 2018). Algunas investigaciones incluyen otros tipos de matriz hidrofílica como soporte del optodo (Konefał et al., 2023), soportes de papel (Kassal et al., 2019), incluyendo también surfactantes tipo PEG con una elevada

selectividad (Du et al., 2022; K. Robinson et al., 2021). También el uso de tintes solvatocrómicos como reemplazo de los cromofóros (X. Wang et al., 2020; Zhang et al., 2022), con el uso de volúmenes de muestra pequeños e independiente del buffer de pH (K. J. Robinson et al., 2022) y su aplicación a sistemas de monitoreo de cultivos hidropónico (Stevens et al., 2023).

Algunas publicaciones utilizaron una señal diferencial, se usó una resta de alguna señal óptica con respecto a un valor de referencia en lugar de la señal “ α ”, esta metodología probó ser eficaz en la detección de varios analitos (Kalinowska et al., 2021). En los últimos años, se han diseñado aplicaciones que desde los “*smartphone*” directamente realizan la captura de imagen y el procesamiento de señal (Escobedo et al., 2019, 2023).

Este proyecto de investigación propone desarrollar un nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) con detección colorimétrica y con capacidad portátil con niveles de selectividad y sensibilidad adecuados para su posterior uso en soluciones agrícolas. El desarrollo del optodo aprovecha la elevada selectividad del ionóforo valinomicina hacia los iones potasio (Apichai et al., 2020; Du et al., 2020; Lookadoo et al., 2021; Stelmach et al., 2019).

Algunas de las características de los nano-optodos es que son solubles en medio acuosa y no requieren soporte estructural, en comparación a los sensores soportados en superficies de celulosa como dispositivos analíticos en papel (PAD) (Gerold et al., 2018; Lookadoo et al., 2021; Soda et al., 2018, 2019a) o sensores soportados en materiales nanométricos como nano-rods (Du & Xie, 2017) y quantum dots de grafeno (GQDs) (R. Wang et al., 2018). Otra característica de los nano-optodos es el empleo de un estabilizador para mantener el tamaño micro o nanométricos y no sufrir de problemas de agregación (Du et al., 2018). Algunas publicaciones presentan nano-optodos con surfactantes de Pluronic F-68 y Pluronic P-123 (C. H. Lee et al., 2017), Brij-35 (Soda et al., 2018) y poli anhídrido maleico-alt-1-octadeceno o PMAO (Stelmach et al., 2019).

El desarrollo de la nanotecnología conllevó a la miniaturización de los sensores a tamaños micro y nanométricos. Estos sensores son descritos como sistemas de alto rendimiento debido a su elevada sensibilidad en un amplio rango de concentraciones de potasio (Stelmach et al., 2019) y menos sensibles a los interferentes al limitar el transporte de iones por difusión dentro de los sensores (Du & Xie, 2017). Los primeros usos de los nanosensores fueron como sistemas de medición fluorescente con gran compatibilidad

intracelular (Yun, 2007). En la Tabla 1 se presenta un resumen de las últimas publicaciones realizadas para cuantificar iones potasio mediante diferentes técnicas.

Tabla 1. Publicaciones recientes de los últimos años de sensores ópticos para cuantificar iones potasio en diferentes tipos de técnicas de medición, diferentes composiciones y diferentes tipos de muestras.

Metodología	Tipo de detección	Cromoionóforo	Ionóforo	Surfactante	Muestras	Capacidad de portabilidad	Rango de detección	Autor	Año
Optodos foto acústicos selectivos de iones (ISPAO)	Fluorescente	Cromoionóforo I	Ionóforo de potasio III	Pluronic F68 - Pluronic P123		No	1 mM 0.1 M	Chang H. Lee	2017
Dispositivos analíticos en papel (PAD)	Colorimétrico	Cromoionóforo I	Valinomicina	Brij-35		No	0.1 μ M 0.1 M	Yoshiki Soda	2018
Dispositivos de micro fluidos analíticos en papel (μ PAD)	Colorimétrico	Cromoionóforo I	Valinomicina	Pluronic F-127	Suero humano	Si	0.1 mM 5.0 mM	Chase T. Gerold	2018
Optodos selectivos de iones (ISO)	Colorimétrico	Cromoionóforo I	Ionóforo de potasio II	Pluronic F-127		No	1.0 μ M 0.1 M	Xinfeng Du	2018
Puntos cuánticos de grafeno (GQD)	Fluorescente	Oxazinoindolina	Valinomicina	Polietilenglicol (PEG)	Muestras de suero sanguíneo y orina	Si	3 mM 1 mM	Renjie Wang	2018
Quantum dots de carbono (CQDs)	Fluorescente				Muestras de suero sanguíneo	No	0.01 Mm 0.11 mM	Mehdi Rahimi	2018
Dispositivos de micro fluidos analíticos en papel (μ PAD)	Colorimétrico	Tioflavina T (ThT)	Valinomicina		Suero	No	1 mM 6 mM	Yoshiki Soda	2019
Core-shell nano fibras	Fluorescente	Cromoionóforo I	Valinomicina	Polyvinylidene fluoride (PVDF)		No	10 nM 10 μ M	Anna Baranowska-Korczyn	2019
Colorante solvato crómico (SD)	Fluorescente	Estearoil piridinio	Valinomicina	Pluronic F-127		No	10 nM 0.1 mM	Lu Wang	2019
ISO magnético	Colorimétrico	Cromoionóforo I	Valinomicina			No	1.0 μ M 10 μ M	Sutasinee Apichai	2019
Optodos de liposomas	Fluorescente	Cromoionóforo I	Valinomicina	Poli(anhídrido maleico-alt-1-octadeceno) (PMAO)		No	10 μ M 0.1 M	Emilia Stelmach	2019
Dispositivos de optodos analíticos en papel (POD)	Colorimétrico	Cromoionóforo I	Valinomicina		Muestras de sudor	Si	0.1 Mm 0.1 M	Petar Kassal	2019
Optodos selectivos de iones (ISO)	Colorimétrico Fluorescente	Tinte solvatocromico (SD)	Valinomicina		Muestras biológicas	No	1 μ M 1 M	Xuwei Wang	2020
Dispositivos de optodos analíticos en papel (POD)	Colorimétrico	Cromoionóforo I	Valinomicina	Pluronic F-127	Suero humano	No	0.1 mM 5.0 mM	Daniel B. Lookadoo	2021
Organo-silica nano optodos	Fluorescente	Tinte solvatocromico (SD)	Valinomicina		Muestras ambientales y biológicas	Si	1 μ M 10 mM	Yupu Zhang	2022
Optodos selectivos de iones (ISO)	Fluorescente	Cloruro de azul de Nilo (NBCI)	Valinomicina			Si	0.1 Mm 0.1 M	Anna Konefala	2023

1.4.1. Planteamiento del problema

Las metodologías clásicas para cuantificar potasio usadas por los laboratorios acreditados del Perú son normalmente técnicas espectroscópicas como *Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry* (ICP-OES) e *Inductively coupled plasma - mass spectrometry* (ICP-MS) (Instituto Nacional de Calidad, 2020). Estas técnicas requieren un pretratamiento de digestión ácida para eliminar las interferencias orgánicas, además de equipamiento sofisticado y costoso. Un resumen de los métodos instrumentales para cuantificar potasio en suelos se muestra en la Tabla 2 (<https://aplicaciones.inacal.gob.pe/crtacre>).

Tabla 2. Resumen de los métodos acreditados en Perú por INACAL para determinación de potasio en suelos.

Empresa	Norma	Año	Técnica
Typsa - Técnica y Proyectos S.A. Sucursal Del Perú	EPA Method 3051 A EPA Method 6020A	2007	ICP-MS
AGQ Perú S.A.C.	EPA Method 200.7	1994	ICP-OES
CERPER S.A.-Certificaciones Del Perú S.A.	EPA Method 3051A EPA Method 6010C	2007	ICP-OES
	EPA Method 6020A EPA Method 3051A	2007	ICP-MS
	EPA Method 3051A EPA Method 6020A	2007	ICP-MS
	EPA Method 6010C EPA Method 3051A, 2007	2007	ICP-OES
CERTIMIN S.A.	EPA 3050B EPA 6010D	2018	ICP-OES
Envirotest-Environmental Testing Laboratory S.A.C.	EPA Method 200.7	1994	ICP-OES
	EPA Method 200.7 EPA Method 3050-B	1994	ICP-OES
Inspectorate Services Perú S.A.C.	EPA 3050B EPA 6020B	2014	ICP-MS
J. Ramon Del Perú S.A.C.	EPA Method 200.7	1994	ICP-OES
NSF Envirolab S.A.C. (Inassa S.A.C.)	EPA Method 6010D	1994	ICP-OES
SAG-Servicios Analíticos Generales S.A.C.	EPA METHOD 3050B EPA Method 200.7	1996	ICP-OES
	EPA Method 200.7	1994	ICP-OES
SGS Del Perú S.A.C.	EPA Method 1311 EPA Method 6020B	2018	ICP-MS
	EPA Method 3051A EPA Method 6020B	2017	ICP-MS

El Instituto Nacional de Calidad (INACAL) es el ente regulador de los laboratorios de análisis del Perú. De la Tabla 2 se observa que las técnicas espectroscópicas de ICP-OES o ICP-MS son ampliamente utilizadas, por lo que el desarrollo de nuevas metodologías analíticas como el nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) que se propone este trabajo puede ser de interés para ser aplicado en nuestro país, especialmente por los agricultores en el monitoreo de nutrientes en suelos.

El nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) sugerido en este trabajo cumple los requisitos de validación de INACAL para el monitoreo de nutrientes. Además de su portabilidad como sensor óptico, sin necesidad de traslado de muestras al laboratorio, sin necesidad de pretratamiento, con límites de detección bajos y elevada selectividad frente a potenciales interferentes. Estas ventajas al aplicarse en el monitoreo de nutrientes y control de contaminantes permitirían mejorar la calidad y productividad de los cultivos (Bamsey et al., 2012).

1.4.2. Aporte científico inédito del proyecto

En este trabajo se presenta un nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) basado en la interacción de iones potasio en solución de la muestra problema y la fase sensora orgánica del optodo. El mecanismo del nano-optodo es descrito como un intercambio iónico entre un ion potasio acomplejado selectivamente con el ionóforo valinomicina por una interacción estérica altamente específica. Luego un ion hidrógeno o protón producto de la desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 estabilizado por la tautomerización imina-amina según el pH del medio (Du et al., 2017; Kudrevatykh et al., 2019), generando la liberación de iones hidrogeno o protones que cambia el color de la fase sensora del optodo de azul a rojo en forma proporcional al aumento de la concentración de potasio en solución. Este mecanismo es útil en el desarrollo de novedosos sensores portátiles con detección óptica. Las ventajas de los nano-optodos selectivos a iones potasio (ISO) pueden resumirse en una determinación de las muestras de manera directa sin necesidad de pretratamiento, de fácil preparación a partir de los bulk optodos sin necesidad de purificación adicional (Xie & Bakker, 2017). Los nano-optodos son solubles en medio acuoso y no requiere el uso de solventes orgánicos (Yang et al., 2016). Además, no es dependiente de controlar el pH del medio acuoso (Xie et al., 2014) y presenta rangos de trabajo más amplios y límites de detección más bajos que sus contrapartes bulk-optodos (Nair & Alam, 2006). La característica más destacable de los nano-optodos es la posibilidad de medición de campo,

es decir, “*in situ*”, minimizando costes de pretratamiento, transporte, material de laboratorio y tiempo de análisis (Merl et al., 2022). Debido a todas las ventajas de los nano-optodos en comparación a los métodos de cuantificación de potasio clásico como ICP. Este proyecto propone un nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) con cuantificación colorimétrica que facilitará el monitoreo de nutrientes como potasio con el empleo de técnicas sencillas, rápidas, portátiles y de bajo costo. Estos optodos se validarán con niveles de selectividad, sensibilidad, precisión y veracidad con niveles de confiabilidad de al menos un 95 %.

En resumen, este trabajo persigue obtener un nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) con medición portátil, desarrollando metodologías capaces de mezclar las ventajas de los métodos clásicos con amplios rangos de cuantificación, niveles de selectividad, sensibilidad, precisión y veracidad adecuados para su uso. Con las ventajas de las técnicas modernas al mantener características deseables para un sensor analítico en términos de medición *in-situ*, se propone un sensor con portabilidad y robustez de medición.

1.5. Hipótesis

El nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO), preparado con valinomicina y cromoionóforo ETH 5294 en una membrana polimérica de PVC plastificada y miniaturizado en forma de micela con surfactante Pluronic F-127, es capaz de cuantificar iones potasio en muestras acuosas con un nivel de confiabilidad adecuado, mostrando mejor rendimiento analítico que su correspondiente bulk-optodo.

1. El nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) muestra una alta selectividad hacia iones potasio (K^+) en presencia de cationes interferentes como sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}).
2. El nano-optodo y el bulk-optodo presentan una respuesta lineal en el rango de concentraciones de potasio estudiado, con límites de detección (LD) y cuantificación (LC) adecuados para concentraciones bajas de potasio.
3. La precisión, tanto en términos de repetibilidad (mismo optodo y analista) como de reproducibilidad (diferentes optodos y analistas), de los resultados obtenidos por el nano-optodo y el bulk-optodo es menor al valor de $RSD_{Horwitz}$.
4. La respuesta del nano-optodo es comparable a los métodos de referencia utilizados para cuantificar potasio, como la espectroscopia de absorción atómica (AA) y electrodos de ion selectivo (ISE).

5. El nano-optodo tiene un rendimiento analítico superior al bulk-optodo, demostrando mejor selectividad, sensibilidad, precisión y veracidad debido a características como mayor área superficial y mejor coeficiente de difusión de iones.

Estas hipótesis se basan en la premisa de que la interacción estérica altamente específica entre la valinomicina y el ion potasio permite una detección selectiva y sensible de K^+ en soluciones acuosas. La miniaturización del optodo en forma de nano-optodo mejora las propiedades analíticas debido a un aumento en el área superficial y una mayor eficiencia de difusión de iones, lo cual se espera que mejore la selectividad y la sensibilidad en comparación con el bulk-optodo.

El planteamiento de la hipótesis general e hipótesis específicas se describen en la Tabla 3. La hipótesis general que se plantea en la presente investigación es comprobar si el nano-optodo preparado es capaz de cuantificar iones potasio en muestras en medio acuoso, basado en la interacción estérica altamente específica entre el ionóforo valinomicina y el ion potasio (Su et al., 2019) y comprobar si el dispositivo de medición colorimétrico puede aplicarse para cuantificar nutrientes como potasio con niveles de confiabilidad adecuados.

Tabla 3. Planteamiento de la hipótesis general e hipótesis específicas, incluyendo los criterios de aceptación del proyecto de investigación.

	Pregunta de investigación	Criterio de aceptación
Hipótesis general	¿La metodología analítica propuesta del nano-optodo es capaz de cuantificar potasio?	Los requisitos de la validación analítica a un nivel de significancia mayor al 95 %
	¿El nano-optodo es capaz de usarse en mediciones in-situ?	
	¿El dispositivo portátil es capaz de cuantificar potasio?	
Hipótesis específica	¿El optodo es selectivo al analito potasio?	El sesgo de la concentración de potasio ante la presencia de interferentes menor al 10 %
	¿Existe correlación entre la señal del optodo y la concentración de potasio?	El coeficiente de determinación (r^2) entre el cambio de color del optodo y la concentración de potasio mayor a 0.995
	¿Los resultados del optodo son precisos?	El RSD experimental es menor al RSD Horwitz
	¿El método de cuantificación del optodo es veraz?	Los resultados entre un método de referencia como la absorción atómica y el optodo son equivalentes
	¿El dispositivo portátil es equivalente a los resultados por UV-Vis?	Comparación estadística entre los resultados

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo general

- Desarrollar un dispositivo portátil de medición reversible colorimétrica en el espacio de color RGB a partir de un nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) basado en ionóforo valinomicina estabilizado con pluronic F-127 para la cuantificación de iones K^+ con aplicaciones a suelos agrícolas.

1.6.2. Objetivos específicos

- Sintetizar un bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO) a partir del ionóforo valinomicina y el cromoióforo ETH 5294 en una membrana polimérica plastificada de PVC-DOS.
- Sintetizar un nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) a partir de la miniaturización del bulk-optodo como núcleo y el uso del surfactante Pluronic F-127 como cubierta.
- Caracterizar el bulk-optodo y nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) empleando el desplazamiento hipsocrómico durante el cambio de color de la fase sensora a diferentes concentraciones de iones potasio.
- Caracterizar estructuralmente el nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) usando técnicas como SEM, DLS y efecto Tyndall.
- Comprobar la selectividad del nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) en presencia de iones interferentes de metales alcalinos como iones sodio (Na^+), litio (Li^+) y alcalinos térreos como calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}), también el ion amonio (NH_4^+).
- Evaluar la sensibilidad analítica del nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) al verificar la linealidad de la curva de calibrado desde 1.0 M hasta 10^{-4} M de potasio y estimar los límites de detección (LD) y cuantificación (LC).
- Evaluar la precisión de las mediciones del nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.
- Evaluar la estabilidad a través del tiempo de las concentraciones de potasio en contacto constante con bulk-optodo y nano-optodo

- Revisar la veracidad de los resultados del nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) por comparación con métodos de referencia como la espectroscopia de absorción atómica (AA) y electrodo de ion selectivo (ISE).
- Comprobar el comportamiento analito del dispositivo portátil colorimétrico de captura de imágenes para potasio basado en nano-optodo comparado con los resultados optimizados de espectroscopia UV-Vis.
- Cuantificar la concentración de iones potasio en extractos acuosos de suelos de zonas agrícolas de Canta-Lima.
- Comprobar la reversibilidad de medición de la fase sensora del nano-optodo para su reutilización analítica.

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Potasio

El metal alcalino potasio es una especie fisiológicamente importante para los seres vivos y es uno de los elementos más abundantes en el cuerpo humano y en la corteza terrestre (Tenjimbayashi et al., 2016).

El potasio se mide en los laboratorios acreditados por metodologías clásicas como absorción atómica por espectrofotometría de llama (AA) (Pérez-López & Esquivel-Arias, 2018) y plasma acoplado inductivamente (ICP) (Paulauskas et al., 2020) y para mediciones de campo se ha usado los electrodos selectivos de iones (ISE) (Garcia et al., 2018).

2.1.1. Importancia del potasio

Una adecuada concentración de potasio en los seres vivos asegura el buen funcionamiento del hígado, sistema circulatorio, riñones, músculos y células cerebrales. La función más relevante del potasio en el cuerpo humano es la participación en los impulsos nerviosos, necesarios para la contracción de los músculos cardiacos como el miocardio. El potasio también forma parte de los huesos y regula la acidez en los tejidos óseos para mantener el calcio fijado, así previniendo enfermedades como la osteoporosis (Ivanov, 2020).

La función del potasio en el área agrícola es de suma importancia, se estima que el 70 % de los problemas durante el desarrollo de las plantas se debe a la deficiencia de nutrientes como el potasio, reconociendo al potasio como el nutriente más abundante en los suelos (Raghad Mouhamad, 2016).

El papel fundamental del potasio en el desarrollo de las plantas es la activación enzimática para procesos esenciales, estos procesos involucran la síntesis de proteínas promoviendo el crecimiento celular de los tejidos (Marschner, 1995). Una adecuada concentración de potasio en plantas también mejora la tolerancia a climas extremos como las heladas y sequías, además de mejorar la resistencia frente a insectos (Meena et al., 2016).

2.2. Sensor químico

La institución *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) define un sensor químico como “un dispositivo que transforma la información química, que va

desde la concentración de un componente de muestra específico hasta el análisis de composición total, en una señal analíticamente útil” (Hugh Fan, 2013). Otra característica de un sensor químico es la capacidad de responder de modo reversible al cambio de señales de parámetros físicos o a concentraciones de especies químicas (Regan, 2018).

El diagrama básico de un sensor químico se describe en la *Figura 1*. En el cual el ion analito en la solución problema está en contacto con la fase sensora del sensor químico, permitiendo la difusión selectiva del analito dentro de la fase sensora. Esto produce una señal medible directamente proporcional a la concentración del analito objetivo. Dependiendo del tipo de señal analítica del sensor puede clasificarse en sensores ópticos, electroquímicos, térmicos y másicos (Rodríguez, 2014).

La aplicación más común de los sensores químicos se ha dado en sistemas de monitoreo y control de analitos para mediciones en diferentes campos como medio ambiente, agronomía o minería (Janata et al., 1998).

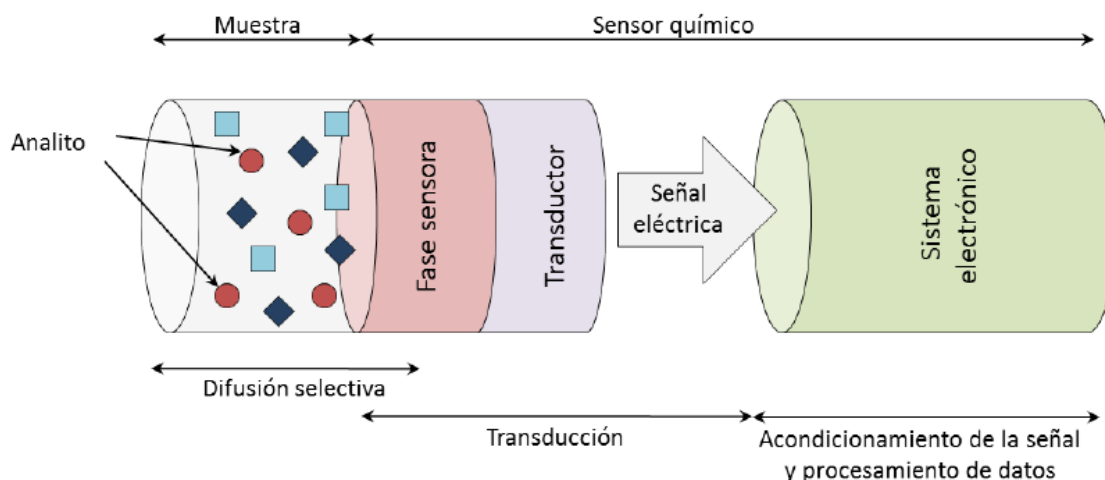


Figura 1. Componentes básicos y procesamiento de señal de un sensor químico.

2.3. Optodo

El desarrollo de los optodos se debió a dos hechos esenciales, el primero es la referencia más antigua sobre el uso de ionóforos en la detección de potasio (Charlton et al., 1982), luego Morf describió el mecanismo general de los sensores ópticos para la detección de iones (Morf et al., 1989). Los optodos son un tipo de sensores ópticos que se basan en la

interacción de los iones de un analito de interés en un medio acuoso y la fase sensora del optodo conteniendo los componentes activos como ionóforo, intercambiador de iones y cromoionóforo (Soda et al., 2018). Los optodos más estudiados son los colorimétricos y fluorométricos (Casado Terrones, 2007), (Kassal et al., 2019)

2.4. Componentes de un optodo

Los optodos tienen componentes activos como el ionóforo, intercambiador de iones y cromoionóforo, estos son responsables de la detección del analito y la generación de la señal analítica, también de los aditivos del optodos como la matriz polimérica y el plastificante.

- Ionóforo (I)

Los ionóforos o portadores de iones son moléculas orgánicas lipofílicas y agentes complejantes a iones, capaces de reconocer selectiva y reversiblemente al ion objetivo a través de membranas hidrofóbicas, su función es acomplejar y transportar el ion analito al interior de la fase sensora orgánica del optodo en una unión reversible (Pechenkina & Mikhelson, 2015). El ionóforo es parte esencial del optodo y debe cumplir ciertos requisitos: tener una elevada lipofilicidad, una alta selectividad hacia al analito y formar un complejo estable entre el ionóforo-analito.

Los ionóforos se clasifican en ionóforos cargados o ionóforos neutros. Los ionóforos neutros son compuestos macrocíclicos como éteres corona, criptandos o calixarenos. Uno de los ionóforos más estudiados es la valinomicina, este es un antibiótico que transporta potasio al interior de membranas biológicas mediante procesos selectivos de reconocimiento estereoquímico basados en la similitud del tamaño de la cavidad del receptor con los diámetros iónicos del analito.

- Cromoionóforo (C)

Los cromoionóforos son transportadores de iones, como los ionóforos, pero además son responsables de la señal analítica, actuando como indicador óptico proporcional a la concentración del analito (Lapresta Fernández, 2007). El mecanismo de reconocimiento se basa en una zona de reconocimiento enlazada a un grupo cromóforo. Este grupo cromóforo es responsable del cambio de color del optodo. Debido a que la diferencia energética entre dos orbitales moleculares cae dentro del espectro visible.

El cromoionóforo es un sistema π conjugado. Cuando el analito ingresa al optodo, sé

modificó la carga iónica del optodo, entonces el sistema π conjugado se modifica. Esto ocasiona el cambio en las propiedades ópticas (cambio de color), este cambio implica liberar un catión de referencia para compensar la carga iónica, generalmente el ion hidrogeno o protón.

La concentración del ion de referencia es directamente proporcional a la concentración del ion analito debido a que el optodo mantiene el equilibrio iónico. En algunos casos el ionóforo posee propiedades ópticas y es capaz de actuar también como cromoionóforo (Candia Puma, 2016).

- Intercambiador de iones

El intercambiador de iones es una sal lipofílica, este actúa como un aditivo iónico que favorece los procesos de transferencia de iones, como el analito, desde la disolución hacia la membrana del optodo. Las características deseadas en el intercambiador de iones es la capacidad de aumentar la selectividad del optodo (capacidad de diferenciar al ion analito sobre los interferentes), es capaz de mantener la electroneutralidad necesaria en la membrana del optodo.

Los intercambiadores de iones más usados para cargas aniónicas son los derivados del tetrafenilborato de potasio y para cationes son sales de tetraalquilamonio.

- Matriz polimérica

La matriz polimérica es el soporte estructural del optodo, donde los compuestos reactivos del optodo se disuelven. La función de la matriz polimérica es conferir estabilidad mecánica y alta movilidad de sus componentes activos del optodo (Pechenkina & Mikhelson, 2015). La matriz está compuesta por un polímero y un plastificante.

- Polímero

El cloruro de polivinilo (PVC) es el polímero más utilizado en las matrices poliméricas de los optodos por sus propiedades mecánicas, polímero inerte y bajo costo (Jawad et al., 2019; Lapresta Fernández, 2007). Una desventaja del PVC es su poca adherencia a superficies como vidrio, debido a su relativamente baja lipofilicidad, provocando una solubilidad parcial con el tiempo (Dinten et al., 1991).

La transición vítrea (T_g) es una característica de polímeros, esta define la temperatura a la cual ocurre un cambio entre un estado vítreo, caracterizado por su rigidez a un estado

viscoelástico, con una pérdida importante de su rigidez.

El PVC tiene una temperatura de transición vítrea muy elevada, alrededor de los 80 °C. La matriz del optodo necesita la suficiente flexibilidad para permitir la migración de iones, es decir, una temperatura de transición vítrea por debajo de la temperatura ambiente, por ende, es necesaria la adición de un plastificante para disminuir la temperatura de transición de la matriz del optodo.

- **Plastificante**

El plastificante es un solvente orgánico inmiscible en agua de alto punto de ebullición cuya función es incrementar la homogeneidad y termoplasticidad de la matriz polimérica. Esto se logra al disminuir la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero (Konstantin N., 2013).

El plastificante debe ser químicamente inerte, inmiscible en agua y con una elevada lipofilidad para evitar la migración de los componentes del optodo hacia la disolución y permitir la movilidad dentro de la matriz polimérica.

Las características más importantes del plastificante son la lipofilidad y la constante dieléctrica. La lipofilidad se refiere a afinidad por una fase orgánica frente a una fase acuosa, y la constante dieléctrica (ϵ_r) depende de la polarizabilidad de su estructura molecular. Los plastificantes más usados en optodos son los adipatos, sebacatos y ftalatos con una constante dieléctrica baja ($\epsilon_r = 4-5$), también los nitroaromáticos con elevada una constante dieléctrica ($\epsilon_r \approx 24$).

- **Transductor**

El transductor es el dispositivo encargado en convertir la señal óptica de salida en una señal medible (S. S. Li, 2006). En un optodo, existen dos transductores: el cromoionóforo y el fotodetector. El primero permite la conversión de la energía química en energía luminosa o señal óptica y el segundo produce la conversión de la señal óptica en energía eléctrica medible (Seiler & Simon, 1992).

2.5. Mecanismo de reconocimiento del optodo

El mecanismo general de los optodos es descrito como un intercambio de iones, llamado principio de coextracción selectiva entre dos iones. El primero es el ion analito y el otro un ion de referencia, generalmente un ion hidrogeno o protón. La liberación del ion de

referencia produce una señal óptica por medio de un indicador sensible al cambio del pH (Erenas et al., 2016).

La molécula de valinomicina es un compuesto cíclico con un espacio libre cuya magnitud coincide con el diámetro iónico del ion potasio de 1.33 ángstroms (Å). Esta interacción estérica es la clave de la elevada selectividad de la valinomicina hacia el ion potasio (H. Li et al., 2017; MacKinnon, 2003). La interacción entre la valinomicina y el ion potasio forman un complejo de geometría bipiramidal cuadrada que se describen en la *Figura 2*. La *Tabla 4* describe la estructura química de los compuestos que forman al optodo selectivos a iones potasio (ISO).

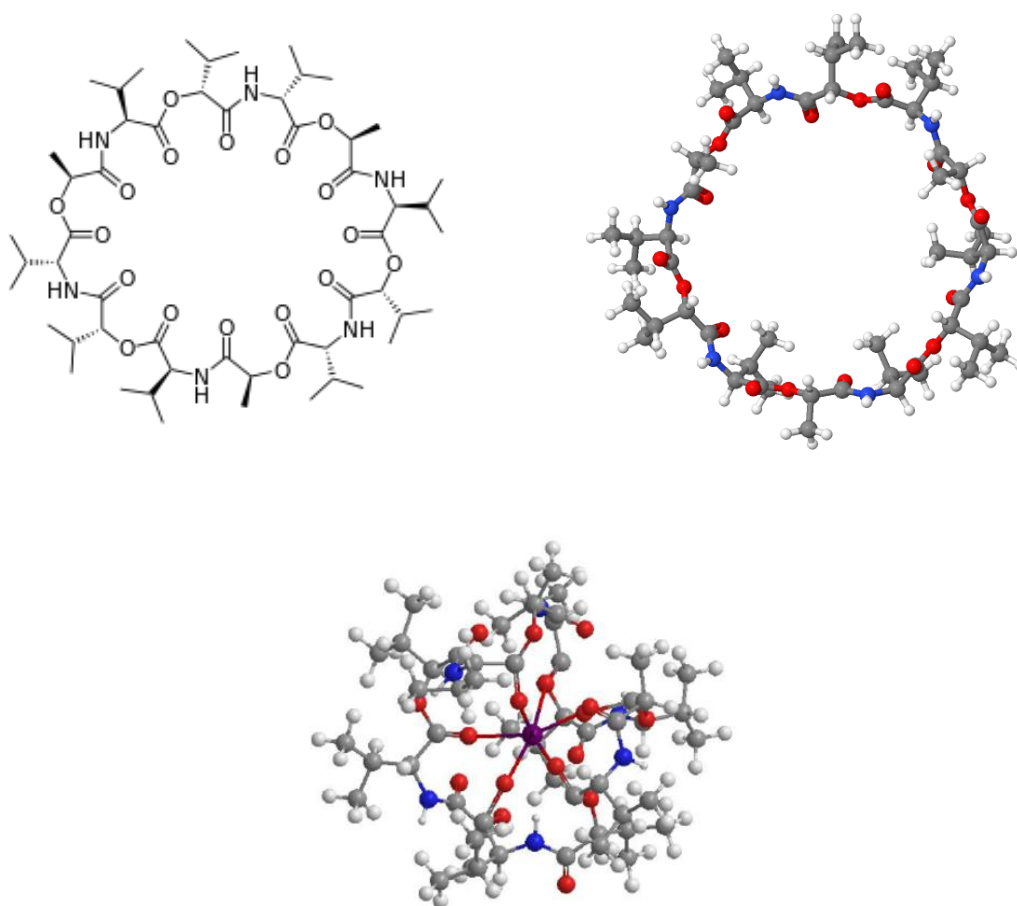
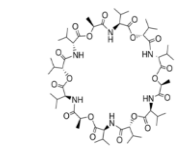
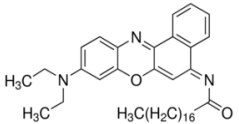
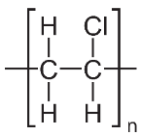
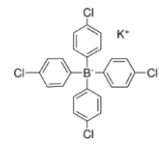
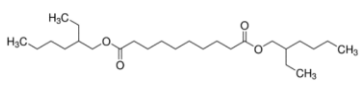
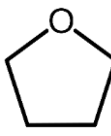
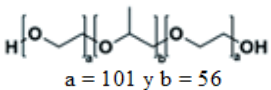


Figura 2. Estructura macrocíclica del ionóforo valinomicina en 2D y 3D (Arriba). Formación del complejo valinomicina - ion potasio coordinados octaédricamente en una geometría bipiramidal (Abajo).

Tabla 4. Estructuras químicas, nombres y función de los reactivos usados en la síntesis del optodo.

Reactivo	Compuesto	Estructura
Ionóforo (I)	Valinomicina	
Cromoionóforo (C)	ETH 5294	
Membrana polimérica	Policloruro de vinilo PVC	
Intercambiador de iones (R ⁻)	Tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio KTpClPB	
Plastificante	Bis (2-etilhexil) sebacato DOS	
Solvente orgánico	Tetrahidrofurano THF	
Surfactante	Pluronic F-127	

El mecanismo básico de reconocimiento de iones potasio (K^+) por el optodo se describe en la *ecuación 1* y en la *Figura 3*.

El nano-optodo como un área superficial más grande y un mejor coeficiente de difusión de iones con respecto al bulk-optodo (Nair & Alam, 2006).

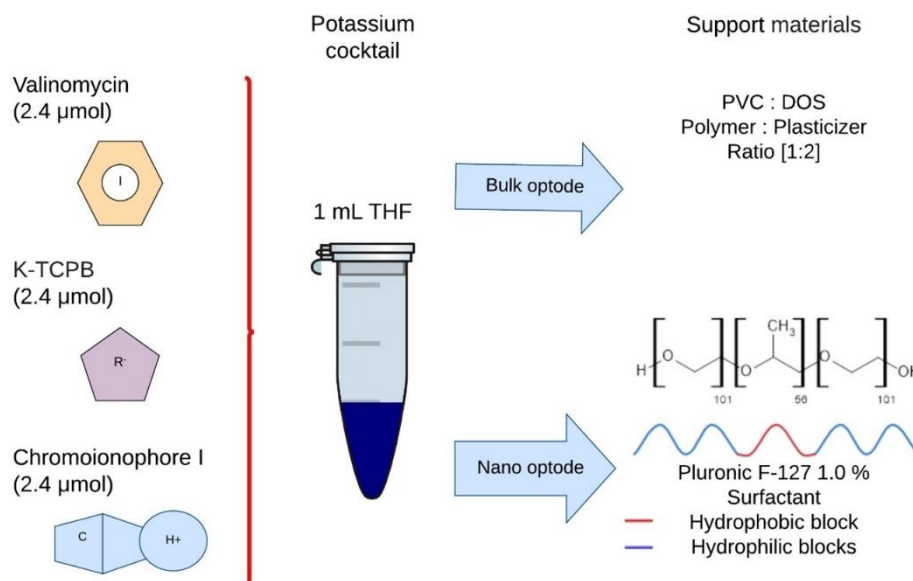


Figura 3. Esquema experimental de la síntesis del bulk-optodo y nano-optodo.



Donde:

K^+ Ion potasio en fase acuosa.

C-H^+ Cromoionóforo protonado ETH 5294 en fase orgánica (color azul).

I Ionóforo valinomicina en fase orgánica.

K-I^+ Complejo valinomicina - ion potasio en fase orgánica.

H^+ Ion hidrogeno o protón en fase acuosa.

C Cromoionóforo desprotonado ETH 5294 en fase orgánica (color rojo).

El ionóforo valinomicina es un compuesto cíclico con puentes amida y éster unidos alternadamente, esta estructura cíclica puede actuar como receptor del ion potasio dentro del espacio libre interno de la valinomicina por interacciones ion-dipolo (H. Li et al., 2017). El cromoióforo ETH 5294 es un sistema π -conjugado (Martinez & Henary, 2016) capaz de producir una señal óptica al protonarse y desprotonarse reversiblemente según el pH de la fase sensora del optodo con un valor de pK_a de 8.00 (Xie et al., 2016), su estructura está estabilizada por la tautomería imina-amina (Du et al., 2017; Kudrevatykh et al., 2019). También se incluyen al intercambiador de iones que aportando aniones y mantiene la

electroneutralidad en el interior de la fase sensora del optodo, además de aditivos como el polímero de PVC y el plastificante DOS que forman el soporte estructural del optodo. Adicionalmente, también se describe la estructura del surfactante Pluronic F-127 como un copolímero tribloque, con capacidad de tensioactivo o surfactante responsable de estabilizar el nano-optodo.

La Figura 4 describe la difusión del ion potasio a través de la interfase del optodo por acción del ionóforo valinomicina (I), produciendo la desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 ($C-H^+$) y la liberación de un ion hidrogeno o protón (H^+). La adición de una sal lipofílica (R^-) como intercambiador de iones tiene la función de brindar aniones para mantener la electroneutralidad en la fase sensora del optodo.

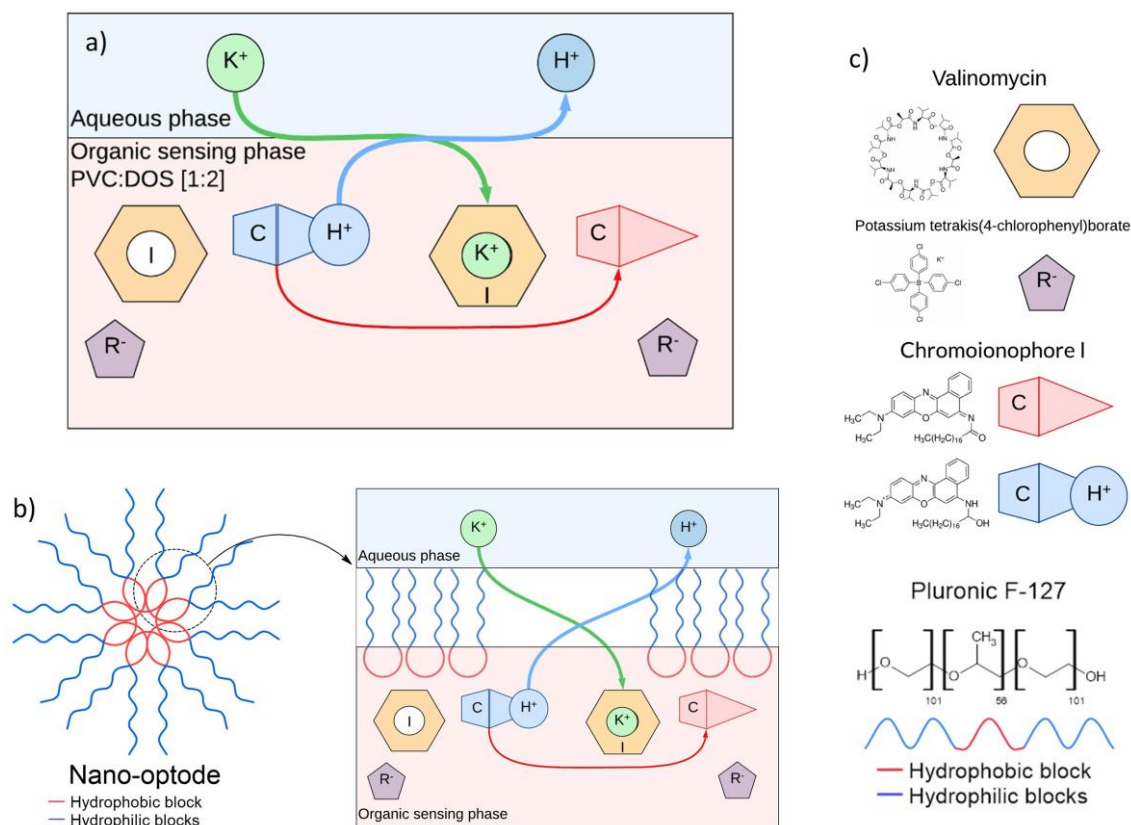


Figura 4. El mecanismo de respuesta del optodo, donde el ionóforo (I) acompleja al ion analito objetivo potasio (K^+) y el cromoionóforo protonado ($C-H^+$) pierde un ion hidrogeno (H^+) dejando al cromoionóforo desprotonado (C), produciendo un cambio de color del cromoionóforo en la fase sensora orgánica del optodo para el a) bulk-optodo, b) nano-optodo y c) los componentes de partida.

La *Figura 5* muestra el cambio estructural del cromoionóforo I (ETH 5294), donde la pérdida de un protón varía las propiedades ópticas de la fase sensora del optodo, traducido en un cambio en la longitud de absorción teórico de la luz aproximado desde 660 nm para el cromoionóforo protonado hasta 540 nm para la forma desprotonada.

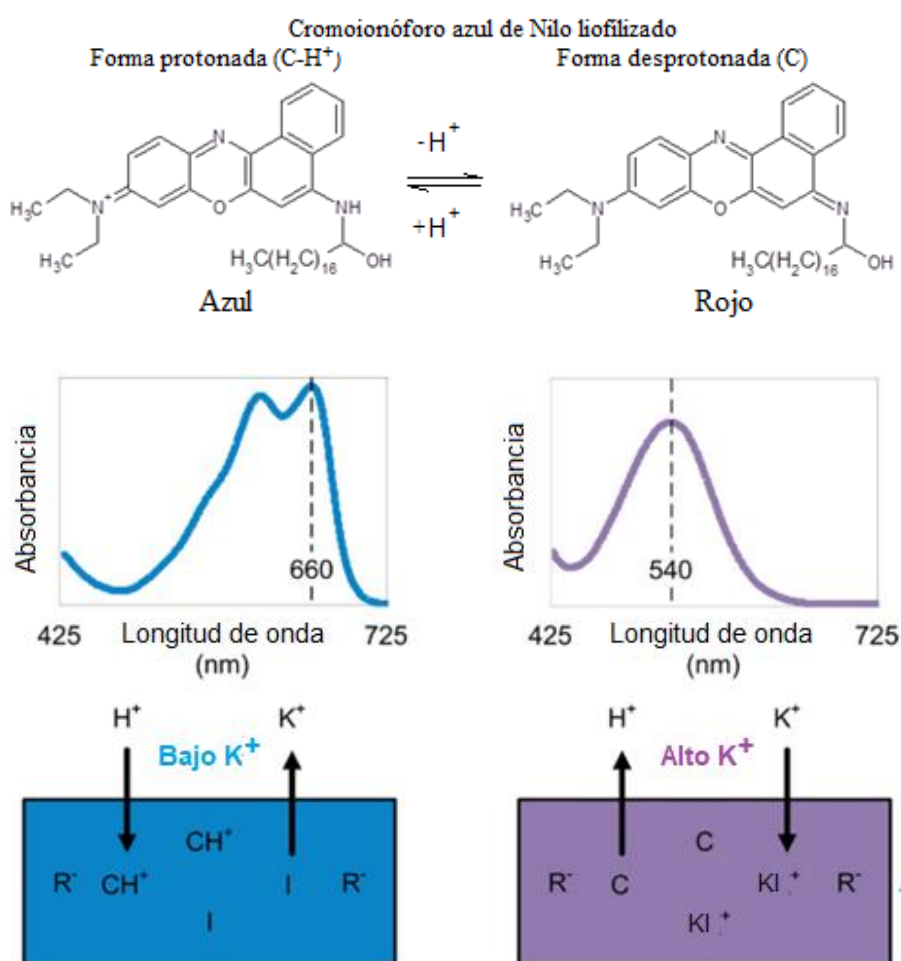


Figura 5. Cambio estructural del cromoionóforo I (ETH 5294) en diferentes estados de protonación (Arriba). El desplazamiento hipsocrómico de la longitud de onda del optodo desde aproximadamente 660 nm a 540 nm, ante la desprotonación del ETH 5294 durante el intercambio entre un ion potasio (K⁺) de la solución muestra y un ion hidrogeno o protón (H⁺) de la fase sensora del optodo (Abajo)

El mecanismo del optodo se describe en la *ecuación 2*, donde al formarse el complejo valinomicina - ion potasio ($K-I^+$) en la fase sensora orgánica provoca la desprotonación del cromoióforo ETH 5294 y la consecuente liberación de un protón al medio acuoso en compensación de la pérdida de un ion potasio. La constante de equilibrio del complejo valinomicina - ion potasio ($K_e^{KI^+}$) se describe en la *ecuación 2*, esta es determinada por las concentraciones y actividades de los componentes activos de la fase sensora del optodo (Akamatsu et al., 2017).

$$K_e^{KI^+} = \frac{a_{H^+} [C] [KI^+]}{a_{K^+} [C-H^+] [I]} \quad (2)$$

Donde:

$K_e^{KI^+}$ Constante de equilibrio del complejo ionóforo valinomicina - ion analito potasio.

a_{H^+} Actividad del ion hidrogeno o protón en fase acuosa.

a_{K^+} Actividad del ion analito potasio en fase acuosa.

[I] Concentración en moles/kg del ionóforo valinomicina en la fase sensora.

[KI^+] Concentración en moles/kg del complejo valinomicina – potasio (KI^+) en la fase sensora.

[C] Concentración en moles/kg del cromoióforo ETH 5294 desprotonado en la fase sensora.

[$C-H^+$] Concentración en moles/kg del cromoióforo ETH 5294 protonado en la fase sensora.

El parámetro “ α ” es definido como la fracción del cromoióforo desprotonado. Este parámetro es calculado como el cociente de forma no protonada del cromoióforo sobre la concentración total del cromoióforo y se describe en la *ecuación 3*. También se describe el parámetro “ $1- \alpha$ ” en la *ecuación 4* que se define la fracción de cromoióforo protonado. Para un valor de α igual a 1, el cromoióforo estará completamente desprotonado en solución de hidróxido de sodio de 10 mM (NaOH) y cuando α es 0, el cromoióforo estará protonado completamente en el buffer usado como medio o en una solución de ácido

clorhídrico 10 mM (HCl).

$$\alpha = \frac{[C]}{[C_C]} \quad (3)$$

$$1 - \alpha = \frac{[C-H^+]}{[C_C]} \quad (4)$$

Donde:

$[C_C]$ Concentración total efectiva en moles/kg del cromoionóforo en la fase sensora.

El valor experimental de α se calcula según la *ecuación 6*, donde las mediciones del optodo a distintos estados de protonación son hechas a un valor teórico de 660 nm (Bamsey et al., 2012), sin embargo, en condiciones reales, el máximo de longitud de onda suele no ser exactamente 660 nm, sino a un valor cercano a esa longitud de onda.

La *ecuación 2* (ver *pág. 48*) se puede reorganizar para calcular la constante de equilibrio del complejo valinomicina - ion potasio ($K_e^{K^+}$), así entonces, la constante de equilibrio se calcula a partir de las concentraciones del ionóforo (C_I), la sal lipofílica intercambiadora de iones (C_S) y cromoionóforo (C_C) según la *ecuación 6* (Capitán-Vallvey et al., 2003). Usualmente, la actividad del ion potasio (a_{K^+}) se calcula como logaritmo según la *ecuación 8*. Este modelo logarítmico es representado con una curva sigmoide típica para optodos que se describe en la *Figura 6*, donde el logaritmo de la actividad del ion potasio ($\log a_{K^+}$) es el eje X y la función $1-\alpha$ es el eje Y (Ortuño et al., 2006).

$$\alpha = \frac{[C]}{[C_C]} = \frac{A_{HC^+} - A}{A_{HC^+} - A_C} \quad (5)$$

Donde:

A_C Absorbancia a 660 nm del cromoionóforo ETH 5294 completamente desprotonado en solución NaOH 10 mM.

A_{HC^+} Absorbancia a 660 nm del cromoionóforo ETH 5294 completamente protonado en solución buffer o HCl 10 mM.

A Absorbancia a 660 nm del cromoionóforo ETH 5294 en solución problema.

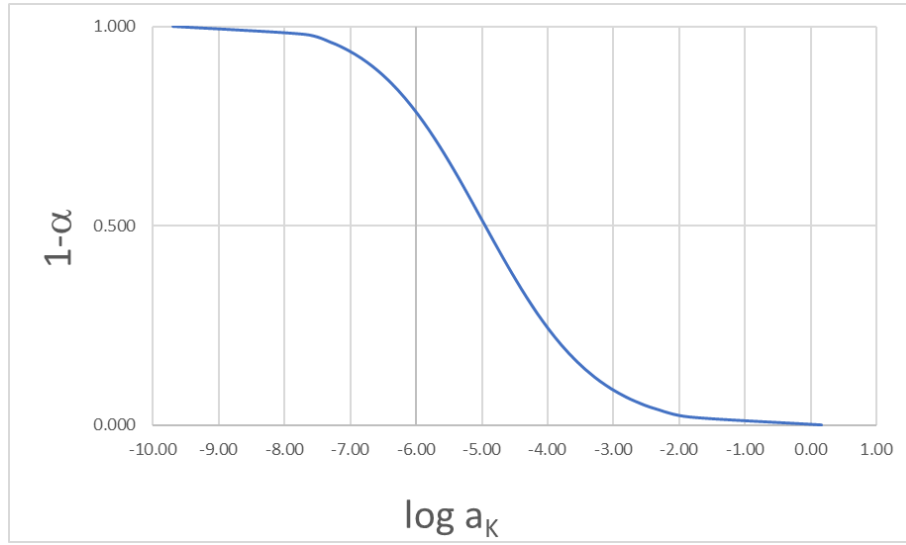


Figura 6. Modelo de la curva sigmoide para sensores ópticos, basado en el logaritmo de la actividad de potasio (eje X) y la señal “1- α” (eje Y)

$$K_e^{KI^+} = \frac{a_{H^+} \alpha}{a_{K^+} (1-\alpha)} \frac{[C_S] - (1-\alpha)[C_C]}{[C_I] - [C_S] + (1-\alpha)[C_C]} \quad (6)$$

$$\text{Log}(a_{K^+}) = \text{Log} \left(\frac{a_{H^+} \alpha}{K_e^{KI^+} (1-\alpha)} \frac{[C_S] - (1-\alpha)[C_C]}{[C_I] - [C_S] + (1-\alpha)[C_C]} \right) \quad (7)$$

Donde:

C_I Concentración total efectiva en moles/kg del ionóforo (I) en la fase sensora.

C_S Concentración total efectiva en moles/kg del anión (R^-) del intercambiador de iones de la fase sensora.

C_C Concentración total efectiva en moles/kg del cromoionóforo (C) en la fase sensora.

La ecuación 8 es aún muy compleja y se necesita simplificar, por lo tanto, se asumen criterios como usar concentraciones molares iguales del ionóforo, intercambiador de iones y cromoionóforo, es decir $C_I = C_S = C_C$. Entonces se obtiene un modelo más reducido, descrito en la ecuación 9, en el cual la constante de equilibrio del complejo valinomicina - ion potasio ($K_e^{KI^+}$) depende únicamente de la actividad del hidrógeno (a_{H^+}), la actividad del ion potasio (a_{K^+}) y el grado de desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 (α).

$$\left(\frac{\alpha}{1-\alpha}\right)^2 = a_{K^+} \frac{K_e^{K^+}}{a_{H^+}} \quad (8)$$

Los modelos de calibración sigmoide pierden linealidad, especialmente en los extremos superiores e inferiores, entonces se propone un cambio a un modelo de calibración lineal (Kisiel et al., 2018). Para lograr esto, la *ecuación 8* se puede reorganizar aplicando logaritmos y así obtener un modelo de calibración lineal tipo “Y = mX + b” como se describe en la *ecuación 9*.

$$\text{Log} \left(\frac{\alpha}{1-\alpha} \right) = 0.5 \text{ Log } a_{K^+} + 0.5 \text{ Log } \frac{K_e^{K^+}}{a_{H^+}} \quad (9)$$

La *ecuación 10* muestra la forma simplificada del modelo de calibración lineal de la curva de calibración del optodo selectivo a iones potasio (ISO). La variable independiente es el logaritmo de la actividad del ion potasio (Log a_{K^+}), la variable dependiente es el logaritmo de una función de α , algunos términos son constantes como la actividad del hidrógeno (a_{H^+}) debido al pH controlado del buffer de la solución y la constante de equilibrio del complejo valinomicina - ion potasio ($K_e^{K^+}$) se puede determinar a través de un ajuste de los datos experimentales por el método de aproximación por mínimos cuadrados (Lapresta Fernández, 2007).

Los cromoionóforos no pueden desprotonarse de manera completa, usualmente esto se debe a un deficiente transporte de masas en la fase sensora del optodo, debido a que la gradiente de concentración del cromoionóforo es muy grande comparado con el intercambiador de iones e impide el flujo de iones hacia el optodo. Esto hace que no pueda desprotonarse completamente el cromoionóforo y, por tanto, no sea posible obtener el valor de la absorbancia correspondiente al cromoionóforo desprotonado (A_c) de la *ecuación 6* (ver *pág. 49*). Para resolver esto se usa un α efectivo (α_{ef}), que se define como el grado de protonación máxima del cromoionóforo a un valor específico de pH (Lapresta-Fernández & Capitán-Vallvey, 2011). De esta manera, el grado de protonación del cromoionóforo se calcula según la *ecuación 10*.

$$1 - \alpha_{ef} = \frac{A - A_{C \text{ Tampón}}}{A_{HC} - A_{C \text{ Tampón}}} \quad (10)$$

Donde:

$A_{C \text{ Tampón}}$ Absorbancia a 660 nm del cromoionóforo ETH 5294 desprotonado a un valor de pH controlado (solución tampón).

2.6. Nano-optodo

Los nano-optodos selectivos a iones potasio (ISO) comparten algunas características con los bulk-optodos (C. H. Lee et al., 2017; L. Wang & Bakker, 2019). Las principales ventajas de los nano-optodos pueden resumirse en una fácil preparación a partir de un proceso de miniaturización de los bulk-optodos sin necesidad de purificación adicional (Soda et al., 2018; Xie & Bakker, 2017). Los nano-optodos no requieren el uso de solventes orgánicos como THF dado que son solubles en un medio acuoso debido a la acción del surfactante, constituyendo una síntesis verde de nano-optodos (Yang et al., 2016). Además, los nano-optodos no requieren controlar el pH del medio acuoso (Xie et al., 2014) y de mejorar la sensibilidad al obtener límites de detección más bajos que sus contrapartes bulk-optodos (Nair & Alam, 2006).

Los nano-optodos se pueden sintetizar a partir de sonicación, agitación o precipitación de los bulk-optodos, con un elevado grado de monodispersidad (Xie & Bakker, 2017). El tamaño de las partículas del nano-optodo puede controlarse con diferentes proporciones de surfactante (Ruedas-Rama & Hall, 2006; Stelmach et al., 2019).

La estructura del nano-optodo propuesto en esta investigación se describe en la *Figura 7*, donde los componentes del nano-optodo están disueltos en THF y encapsulados en una capa de Pluronic F-127, con capacidad de solubilizar y estabilizar el nano-optodo en un medio acuoso (Grimaudo et al., 2018; Zarrintaj et al., 2018)-

La estructura de Pluronic F-127 está formada por un copolímero tribloque con una cadena hidrofóbica central de poli óxido de propileno de 56 unidades repetidas de longitud (PPO, b en la figura 7) unida a dos cadenas hidrofílicas de polietilenglicol de 101 unidades repetidas (PEG, a en la figura 7), su función es actuar como tensioactivo o surfactante para prevenir la aglomeración de las nanopartículas. El Pluronic F-127 forma una estructura

micelar donde las cadenas de PPO hidrofóbicas se proyectan al interior del nano-optodo hacia la fase orgánica y los extremos hidrofílicos de PEG permanecen en contacto con el medio acuoso permitiendo la disolución del nano-optodo (Xie et al., 2013).

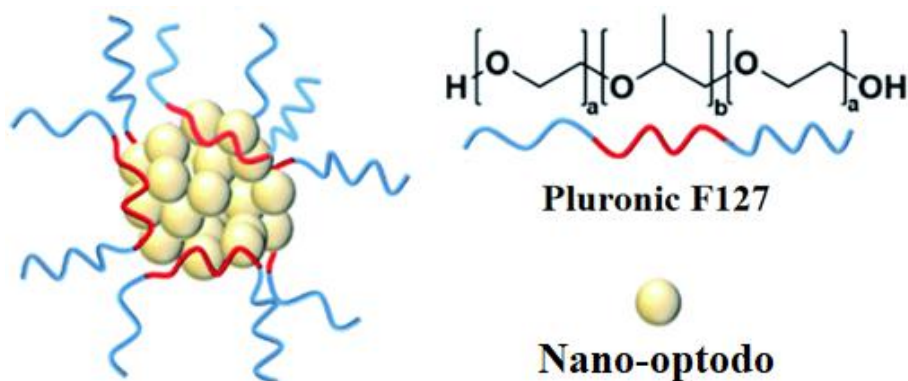


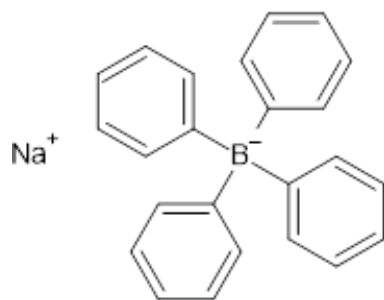
Figura 7. Estructuras de las micelas de las partículas de nano-optodos estabilizadas con el surfactante Pluronic F-127, donde $a = 101$ y $b = 56$ son coeficientes del tamaño del copolímero tribloque.

2.7. Sales de tetrafenil borato

El tetrafenilborato es ampliamente utilizado en química organometálica por su elevada solubilidad en solvente orgánicos no polares como el THF y en química analítica para la determinación de potasio por análisis gravimétrico y volumétrico (Nagorny et al., 2020). Recientemente se ha utilizado los iones tetrafenilborato como extraer iones potasio (K^+) y amonio (NH_4^+), principalmente para muestras solidas como minerales, formando un precipitado en materiales erosionados de los minerales, también se ha propuesto su uso para recuperar minerales radiactivos compuestos por radio-cesio (Scott & Reed, 1962). El ion tetrafenil borato (TP_4B^-) mostro preferencia a acomplejarse con los iones potasio (K^+), incluso en presencia de otros aniones como cloruro (Cl^-) (Dasgupta et al., 2021).

La estructura de $K-TP_4B$ muestra una forma cristalina, en la cual el K^+ se coordina con el orbital π de cuatro anillos bencénicos, provenientes de moléculas adyacentes formando una estructura llamada “ π -cage”, que se muestra en la Figura 8 (Hoffmann & Weiss, 1974).

a)



b)

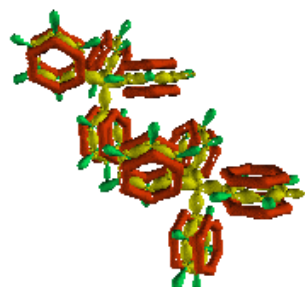


Figura 8. Estructura química a) 2D y b) 3D de 2 moléculas de tetrafenilborato de potasio (K-TP₄B), donde los anillos bencénicos están de color rojo y la los orbitales del ion potasio son de color amarillo.

Las sales de sodio de tetrafenilborato son muy soluble en agua (470 g/L), sin embargo, la forma potásica de la sal es poco soluble en medio acuosa (1.8×10^{-4} g/L), formando un precipitado blanco (Kirgintsev & Kozitskii, 1968). Si hay exceso de tetrafenilborato de potasio se formara un precipitado de color blanco, también se puede formar complejos tetrafenilborato con iones diferentes al K^+ , como con iones de tamaño y carga similar: NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ , Ag^+ y Tl^+ .

La interacción entre el ionóforo valinomicina y el ion amonio (NH_4^+) que se muestra en la Figura 9, forma un complejo enlazado por puentes de hidrogeno. Debido a que el ion amonio no es simétrico, el complejo valinomicina- NH_4^+ esta ligeramente distorsionado, más parecido a la simetría C_3 , donde tres hidrógenos del NH_4^+ están enlazados con tres átomos de oxígenos de grupos éster (1.89, 1.89, 1.95 Å), el ultimo hidrogeno forma 3 enlaces de menor energía con otros tres grupos éster (2.43, 2.49, 2.28 Å) (Dybal et al., 2008). Por ende, la posición del ion NH_4^+ dentro de la cavidad del ionóforo valinomicina es excéntrica y la formación de complejos de valinomicina- NH_4^+ es menos favorecido, en comparación hacia iones simétricos como potasio y sodio con mejores constantes de estabilidad (Rose & Henkens, 1974).

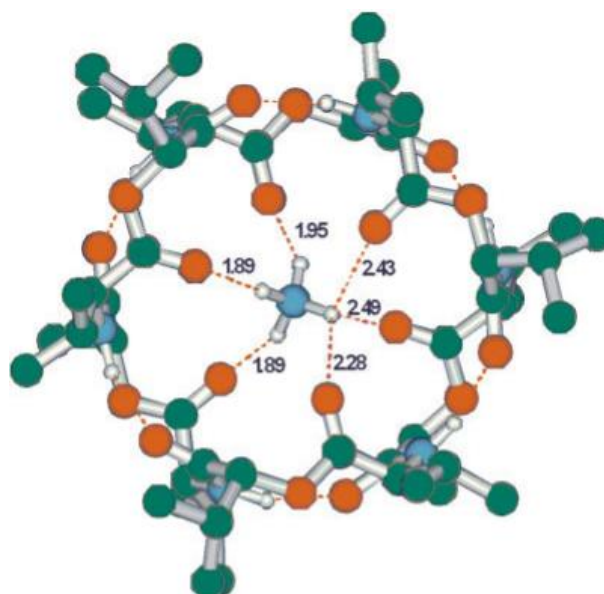


Figura 9. Estructura química del complejo valinomicina- NH_4^+ , representando los seis enlaces entre hidrógenos y grupos carbonilo. Donde los átomos de carbono (verde), oxígeno (naranja) y nitrógeno (celeste). Las distancias son mostradas en Angstrom ($\text{\AA}$).

2.8. Reversibilidad de los nano-optodos

Durante el desarrollo de sensores ópticos en la química analítica algunas características son deseables como la reversibilidad de la fase sensora orgánica del nano-optodo, siendo aprovechable la reutilización del sensor para alargar la vida útil de la fase sensora del nano-optodo, así mismo minimizar la cantidad de residuos químicos.

Entonces se propuso que los iones potasio atrapados dentro del ionóforo valinomicina, después de realizada la medición colorimétrica, podrán migrar hacia el exterior (fase acuosa) para formar un complejo blanco insoluble de tetrafenilborato de potasio ($\text{TP}_4\text{B}^- - \text{K}^+$) según la ecuación 12, permitiendo al ionóforo valinomicina quedar libre y regenerar la protonación del cromoionóforo I dentro de la fase sensora orgánica, así manteniendo la electroneutralidad del sensor. Logrando así que el sensor óptico (nano-optodo) esté listo para realizar una medición analítica, es decir lograr la reversibilidad analítica.



Ciertas condiciones pueden mejorar la separación o la velocidad de precipitación. La presencia del ion aluminio (Al^{3+}) o iones amonio (NH_4^+) han mostrado que pueden ser de ayuda a causar la separación del precipitado de tetrafenilborato de potasio ($\text{TP}_4\text{B}^- - \text{K}^+$) (Crane, 1956). También la adición de cloruro de plata (AgCl_3), aun en pequeñas cantidades, mejora la velocidad de sedimentación del complejo tetrafenilborato de potasio ($\text{TP}_4\text{B}^- - \text{K}^+$) (Rüdorff & Zannier, 1952).

2.9. Teoría del color

La definición de un método colorimétrico aplicado a una técnica analítica es aquella capaz de detectar un analito objetivo, a través de una reacción específica, dando como resultado un cambio en alguna propiedad colorimétrica, cambio de intensidad de color o cambio de longitud de absorción de la luz visible (Yu et al., 2019).

Fenómenos de interacción de la radiación electromagnética sobre los cuerpos produce la absorción, reflexión, dispersión y refracción de la luz. Siendo estos los responsables de todos los colores visibles al ojo humano. El color es una propiedad extrínseca, dependiente de la fuente de luz expuesta y la capacidad de detección (Fernandes et al., 2020).

Algunos modos de detección en la metodología colorimétrica son la absorbancia, que se fundamenta en la intensidad de la radiación monocromática absorbida por un compuesto colorido, la transmitancia, que se basa en la intensidad de la radiación monocromática no absorbida por un compuesto colorido y la reflectancia, basado en la medición radiación monocromática reflejada desde la superficie colorida.

Los espacios de color más utilizados son CMYK (cian, magenta, amarillo y negro) o RGB (rojo, verde y azul). El espacio de color HSV (Tono, Saturación, Valor) o HSB (Tono, Saturación, Brillo) también se han usado para el análisis de colores digitales. Debido a la gran variedad en dispositivos de captura de imágenes, diferentes marcas y clases de cámaras digitales, el color podría verse alterado y ser poco reproducible. En el espacio HSV se propone un parámetro llamado robustez, que es una función de las absorbancias y la desviación estándar, con ello se logra no depender de factores externos de iluminación (Cantrell et al., 2010). La Comisión Internacional de Iluminación (CIE) definió el espacio de color CIE Lab y CIE XYZ, son todos derivados del espacio RGB, que se han utilizado en

aplicaciones cuantitativas (Hirayama et al., 2000). El espacio de color CMYK tiene señal de 0 a 100 % para cada color independiente, la combinación de colores produce diferentes colores, existen limitantes como no lograr el color negro en un espectro de color completo (Lapresta-Fernández & Capitán-Vallvey, 2008).

El espacio de color RGB emplea un rango de 0 a 255 (formato de 8 bits), este es un sistema aditivo, es decir, se puede obtener otros colores partir de la combinación de los tres principales. El negro es representado como $[R=0, G=0 \text{ y } B=0]$ y el blanco como $[R=255, G=255 \text{ y } B=255]$ (Lapresta-Fernández & Capitán-Vallvey, 2008). Las coordenadas del espacio de color RGB forman un cubo en un cuadrante del espacio cartesiano, donde cada color es uniforme en todos los ejes como se muestra en la *Figura 10*.

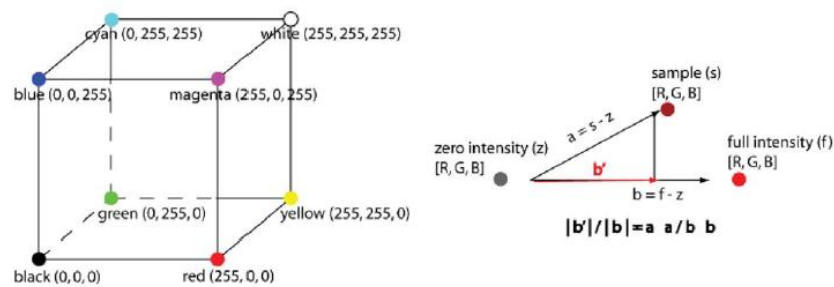


Figura 10. (Derecha) Cuadrante de color para el sistema RGB. (Izquierda) Proyección del vector muestra (s) en una coordenada (b'). (Saiz et al., 2023)

En el espacio RGB se obtienen 3 señales individuales provenientes de cada canal de color. A través de un análisis por cada color según las intensidades individuales de color RGB, el sistema de tres señales es más representativa de la muestra que la metodología de espectrometría de una sola señal de absorbancia, por ende, los resultados obtenidos tienen mejor sensibilidad y menores límites de detección (Yadav et al., 2022).

El color es dependiente de la iluminación y la resolución del instrumento de captura del color. Entonces el color, puede ser fácilmente alterado si no se controla ciertos parámetros. Para ello, se han diseñado implementos ópticos adicionales como lentes macro, filtros, fibras ópticas o colimadores que se incorporan al dispositivo de captura de imágenes.

Todos los espacios de color brindan información relativa al color detectado, algunos incluyen parámetros como intensidad de color e iluminación, entonces puede ocurrir que los

colores no sean equivalentes cuando se convierten en diferentes espacios de color o sean detectados con diferentes dispositivos de captura, diferentes cámaras, diferentes modelos o marcas (Tiuftiakov et al., 2021).

Aunque existen ecuaciones que permiten interconvertir las señales entre distintos espacios de color, hay información que se pierde y adiciona error a los resultados obtenidos. También existen ecuaciones que correlacionan las señales ópticas (absorbancia) de los sensores colorimétricos (optodos) con las señales del espacio de color RGB, pero estas ecuaciones no toman en cuenta las variabilidades del color por la corrección gamma y la sensibilidad espectral RGB (Soda & Bakker, 2021). Algunas relaciones entre la señal/respuesta se han usado para la corrección del color detectado y para mejorar la reproducibilidad de la señal (Ahuja et al., 2014; Tiuftiakov et al., 2021). Por lo tanto, se hace crucial escoger el adecuado espacio de color para minimizar los errores y la variabilidad durante el proceso de detección del color.

2.10. Métodos colorimétricos con sensores ópticos

En la química analítica, la necesidad de métodos colorimétricos cada vez más rápidos y precisos, ha ido en aumento, que se refleja en el incremento de las publicaciones en el periodo 2000-2022 sobre análisis colorimétricos según se muestra en la *Figura 11*. Además, la tendencia en la miniaturización de métodos cuantitativos es compatible con los métodos colorimétricos aquí descritos (Tiuftiakov et al., 2021).

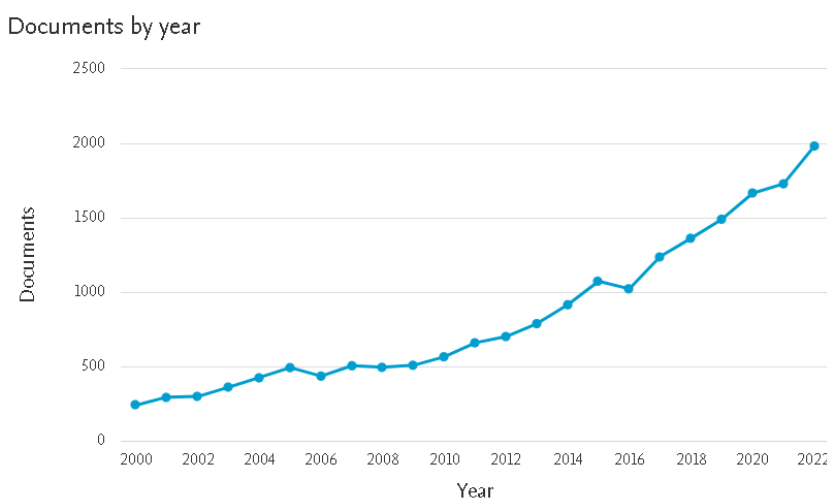


Figura 11. Número de publicaciones en el periodo 2000-2022 en la base de datos Scopus con el término de búsqueda “colorimetric analysis”. Derechos de autor Elsevier.

La metodología colorimétrica es la técnica de detección de analitos más empleada, basados en el cambio de intensidad del color o en el cambio en la longitud de onda de absorción de la luz de un cromóforo en presencia del analito objetivo (Jain et al., 2020). Esta señal óptica es traducida como el grado de desprotonación del cromoforo I según la variable “ $1-\alpha$ ”, el cual es usado como base para la cuantificación de los analitos por los sensores ópticos como los optodos. La obtención de las señales ópticas como la absorbancia de luz en el rango visible se realizó comúnmente por técnicas espectrofotométricas clásicas, con elevada sensibilidad, respuesta rápida, facilidad de aplicación y fácil aplicación a distintos tipos de analitos. Este sistema de medición también tiene limitantes en sistemas poco homogéneos y es necesario controlar factores como el pH del medio.

Las bases históricas en el desarrollo de los análisis colorimétricos se inician en el año 1852, año en que se presentó las bases de la óptica como la ley de Beer (Beer, 1852), luego se desarrollaron equipamiento especializado en la medición de color como los primeros dispositivos colorimétricos durante el siglo XIX propuestos por Müller (Müller, 1853), Dehm (Müller, 1863) y Duboscq (Stock, 1994).

2.11. Captura de imágenes con cámaras digitales

La cuantificación del analito a partir de capturas de imágenes permite resolver la información óptica de la fase sensora del optodo a un sistema de tres dimensiones en el espacio de color RGB con el filtro de color Bayer. Una limitante de los colores RGB es la dependencia directa entre la detección del color y la resolución espectral de la cámara fotográfica (Christodouleas et al., 2015). El ruido óptico suele ser la variabilidad de color entre píxeles vecinos, dependiendo de la homogeneidad del color de la muestra estudiada y de la resolución de la cámara digital. La adecuada atenuación del ruido óptico es crucial en la calidad de la imagen como señal analítica. (Zieger et al., 2022).

Los datos obtenidos por la metodología clásica de espectrofotometría UV-Vis son coherentes con los datos a base de captura de imágenes en el espacio de color RGB (Soda et al., 2019a). Se tomó como longitudes de onda para el color rojo (R, *red*) a 660 nm, para el color verde (G, *green*) a 520-555 nm y para el color azul (B, *blue*) a 460 nm (Elsabaa et al., 2022). Es decir, se puede estimar el valor de α de la *ecuación 4* (ver *pág. 49*), a partir de la intensidad de la luz, según la ley de Beer-Lambert de la *ecuación 13*, que relaciona la absorción de la luz y la intensidad de las señales en un medio específico. A partir de las

intensidades de color del cromoionóforo del optodo se puede calcular α según la *ecuación 13* (Soda & Bakker, 2021).

$$A = -\log_{10} \frac{I_1}{I_0} \quad (12)$$

$$\alpha = \frac{\log(I/I_{HC})}{\log(I_C/I_{HC})} \quad (13)$$

Donde:

I_1 Intensidad de la luz final.

I_0 Intensidad de la luz inicial.

I_{HC} Intensidad de la luz del cromoionóforo protonado.

I_C Intensidad de la luz del cromoionóforo desprotonado.

Se puede obtener el valor α directamente de los colores independientes del espacio RGB. El cromoionóforo I no tiene una señal del color azul (460nm) proporcional a su estado de protonación, por ende, se utiliza los colores rojo y verde (Tiuftiakov et al., 2021). Por ello no se usó la señal del color azul en la *ecuación 14* (Soda & Bakker, 2021).

$$\alpha = \frac{\log\left(\frac{G_P R}{R_P G}\right)}{\log\left(\frac{G_P R_D}{R_P G_D}\right)} \quad (14)$$

Donde:

R Intensidad de la luz del color rojo.

G Intensidad de la luz del color verde.

G_P Intensidad de la luz del cromoionóforo protonado del color verde.

R_P Intensidad de la luz del cromoionóforo protonado del color rojo.

R_D Intensidad de la luz del cromoionóforo desprotonado del color rojo.

G_D Intensidad de la luz del cromoionóforo desprotonado del color verde.

En este trabajo se propuso una nueva ecuación para el cálculo de “ α ” como un cociente o ratio entre las dos señales del cromoforo I (ETH 5294), los valores teóricos de 540 nm a un estado desprotonado y a 660 nm para un estado protonado, los valores experimentales pueden variar ligeramente. Estas señales pueden reemplazar a los colores verde (520-555 nm) y rojo (600 nm) de la *ecuación 15*, al ser cercanos, en una ecuación radiométrica dependiente de las señales del cromoforo según se muestra en la *ecuación 16*.

El uso de una función radiométrica, que emplean un *ratio* entre señales, para cuantificar el analito, ha mostrado en métodos ópticos la no dependencia de la intensidad de la luz de fondo o de la sensibilidad espectral (Ye et al., 2007). En este caso el cálculo de α es dependiente de las absorbancias del cromoforo a diferentes longitudes de onda de intensidad de luz.

$$\alpha = \frac{\log(I_{A540} \times I_{HC A660} / I_{HC A540} \times I_{A660})}{\log(I_{C A540} \times I_{HC A660} / I_{HC A540} \times I_{C A660})} \quad (15)$$

Donde:

I_{A540} Intensidad de la luz del cromoforo a 540 nm.

I_{A660} Intensidad de la luz del cromoforo a 660 nm.

$I_{HC A540}$ Intensidad de la luz del cromoforo protonado a 540 nm.

$I_{C A540}$ Intensidad de la luz del cromoforo desprotonado a 540 nm.

$I_{HC A660}$ Intensidad de la luz del cromoforo protonado a 660 nm.

$I_{C A660}$ Intensidad de la luz del cromoforo desprotonado a 660 nm.

2.12. Métodos analíticos basados en la captura de imágenes

Los métodos analíticos colorimétricos son estudiados por su perfil de absorbancia en el rango del espectro visible (400 -800 nm) y son una poderosa herramienta en el diseño de nuevos sensores químicos (Fernandes et al., 2020). Estas características ópticas como el cambio de la longitud de onda en la absorbancia de la luz es compatible con los optodos,

capaces de cambiar la intensidad de color o la longitud de onda absorbida en forma proporcional a la concentración de un analito.

En la literatura, las metodologías colorimétricas se han utilizado con distintos dispositivos para la detección de color, como los escáneres (Lapresta-Fernández & Capitán-Vallvey, 2008), analizadores digitales de color (Hirayama et al., 2000), cámaras de teléfonos inteligentes “smartphone” (Masawat et al., 2017), dispositivos con sensores CCD (dispositivo de acoplamiento de carga) y CMOS (semiconductor de óxido de metal complementario) (Ehgartner et al., 2014; Strömberg et al., 2009). La mayoría de los dispositivos colorimétricos son portátiles y fácil de usar, pero son sensibles a los cambios en factores externos como la iluminación o la estabilidad de la alimentación eléctrica. La homogeneidad en el proceso de medición del color es crucial en la determinación del analito, por ende, se debe controlar las variables que alteren el color detectado por las cámaras digitales. Una deficiente iluminación puede causar una reducción en la amplitud de la señal y una respuesta no correlacionada a la concentración del analito (Tiuftiakov et al., 2021).

La instrumentación básica de un equipo de detección de color incluye una fuente de radiación en rango de luz visible que sea estable, un detector para la radiación y filtros de luz (monocromadores) en caso de ser necesario. En este trabajo se propone el uso de dispositivo de captura de imágenes como cámaras digitales portátiles (Christodouleas et al., 2015) y de diodo emisor de luz (LED) como fuente de luz visible, permitiendo obtener diferentes colores, es decir, diferentes longitudes de onda, según la energía de la banda prohibida del semiconductor, explicado como la diferencia de energía (Bui & Hauser, 2015; DASGUPTA et al., 1993). Los diferentes colores son generalmente obtenidos a partir de la combinación de la emisión de colores como rojo, verde y azul en diferentes proporciones según el espacio de color RGB. El uso de LED como herramienta en química analítica está reportado como parte de dispositivos más pequeños, con capacidad de análisis portátiles (Rios et al., 2009).

En los últimos 10 años, las técnicas colorimétricas han ganado popularidad debido a la tendencia de miniaturización de dispositivos analíticos y el avance en la tecnología de captura de imágenes como en la globalización del uso de celulares inteligentes o *smartphone* (Fernandes et al., 2020). El aumento en la accesibilidad de estos dispositivos tecnológicos son una herramienta ampliamente compatible en el análisis colorimétrico, en el mismo sentido, las tecnologías optoelectrónicas como los diodos emisores de luz (LED) como

fuentes de luz estable, robusta y de bajo coste. El desarrollo de sensores colorimétricos como los optodos con capacidad portátil para la medición de color bajo condiciones controladas (Stich et al., 2009) en la cuantificación de analitos interesantes es aplicable en diversos campos de la ciencia como bioanalítica (Kanchi et al., 2018), medicina o alimentos (Hatcher et al., 2004).

2.13. Instrumentación de dispositivos de captura de imágenes

La tecnología en los dispositivos de captura de imágenes nos provee herramientas útiles para la detección del color en sensores ópticos. Las características de las cámaras digitales que actualmente existen en el mercado son adecuadas y con una buena resolución para la detección del color. Además, el acceso a internet en estos dispositivos permite el intercambio de imágenes de forma casi inmediata, dado que se puede almacenar las imágenes en la nube y esta puede ser analizada por especialistas, sin la necesidad de los requerimientos de control durante el transporte de muestras al laboratorio. Este tipo de análisis es especialmente útil en caso de ser aplicado en zonas de escasos recursos o zonas alejadas de centros urbanos.

2.13.1. Cámaras digitales

Dispositivos de captura de imágenes como cámaras digitales, cámaras web, escáneres o teléfonos inteligentes presentan características como facilidad de uso, capacidad de portabilidad y la posibilidad de resultados instantáneos (Mei et al., 2016). El constante avance en la tecnología de estos dispositivos, como el aumento en la resolución óptica y mayor capacidad de memoria interna, los convierte en herramientas potentes en metodologías colorimétricas, útiles en aplicaciones de análisis químico en diversos campos de la ciencia (McCracken & Yoon, 2016). También se han desarrollado metodologías adecuadas, en plataforma *smartphone*, de fácil acceso y aplicabilidad para su empleo por personal no capacitado (Yadav et al., 2022). Debido a estas características, la tecnología *smartphone* permite escalar las metodologías colorimétricas u otras señales ópticas de una manera sencilla para la cuantificación de un amplio espectro de analitos como cationes, aniones y metales pesados (Keçili et al., 2021).

Las imágenes en un *smartphone* están compuestas por píxeles, cada píxel contiene toda la información relativa al color e iluminación de esa área específica. La cantidad de píxeles puede ser usado en la determinación del color pues es directamente proporcional a la resolución de cada imagen. La mayoría de las cámaras digitales están clasificadas como

un dispositivo de carga acoplada (CCD), compuesta de un sustrato de silicio, con una matriz de condensadores de tecnología semiconductor metal-óxido (MOS) utilizado en cámaras de fotografía de gama profesional o con un semiconductor complementario metal-óxido (CMOS) más común en cámaras digitales de celulares y webcam (ERENAS RODRÍGUEZ, 2011). Esta matriz de sensores MOS, tiene una disposición de cuadrícula de fotodiodos, cada uno de estos es llamado píxel, los fotones de luz interactúan con los fotodiodos durante un tiempo de almacenamiento o tiempo de integración, durante el cual se genera una carga proporcional a la intensidad de luz recibida. En este trabajo se usó un detector CCD con filtro de Bayer, con filtros de color compatibles con el espacio RGB.

Un dispositivo externo como el amplificador de señal o transistor MOS recibe la carga de cada fotodiodo de la matriz y la transforma a una señal eléctrica o voltaje correspondiente a la señal óptica recibida por cada píxel, donde el color percibido por cada píxel es la intensidad aditiva de la combinación de cada color individual (rojo, verde y azul). Al ser un proceso eléctrico, puede ser reversible, es decir, después de la descarga, el píxel está listo para detectar el color nuevamente. En el caso de un transistor CMOS, cada píxel funciona de forma independiente entre sí, es decir, cada píxel es capaz de emitir el color verdadero. En resumen, un sensor óptico convierte la luz recibida en una señal eléctrica, utilizando un software de conversión analógico/digital generando una imagen de mapa de bits.

El principio óptico en la detección del color por las cámaras digitales es la reflectancia difusa. La reflectancia se da por la interacción de la luz incidente sobre la superficie de la muestra, en la cual, una parte penetra la superficie y se absorbe, mientras la luz restante se refleja. La mayoría de los cuerpos absorben la luz en forma de radiación y son adecuados para el análisis por captura de imágenes. Se han reportado publicaciones que correlacionan un cambio de color con reacciones químicas que logran desarrollar curvas de calibración de analitos de interés a partir de las imágenes obtenidas de cámaras digitales (Benedetti et al., 2015; Luiz et al., 2015; Pessoa et al., 2017). Otro factor relevante es la distancia focal, es decir, la distancia entre la cámara digital y la superficie de la muestra estudiada. El uso de un soporte para mantener inmóvil la cámara digital evita errores durante la captura de imágenes.

En el caso de teléfonos inteligentes “*smartphone*” como herramienta de captura de imágenes no se puede controlar algunos parámetros como brillo o balances de blancos. Para

contrarrestar estos efectos, se han usado aplicaciones que controlan esos parámetros ópticos, por ejemplo. la aplicación “*Open Camera*”, que controla el balance de blancos, ajuste de sombras y estabilización de imagen automática, de esa forma se pueden obtener imágenes de buena calidad sin variabilidad entre las repeticiones.

Luego del proceso de captura de imágenes digitales, la señal colorimétrica se extrae desde una región de interés (ROI) de la superficie de la muestra, previamente seleccionada de cada imagen. Esta región seleccionada debe ser una superficie homogénea y difusa (no brillante) para la obtención de un color representativo de la muestra original.

2.13.2. LED

El LED (light-emitting diode) usado es denominado como un dispositivo de montaje en superficie (SMD). En esta, los diodos se colocan directamente sobre una placa de circuito impreso (PCB), usualmente viene en tríos de colores RGB y el color producido es una combinación de los colores individuales. Las especificaciones técnicas son variables dependiendo del modelo. Los LEDs suelen ser bastantes pequeños, usualmente de 3×3 mm y con una potencia óptica de hasta 250 mW (Fernandes et al., 2020).

Los LEDs son una fuente de luz, siendo una herramienta capaz de controlar la intensidad de la luz, con una luminosidad constante (W. Chen et al., 2019). Durante el proceso de medición, también debe considerarse la naturaleza de la muestra y reducir el exceso de brillo reflejado desde la superficie de la muestra. Una técnica muy utilizada es iluminar la muestra desde distintos ángulos para reducir el ruido lumínico durante la detección del color (Albizu et al., 2020).

2.13.3. Transductor de señal

El transductor de señal usado en este trabajo fue un ordenador de placa simple (SBC) *Raspberry Pi 4 B* con una cámara digital de 5 MP y una fuente de luz LED SMD 5050. El ordenador Raspberry Pi utiliza un algoritmo programado en el lenguaje *Python* para la detección del color del optodo, según el espacio de color RGB. La celda de medición consta de una estructura cuadrada aislada de la luz ambiental, esta cuenta con conexiones tipo USB para la alimentación eléctrica y la fuente de luz LED.

El tratamiento de color se basa en de la digitalización de la imagen, teniendo en cuenta factores como el brillo, el tono de color, el grado de transparencia y la intensidad o la difusión de la luz reflejada sobre el color (Saranchina et al., 2021). Algunos requisitos para

la captura de imágenes son: tener una distribución del color homogénea en la superficie y utilizar como principio una reacción química completa, es decir, el color sea estable y no cambie durante el paso del tiempo (Xing et al., 2020). En caso la muestra sea lo suficientemente transparente, que el color del fondo pueda afectar el color detectado por la cámara digital, se deberá mantener un fondo de color blanco, debido a que el color blanco no altera las condiciones de medición (Kalinichev et al., 2019).

Algunos autores han reportado el uso de aplicaciones para teléfonos inteligentes para el tratamiento de la información del color. La aplicación mencionada es “*Photometrix*” disponible en la tienda de aplicaciones digital, este software soporta el análisis de calibración lineal por el método de mínimo cuadrados (PLS), además de tener la capacidad de extraer las señales colorimétricas de las imágenes en el espacio de color RGB (Helfer et al., 2018; Soares et al., 2020).

2.14. Técnicas de caracterización de los nano-optodos

2.14.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El SEM es una técnica que escanea superficies de distintos tipos de materiales. Esta técnica utiliza un haz de electrones de baja energía que se mueven sobre la superficie del material para enfocar y escanear las muestras. La función principal del microscopio electrónico de barrido (SEM) es ampliar pequeñas características u objetos que de otro modo serían invisibles para la vista humana. Lo hace mediante el uso de un haz de electrones en lugar de la luz que se utiliza para formar imágenes en los microscopios de luz óptica. Las imágenes se obtienen escaneando un haz de electrones de alta energía sobre la superficie de la muestra. En virtud de su longitud de onda más pequeña, los electrones pueden resolver características o detalles más finos de los materiales en una medida mucho mayor en comparación con la luz óptica (Ul-Hamid, 2018)

A diferencia del microscopio electrónico de transmisión (TEM) que utiliza electrones transmitidos, el microscopio electrónico de barrido (SEM) utiliza electrones emitidos según la Figura 12. El microscopio electrónico de barrido se basa en aplicar energía cinética para producir señales sobre la interacción de los electrones superficiales del material estudiado. Estos electrones son electrones secundarios, electrones retrodispersados y electrones retrodispersados difractados que se usan para ver elementos cristalizados y fotones. Los electrones secundarios y retrodispersados se usan para producir una imagen. Los electrones secundarios emitidos por la muestra desempeñan el papel principal de detectar la morfología

y la topografía de la muestra, mientras que los electrones retrodispersados muestran contraste en la composición de los elementos de la muestra (Mohammed & Abdullah, n.d.).

Las muestras destinadas al SEM han de cumplir dos condiciones: deben estar secas y ser conductoras. El proceso de secado ha de llevarse a cabo preservando al máximo la estructura original de la muestra. Para ello tenemos dos alternativas: usar el método clásico de fijación y deshidratación química o utilizar el moderno método de fijación física por crio fijación que ya está acoplado a uno de los microscopios. En ambos casos la muestra necesita recubrirse después con un material que la haga conductora y permita su observación en el microscopio (Ul-Hamid, 2018).

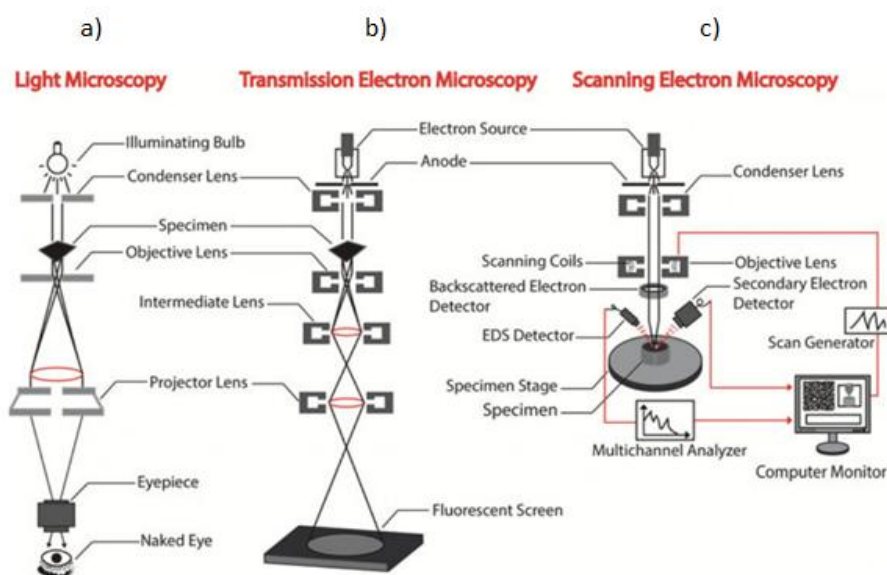


Figura 12. Esquema comparativo de técnicas de formación de imágenes en (a) microscopios electrónicos de luz, (b) TEM y (c) SEM.

2.14.2. Dispersión dinámica de luz (DLS)

El DLS se basa en el hecho de que las nanopartículas en dispersión coloidal se mueven aleatoriamente debido al movimiento browniano, provocado por la dispersión de la luz incidente. Cuando el tamaño de las nanopartículas es inferior a 1/10 de la longitud de onda de la luz incidente, se produce una dispersión elástica denominada dispersión de Rayleigh. Por el contrario, cuando el tamaño de las nanopartículas supera este umbral, se produce una dispersión inelástica y anisotrópica, denominada dispersión de Mie. Esto se

muestra a detalle en la *Figura 13*.

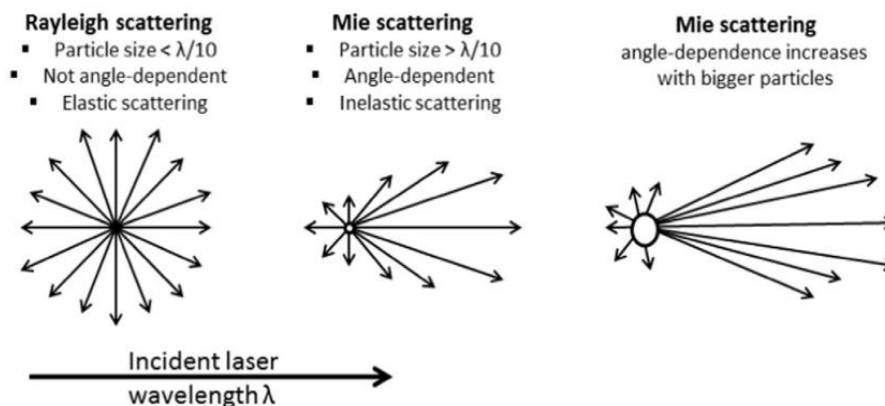


Figura 13. Esquema comparativo de la dispersión de Rayleigh y Mie, según el tamaño de la partícula.

El DLS utiliza un haz de luz suave en lugar de un haz de electrones de alta energía para interactuar con las partículas. Debido a ello, el DLS se puede usar para medir los radios hidrodinámicos (R_h) de las partículas coloidales suspendidas con un amplio rango de tamaños. El radio hidrodinámico se define como el radio de la hipotética esfera dura que se difunde con la misma velocidad que las partículas ensayadas bajo DLS. En realidad, las partículas dispersas están hidratadas o solvatadas junto con su corona y a menudo no son completamente esféricas. La composición de la corona, especialmente la corona blanda, es dinámica y fluctúa con el tiempo según la fuerza iónica, los tipos de moléculas más pequeñas y más grandes presentes en el medio ambiente y la naturaleza de los solventes. Para calcular el radio hidrodinámico (R_h) se usa la ecuación de Stokes-Einstein $D = \frac{k_B T}{6 \pi \eta R_h}$. En este modelo, las partículas dentro del líquido se consideran esferas duras e insolubles, D es el coeficiente de difusión traslacional de partículas, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura del líquido, η es la viscosidad dinámica del líquido y R_h es el radio hidrodinámico de la partícula.

2.14.3. Efecto Tyndall

El efecto Tyndall es una característica de nanopartículas en suspensión o coloides, en la que “la luz azul de longitud de onda corta se dispersa con más fuerza que la luz roja de longitud de onda larga” (Encyclopaedia Britannica Inc., 2021). El efecto Tyndall se produce

a partir de partículas de tamaño similar a la longitud de onda de la luz. El físico John Tyndall (1820 – 1893) estudió el fenómeno extensamente.

Cuando un haz de luz relativamente angosto como el láser atraviesa una solución coloidal, las nanopartículas presentes desvían la luz y se muestran pequeñas y brillantes manchitas de luz llamadas orbes. Este fenómeno no es apreciable en soluciones verdaderas.

2.15. Validación analítica

La validación de un método analítico es el proceso de verificar los requisitos necesarios para un correcto funcionamiento de los dispositivos analíticos según el alcance de su aplicación, en términos de un buen desempeño e idoneidad, según normas internacionales que regulan a los laboratorios de servicios a nivel mundial como las normas ISO/IEC 17025. Específicamente, el apartado 5.4.2 de la ISO/IEC 17025 define la necesidad de validar un método: “El laboratorio debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración que sean apropiados para los ensayos o las calibraciones que realiza” (Norma Técnica Peruana, 2017). Un esquema del proceso de validación de un método analítico se muestra en la *Figura 14*. El proceso de validación debe ser lo más amplio posible, es decir, se debe probar la mayor cantidad posible de requisitos según la aplicación de la metodología (Magnusson, 2014)

Es importante validar un método analítico, no solo para obtener resultados fiables en diversas áreas de la vida humana (Magnusson, 2014), sino también para detectar algún compuesto contaminante en ensayos previos a la salida del mercado de un producto alimentario, incluyendo diversos campos de acción como agrícola, medioambiental, clínico, construcción, entre otros.

Otro punto resaltante de la validación analítica es la adecuada toma de decisiones, por ejemplo, un resultado proveniente de un método no validado podría provocar el retiro incorrecto de un lote de productos del mercado y las consecuencias en términos económicos y legales. Cuando un resultado es poco confiable, el cliente no será capaz de tomar buenas decisiones a partir de estos. Más aún, si la metodología diseñada es novedosa, el método debe validarse para un uso adecuado, es decir, sin errores. Por ende, no solo es importante desarrollar un método analítico de fácil uso y de bajo costo, también es importante comprobar la capacidad de la metodología durante el proceso de validación analítica.

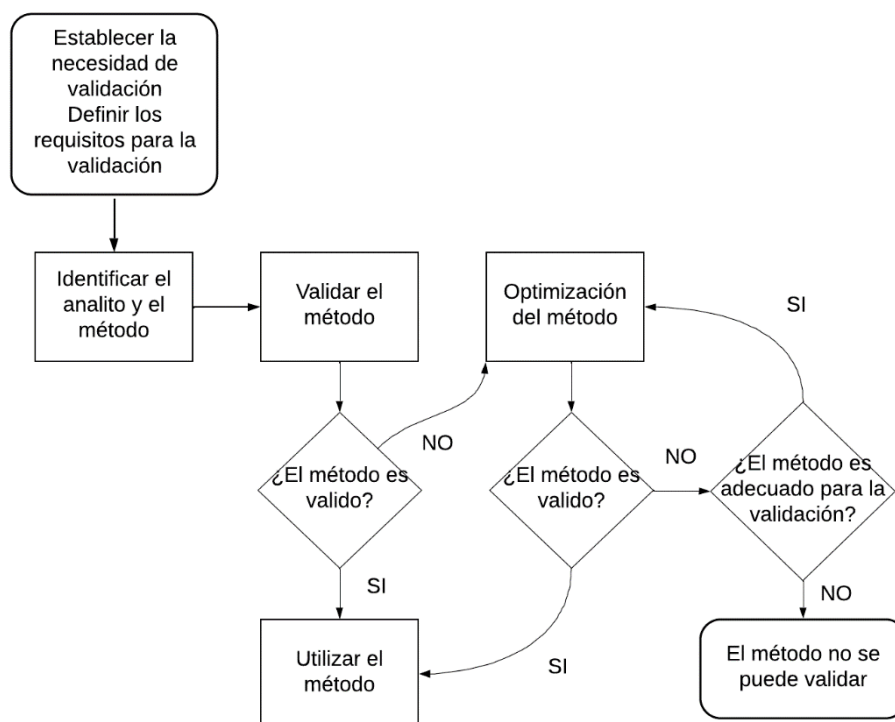


Figura 14. Proceso de validación de un método, iniciando con la necesidad de cuantificar un analito, pasando por la validación y optimización, hasta la aplicación de la metodología validada.

2.16. Estadística

2.16.1. Estadística descriptiva

La estadística descriptiva es la rama de la estadística que resume la información de forma clara y sencilla.

- Medidas de tendencia central

Los estadísticos de tendencia central son valores que describen el comportamiento de un grupo de datos y los resumen en un valor único para un tipo específico de distribución de datos. Las medidas de tendencia central más comunes son la media aritmética o comúnmente llamado promedio, la mediana y la moda.

La media aritmética ($\bar{x}$) es un valor que describe el promedio de los datos, es calculada de la sumatoria de todos los datos dividido entre el número de datos (n). La media aritmética es el estadístico más usado y es útil para grupos grandes, grupos mayores a treinta datos y cuando la distribución de datos es normal o paramétrica, definido como una

distribución que sigue la curva de Gauss.

$$\text{Media aritmética} \quad \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

La mediana es un valor que divide el grupo de datos en dos partes iguales, los datos deben ordenarse en forma ascendente, este estadístico es útil para datos con distribución no normal. En el caso de un grupo con número de datos pares, se escoge los dos datos centrales y se calcula la media aritmética, en el caso de un grupo con número de datos impares, se escoge el dato central. Otra forma de calcular la mediana es con el uso de percentil 50 (P_{50}).

La moda es el valor más repetido del grupo de datos, independientemente de la posición que ocupe dentro de la serie de datos, dependiendo la distribución de datos puede existir más de un valor de moda.

- Medidas de dispersión

Los estadísticos de dispersión son valores que describen la extensión en un grupo de datos, es decir, que tan alejados o cercanos están los datos de un mismo grupo, estos estadísticos son complementarios a las medidas de tendencia central. Las medidas de dispersión más usadas son la varianza y desviación estándar.

La varianza (σ^2) es una medida de dispersión que se calcula la distancia entre un grupo de datos y la media aritmética del grupo. La varianza es un valor cuadrático, esto se hace para volver todos los valores al positivo.

$$\text{Varianza} \quad \sigma^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

La desviación estándar (σ) es la medida de dispersión más empleada y se calcula a partir de la raíz cuadrada de la varianza. La desviación estándar es útil porque está en las mismas unidades de los datos. Otro estadístico útil es la desviación estándar relativa (RSD) que se calcula con la conversión de la desviación estándar a porcentajes, este estadístico es útil cuando el grupo de datos es muy disperso o relativamente pequeño.

Un parámetro de control para la validación analítica es el RSD teórico planteado por Horwitz, en el cual se define una tolerancia máxima a la concentración de un analito, dependiente únicamente de su propia concentración (Horwitz & Albert, 2006).

$$\text{Desviación estándar} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

$$\text{Desviación estándar relativa } RSD = \frac{\sigma \times 100}{\bar{x}}$$

$$RSD_{\text{Horwitz}} = 2^{1-0.5 \log C}$$

2.16.2. Estadística inferencial

La estadística inferencial es un conjunto de procesos por los cuales se logra deducir información de un grupo de datos a partir de su estadística descriptiva. La estadística inferencial aplicada a la validación analítica es el contraste de hipótesis, en el cual se plantea una hipótesis afirmativa o nula para comprobar los requisitos de validación y una hipótesis negativa o alterna en caso no se cumpla la hipótesis inicial. Los resultados dependen de la calidad de los datos de estadística descriptiva, ósea deben ser lo más representativo posible al grupo de datos original.

Los criterios de aceptación de la hipótesis nula dependen de ciertos intervalos de confianza, superior e inferior, definidos previamente al análisis estadístico. Este criterio de aceptación se suele expresar en forma de porcentaje en el nivel de confianza, usualmente se usa un valor mínimo de 95 %, como 0.05 (Seoane et al., 2007). Es decir, si el resultado del $p\text{-value} > 0.05$ la prueba estadística es mayor al nivel de confianza establecido (95 %), se dará como aceptara la hipótesis nula, en caso contrario, cuando el valor de $p\text{-value} \leq 0.05$ es menor o igual al nivel de confianza establecido se rechazará la hipótesis nula.

2.16.3. Gráfico de control

Los parámetros estadísticos de la validación se comparan con un valor de referencia para evaluar la trazabilidad de la medición de los resultados. Los gráficos o cartas de control son herramientas útiles para comparar la desviación entre los datos de un mismo grupo. Los más usados son los gráficos de control de Stewart, en el cual se evalúa si un grupo de datos o un proceso está dentro de unos valores restringidos previamente definidos, dichos datos se grafican en una tabla control para evaluarse estadísticamente (Koutras et al., 2007).

Los parámetros de una validación analítica que pueden evaluarse con gráficas de control son la precisión, la veracidad y la estabilidad. En la evaluación de la precisión se toman valores repetidos de una concentración conocida del analito, este grupo de datos es graficado y se contrasta la desviación estándar del grupo de datos o alguno de sus derivados contra un valor de tolerancia máxima. En la evaluación de la veracidad los datos serán

confrontados con un valor de referencia o valor comúnmente verdadero (VCV), la estimación del valor de referencia puede ser tomado de un valor de un método certificado, ya sea realizado por el mismo laboratorio o externamente, también puede ser tomado por la recuperación de concentración en muestras fortificadas

Los criterios de aceptación utilizados para aceptar o rechazar las hipótesis de la validación analítica son estimados previamente y suele utilizarse el mismo nivel de aceptación planteado en la estadística inferencial, es decir, un 95 % de nivel de confianza durante la validación.

2.16.4. Análisis de regresión lineal

Un análisis de regresión es un análisis de correlación entre dos variables para generar una ecuación capaz de relacionar las variables de señal y respuesta. La regresión es un modelo para predecir el comportamiento de un sistema de medición y es usado en validación analítica para describir un modelo de calibración de un instrumento de medición para la cuantificación de un analito.

Según el tipo de relación entre la señal y respuesta, la más común es la regresión lineal simple, una respuesta (denominada Y) y una señal predictora (denominada X). La ecuación de calibración describe como cambia la variable respuesta Y según cambios de la variable señal X y predecir el valor de la variable respuesta a partir de cualquier señal en un rango de respuesta, según la calibración.

La metodología para calcular la ecuación es la regresión lineal, es la de mínimos cuadrados ordinarios (OLS), la ecuación se enfoca en minimizar la suma al cuadrado de las distancias entre los puntos de valores experimentales y los valores teóricos. El valor de distancia entre ambos puntos es llamado residuales, estas tienden a cero según el ajuste del modelo, algunos requisitos para una correcta calibración son: deben ser aleatorios, es decir no deben presentar una tendencia estadística y también presentar una distribución normal.

El modelo de regresión lineal está descrito en una ecuación tipo " $Y = mX + b$ ", donde las variables X e Y son valores de señal y respuesta respectivamente. Adicionalmente, las variables de la ecuación son la pendiente (m) como el grado de inclinación de la línea de calibración y la intersección (b) es el punto de cruce con el eje Y.

2.17. Herramientas estadísticas para la validación

2.17.1. Prueba de normalidad

La distribución normal es una distribución de datos con forma de campana de Gauss, en el medio se tiene la mayor probabilidad de concentración de los datos y esta va disminuyendo a ambos lados según la desviación estándar del grupo. En una distribución de datos normal como en la *Figura 15*, se estima que aproximadamente el 95 % de los datos están en un rango de dos desviaciones estándar de la media aritmética y aproximadamente un 99.7 % de los datos están contenidos en tres desviaciones estándar.

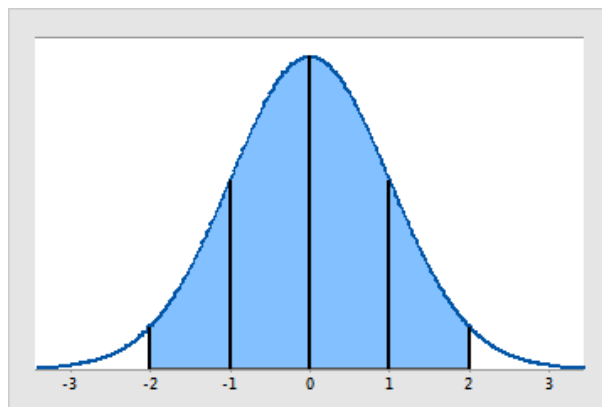


Figura 15. Histograma de una distribución normal, en el eje X se muestra la distribución de datos según su desviación estándar.

La prueba de Anderson-Darling es la más usada para determinar la naturaleza normal de la distribución de un grupo de datos. En esta evaluación se compara una función de distribución experimental acumulada con una distribución normal esperada de referencia, cuando las distribuciones son estadísticamente iguales se concluye que la distribución de datos estudiada es normal y es compatible con las pruebas paramétricas, en caso contrario se deberá utilizar las pruebas no paramétricas para realizar la validación analítica.

En este trabajo nos centraremos en herramientas estadísticas para la validación analítica de un grupo de datos (concentración de analitos) con distribución normal, por ende, todas las siguientes pruebas mostradas son aplicables a datos paramétricos o normales.

El estadístico Anderson-Darling establece que tan normal es distribución de un grupo de datos, cuando mayor sea el valor del *p-value* asociado a la prueba de normalizada, la

distribución de datos será estadísticamente más similar a una distribución normal. Si se ha establecido un nivel de confianza del 95 % para la validación analítica, en caso de obtener un $p\text{-value} > 0.05$ se acepta la hipótesis de distribución normal y se pueden aplicar las pruebas paramétricas.

2.17.2. Prueba de t-student

La prueba estadística de t de 1 muestra consiste en comparar la media aritmética de un grupo de datos versus un valor de referencia, cuando no se conoce la desviación estándar típica del grupo de datos estudiado. Esta prueba es útil para comprobar la veracidad y selectividad en la validación analítica, debido a que se puede comparar la media aritmética de la concentración del analito obtenida en la validación analítica con un material de referencia (un patrón primario del analito estudiado, un análisis externo por un laboratorio acreditado, etc.), también se puede utilizar para comprobar los cambios antes y después de un proceso (la adición de un interferente), dado que la hipótesis es planteada como la igualdad estadística del grupo de datos experimental contra un valor de referencia o valor verdadero llamado media hipotética.

Para la prueba de t de 1 muestra, las hipótesis son las siguientes:

- Hipótesis nula (H_0): $\mu = \mu_0$ La media (μ) es igual a la media hipotética (μ_0).
- Hipótesis alternativa (H_1): $\mu \neq \mu_0$ La media (μ) es diferente a la media hipotética (μ_0).

La prueba estadística de t de 2 muestras consiste en comparar la media aritmética de dos grupos de datos, cuando no se conoce la desviación estándar típica de los grupos de datos estudiados. Esta prueba es útil para verificar la precisión en la validación analítica, debido a que se puede comparar las medias aritméticas de las concentraciones de un mismo analito obtenidas de la validación analítica, provenientes de diferentes fuentes, por ejemplo: diferentes analistas, diferentes equipos de medición o diferentes métodos de análisis. Dado que la hipótesis es planteada como la diferencia estadística de valores de los dos grupos es igual a cero llamado diferencia hipotética.

Para la prueba de t de 2 muestras, las hipótesis son las siguientes:

- Hipótesis nula (H_0): $\mu_1 - \mu_2 = \delta_0$ La diferencia entre las medias ($\mu_1 - \mu_2$) es igual a la diferencia hipotética (δ_0).

- Hipótesis alternativa (H_1): $\mu_1 - \mu_2 \neq \delta_0$ La diferencia entre las medias ($\mu_1 - \mu_2$) no es igual a la diferencia hipotética (δ_0).

Los resultados son mostrados en un rango de valores según el nivel de aceptación, normalmente 95 %, en los cuales deben contener a la media aritmética del grupo de datos y el *p-value* obtenido debe ser mayor a 0.05 para dar por aceptado la hipótesis nula.

Una forma simplificada de interpretar los resultados es con un gráfico de cajas se presenta en la *Figura 16*, en el cual se muestra un resumen de la distribución de datos en cuatro partes equitativas, la caja el 50 % de valores centrales y cada cola el 25 % de valores superiores e inferiores, donde la mitad de la caja representa la media aritmética. Los datos asimétricos, datos fuera del nivel de confianza, deben ser excluidos y el tratamiento estadístico deberá ser nuevamente analizado.



Figura 16. Gráfica de distribución de datos individuales (derecha) y gráfico de caja (izquierda).

2.17.3. Prueba de igualdad de varianzas

La prueba estadística de prueba de igualdad de varianzas consiste en comparar las desviaciones estándar o algún derivado como la varianza o el RSD entre dos o más grupos de datos. En casos específicos para dos grupos de datos, se usa la prueba F de Fisher y en casos de tres o más grupos, se usa la prueba de Bartlett.

Esta prueba es útil para comprobar la precisión en la validación analítica, debido a que se puede comprobar la desviación estándar de los resultados obtenidos en la validación analítica por diferentes fuentes, por ejemplo: diferentes analistas, diferentes equipos de medición o diferentes métodos de análisis, dado que la hipótesis es planteada como el cociente o ratio estadístico de las desviaciones estándar de ambos grupos es igual a uno, llamado relación hipotética.

Para la prueba de igualdad de varianzas las hipótesis son las siguientes:

- Hipótesis nula (H_0): $\sigma_1 / \sigma_2 = \dots = \sigma_1 / \sigma_n = K = 1$ La relación entre la desviación estándar del primer grupo (σ_1) y la desviación estándar del segundo grupo (σ_2) o grupo de n datos (σ_n) es igual a la relación hipotética (K)
- Hipótesis alternativa (H_1): $\sigma_1 / \sigma_2 = \dots = \sigma_1 / \sigma_n \neq K \neq 1$ La relación entre la desviación estándar del primer grupo (σ_1) y la desviación estándar del segundo grupo (σ_2) o grupo de n datos (σ_n) no es igual a la relación hipotética (K).

La prueba de igual de varianzas es aplicable a diferentes cantidades de grupos de datos. La prueba F y la prueba Bartlett son sensibles a cualquier variación en la normalidad de los datos, es decir, cualquier dato atípico puede alterar el estadístico obtenido, debido a ello, existen dos variaciones a la prueba de varianzas, el método de Bonett y el método de Levene. La prueba de Bonett es independiente del tipo de distribución en los datos y la prueba de Levene es más exacta cuando existe asimetría en la distribución o la dispersión de los valores es elevada, ósea tiene más datos en los extremos inferior o superior.

Cuando se calcula la desviación estándar, los resultados de desviación se presentan como un intervalo de confianza o intervalo Bonferroni según un factor específico a un nivel de confianza previamente determinado, usualmente al 95 %. La interpretación de estos resultados consiste en buscar algún solapamiento entre la distribución de datos de los grupos, si existe algún solapamiento se concluye que las desviaciones no son estadísticamente diferentes entre sí, por ende, se acepta la hipótesis nula.

Los resultados son mostrados en un rango de valores según el nivel de aceptación, normalmente 95 %, en los cuales deben contener a la media aritmética del grupo de datos y el *p-value* obtenido debe ser mayor a 0.05 para dar por aceptado la hipótesis nula, en esta prueba estadística se suele comparar los *p-value* obtenidos para la prueba de homogeneidad de varianza o prueba F para el método Bonett y Levene. Para esta prueba estadística también es útil usar el gráfico de cajas con el intervalo de confianza de Bonferroni para comparar la dispersión entre grupos de datos.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología experimental de este capítulo abarca un 70 % de desarrollo experimental del proyecto. Los pasos experimentales de la metodología se presentan en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Resumen de la metodología experimental aplicada durante en el desarrollo, caracterización, optimización y validación del bulk-optodo y nano-optodo.

Desarrollo de los optodos

- Síntesis del bulk-optodo: basado en ionoforo Valinomicina.
- Miniaturización del nano-optodo: formación de micelas estructurales de Pluronic F-127.

Caracterización de los optodos

- Caracterización del bulk-optodo por las técnicas espectroscópicas UV-Vis.
- Caracterización del nano-optodo por las técnicas microscópicas como SEM (Scanning Electron Microscopy) y técnica para medir el tamaño DLS (Dynamic Light Scattering).
- Verificación del Efecto Tyndall en las micelas.

Optimización de los optodos

- Optimización de los bulk-optodos.
 - Composición: Ionoforo (Valinomicina), Intercambiador de Iones (K-TCPB) y Cromoionoforo (CHI).
 - Calibración lineal y rango de trabajo.
 - pH y concentración del buffer.
- Optimización de los nano-optodos.
 - Concentración del surfactante.

Validación de los optodos

- Determinar los parámetros analíticos.
 - Selectividad: Efecto de los interferentes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .
 - Sensibilidad: Límite de detección (LD) y cuantificación (LC).
 - Precisión: Intraensayo e interensayo.
 - Veracidad: Comparación analítica con método de referencia, Absorción Atómica (AA) y electrodo selectivo a iones (ISE).
 - Tiempo de respuesta: estabilidad de la señal analítica.

Aplicación de los optodos

- Aplicación de los nano-optodos en muestras de suelos agrícolas reales.
- Efecto de la iluminación: Dependencia de la iluminación en la cuantificación de color.
- Reversibilidad de los nano-optodos: Reutilización de los nano-optodos.

3.1. Reactivos y materiales

Todos los reactivos de partida se describen en la Tabla 6. Estos se usaron para la síntesis de la fase sensora del bulk-optodo y nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO). Estos reactivos se pueden encontrar en el catálogo de Sigma Aldrich y son importados por Química Service SRL. Todas las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura, que se obtuvo mediante un sistema de purificación de agua de ósmosis inversa Millipore Tipo 1 (18,2 mS/cm). Los reactivos de partida se usaron como llegaron y sin pretratamiento previo.

Tabla 6. Reactivos químicos de partida empleados para la síntesis del bulk-optodo y nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO).

Reactivo		Pureza
Función	Compuesto	
Ionóforo	Ionóforo de potasio I Valinomicina	$\geq 98 \%$ (TLC)
Membrana polimérica	Cloruro de polivinilo de alto peso molecular PVC	Grado ACS
Intercambiador de iones	Tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio	$\geq 98.0 \%$
	Tetrakis [3,5-bis (trifluorometil) fenil] borato de sodio	$\geq 95.0 \%$
Plastificante	Bis (2-etilhexil) sebacato DOS	$\geq 97.0 \%$
Cromoionóforo	Cromoionóforo I 3 – Octadecanoilimino – 7 - (dietilamino) - 1,2 - benzofenoxacina, 9 -(Dietilamino) – 5 - (octadecanoilimino) – 5 H – benzo [a] fenoxacina Azul de Nilo liofilizado ETH 5294	Grado ACS
Solvente orgánico	Tetrahidrofurano THF	$\geq 99.9 \%$
Tampón	Tris(hidroximetil)aminometano TRIS	Grado ACS
	Acetato de sodio trihidrato	
Precursor del cromoionóforo	Cloruro de azul de Nilo	95 %
	Cloruro de estearoilo	97 %
Surfactante	Pluronic F-127	Grado ACS

3.2. Preparación del optodo

3.2.1. Síntesis de la fase sensora del bulk-optodo

Para la síntesis del bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO) se planteó un procedimiento inicial que se optimizó en pasos posteriores. Primero se sintetizó un bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO) que se depositó en una placa de vidrio y se secó hasta la completa fijación.

Un esquema de la síntesis de la fase sensora del bulk-optodo se presenta en la *Figura 17*. Esta síntesis se realizó con 2.7 mg del ionóforo de potasio I: Valinomicina (2.4 μmol), 1.2 mg del intercambiador de iones, la sal lipofílica tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio (2.4 μmol) y 1.4 mg de cromoionóforo I: ETH 5294 (2.4 μmol) y con 160 mg del plastificante DOS y 80 mg de PVC. Todos los componentes se disolvieron en 1.0 mL de THF. La mezcla de componentes del optodo se le denominó cocktail para potasio. La fijación del bulk-optodo en la placa de vidrio de 20 mm x 20 mm con 0.25 mm de espesor se realizó con 20 μL del cóctel y se mantuvo en un ambiente saturado de THF hasta completa evaporación del solvente (Seiler & Simon, 1992). El producto obtenido es una fase sensora de color rojizo o bulk-optodo útil para la medición directa.

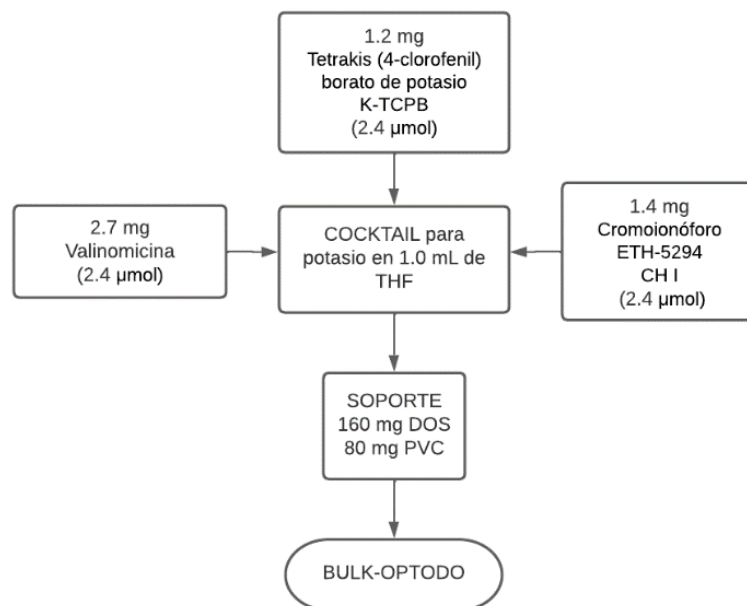


Figura 17. Diagrama experimental de la síntesis de la fase sensora del bulk-optodo.

3.2.2. Síntesis de la fase sensora del nano-optodo

Un esquema de la síntesis del nano-optodo se resume en la *Figura 18*. Esta síntesis se llevó por un proceso de miniaturización del bulk-optodo a nano-optodo. Se utilizó una alícuota de 20 μL del cocktail del bulk-optodo en 2,0 mL de agua ultrapura y 20 mg de Pluronic F-127. Luego se sonicó a 30 °C en un baño maría a una potencia de 70 % de 40 kHz por 60 minutos o hasta una completa disolución de la fase sensora (Xie et al., 2013). En caso de presencia de partículas insolubles es necesario la purificación del nano-optodo a través de la completa eliminación del solvente THF purgándolo con aire comprimido hasta obtener un líquido transparente, seguido de un proceso de centrifugado para eliminar los restos de polímero desprendidos durante la síntesis (Xie & Bakker, 2017).

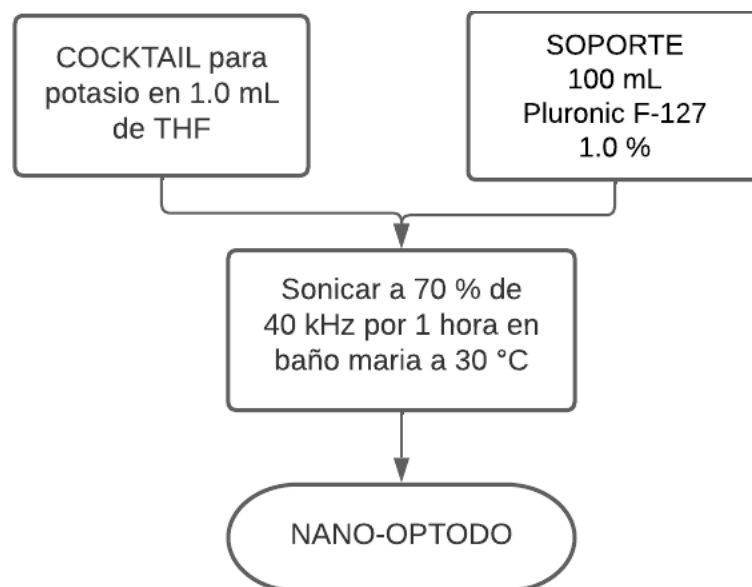


Figura 18. Diagrama experimental de la síntesis de la fase sensora del nano-optodo.

3.3. Caracterización del bulk-optodo y nano-optodo

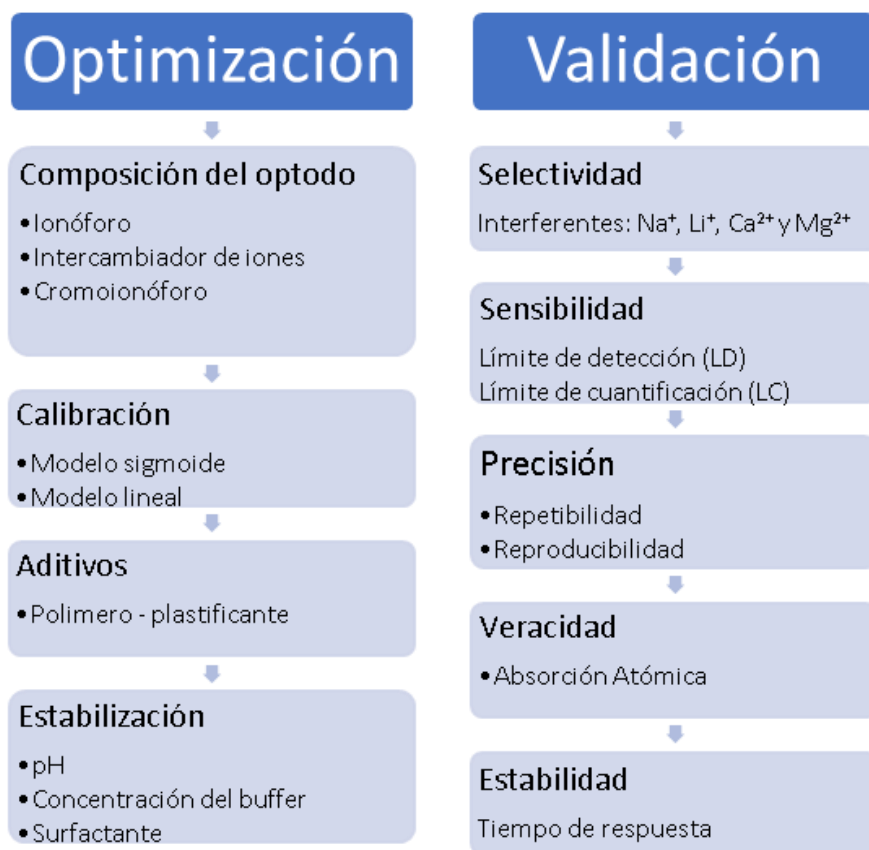
La caracterización del bulk-optodo y nano-optodo se realizó aprovechando los perfiles de absorción del cromoionóforo ETH 5294 con picos máximos de longitudes de onda cercanos a 540 nm para el estado desprotonado del cromoionóforo y picos cercanos a 600 nm y 660 nm para el estado protonado del cromoionóforo (Seiler et al., 1991). En un análisis de barrido desde 400 nm a 800 nm se evaluó el desplazamiento hipsocrómico producido por la desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 desde longitud de onda aproximado desde 660 nm a 540 nm con un punto isobéptico cercano a 580 nm (Bamsey et al., 2012; De Orbe-Payá et al., 2007).

Durante la caracterización estructural, los nano-optodos se sometieron a técnicas de dispersión dinámica de luz (DLS) para estimar las dimensiones de las micelas de Pluronic F-127. Algunas publicaciones con micelas de similares concentraciones, alrededor de 1.0 %, exhibieron un diámetro promedio entre 40 nm a 100 nm (Xie & Bakker, 2017). También, los sensores se caracterizaron por la técnica de Microscopía electrónica de barrido (SEM) para comprobar la forma de la superficie del material y obtener el radio hidrodinámico de las micelas del nano-optodo. Finalmente, se efectuó la comprobación del efecto de Tyndall con el uso de un rayo láser para evaluar la difracción de la luz en soluciones coloidales como los nano-optodos.

3.4. Metodología analítica

La metodología analítica es un proceso de investigación en el cual se verificó la optimización y la validación de las partes del desarrollo de bulk-optodo y nano-optodo que se presenta en forma resumida en la *Tabla 7*. Inicialmente, se determinó el proceso de medición del bulk-optodo y nano-optodo. Explicado como una secuencia de operaciones específicas para llevar a cabo un análisis químico, este proceso es sistemático y secuencial. También se realizó un proceso de optimización, en el cual se analizó los factores que afectan al resultado, en este caso, los factores cruciales que afectan directamente el cambio de color a la fase sensora del optodo. Este análisis consiste en estudiar el efecto de la realización de algún cambio específico sobre las variables experimentales. Además, se evaluaron los resultados obtenidos a través de criterios de aceptación previamente definidos. Este proceso es secuencial y está basado en el diseño experimental.

Tabla 7. Resumen de la metodología experimental aplicada en la optimización y validación del bulk-optodo y nano-optodo.



Finalmente, se realizó un proceso de validación analítica sobre la metodología optimizada basado en normativas internacionales. La selectividad del bulk-optodo y nano-optodo se realizó frente a otros posibles iones interferentes como iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}). La sensibilidad se resolvió al calcular el límite de detección (LD) como la mínima concentración detectable y el límite de cuantificación (LC) como la mínima concentración medible a niveles de precisión aceptable. La precisión en la medición efectuada se analizó en condiciones de repetibilidad, sin cambios durante la medición y en condiciones de reproducibilidad, con algunos cambios durante la medición. La veracidad de los resultados de los nano-optodos es la comprobación de la idoneidad de la metodología analítica por comparación con una metodología de referencia.

3.4.1. Proceso de medición del bulk-optodo

El proceso de calibración del bulk-optodo se realizó con soluciones estándares de potasio entre 1.0 M y 10^{-6} M preparadas en solución tampón de TRIS 20 mM a pH 7.00, valor escogido debido a ser un valor de pH neutro y ser menor al valor del pKa del cromoionóforo ETH 5294 de 8.00 (Xie et al., 2016). Luego se sumergió el bulk-optodo en la solución estándar o solución problema a fin de analizar el cambio de color estable de la fase sensora del bulk-optodo. El cambio y la estabilización del color es rápida, usualmente toma entre dos o tres minutos. La calibración se efectuó a una longitud de onda cercana a 660 nm como longitud de onda teórica, correspondiente con el pico absorbancia del estado desprotonado del cromoionóforo I. Luego se puso la solución de calibración con el bulk-optodo sumergido en la celda de lectura de cuarzo de 10 mm para la medición en un equipo de espectroscopia de UV-VIS en un rango de lectura desde 400 nm a 800 nm.

La fuente de potasio usada es la sal de cloruro de potasio (KCl). Se preparó una solución madre de 1.0 M. Las soluciones estándar de calibración de concentraciones de 1.0 M, 10^{-1} M, 10^{-2} M, 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M y 10^{-6} M de potasio se prepararon a partir de una solución de la solución madre.

Nota: El bulk-optodo es reversible, es decir pueden volver a usarse, para ello se necesitan que los iones potasio (K^+) retenidos en el interior de la fase sensora del bulk-optodo sean expulsados. Después de su uso el sensor se trató con ácido clorhídrico al 10 mM (HCl), luego del cual el color azul inicial regresó para la siguiente medición.

3.4.2. Proceso de medición del nano-optodo

El proceso de calibración del nano-optodo se realizó con soluciones estándares de potasio entre 1.0 M y 10^{-4} M. Entonces se mezcló 2.0 mL del nano-optodo con 0.5 mL de la solución de calibración preparada en buffer TRIS 20 mM de pH 7.00 o en una proporción [4:1] para el nano-optodo y muestra. Luego se midió la absorbancia a longitudes de onda de 660 nm o al valor de máxima absorbancia experimental cercano a 660 nm en la celda de lectura de 10 mm de cuarzo para la medición en un equipo de espectroscopia de UV-VIS en el rango desde 400 a 800 nm.

3.4.3. Optimización del bulk-optodo y nano-optodo

La optimización se repite tanto para el bulk-optodo como para el nano-optodo, este se realizó sobre la propuesta inicial descrita en 3.2.1 Síntesis de la fase sensora del bulk-optodo y 3.2.2 Síntesis de la fase sensora del nano-optodo. El proceso de optimización se realizó a través del diseño experimental sobre las variables críticas, es decir, sobre variables específicas de la metodología analítica que afectan directamente al desempeño final del sensor.

Todos los *tests* de optimización de esta sección se llevaron a cabo de manera ordenada y se aplicaron los cambios de orden superior e inferior sobre las variables, además se evaluaron los resultados obtenidos a través de criterios de aceptación previamente definidos. La optimización se efectuó sobre una variable cada vez, para que los resultados obtenidos sean proporcionales a esa variable específica. Los resultados fueron realizados por triplicado para obtener valores de desviación estándar en la medición.

- Optimización de la calibración del modelo sigmoide y del modelo lineal

El proceso de optimización de la calibración sigmoide se describe en la *Tabla 8*, donde se analizó la correlación entre la actividad del ion potasio (aK^+) como variable independiente en el rango de concentraciones desde 1.0 M hasta 10^{-6} M de potasio en el eje X y el grado de desprotonación del cromoionóforo I o ETH 5294 ($1-\alpha$) como variable dependiente en el eje Y.

Tabla 8. Propuesta de optimización de la curva de calibración del bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la señal de respuesta del eje Y.

Optimización		Calibración		
		Eje X	Eje Y	Criterio de aceptación
Propuesta	1	Actividad de iones potasio entre 10^{-1} M a 10^{-6} M	$1-\alpha$	Coeficiente de correlación $(r) > 0.95$
	2		A_{600} / A_{660}	
	3		A_{540} / A_{660}	
	4		A_{540} / A_{600}	

Todas las mediciones durante la optimización se realizaron a las mismas condiciones de medición en una solución tampón TRIS 20 mM a pH 7.00. Primero se tomó la absorbancia a 660 nm o a la longitud de onda correspondiente al pico representativo a 660 nm de la fase sensora del optodo a diferentes grados de protonación del cromoionóforo ETH 5294. También se analizaron las absorbancias a diferentes longitudes de onda como los picos aproximados a 540 nm para la forma completamente desprotonada del cromoionóforo y a los picos aproximados de 600 nm y 660 nm para la forma completamente protonada del cromoionóforo (Seiler et al., 1991). Luego, se determinó la linealidad de la respuesta del optodo a diferentes condiciones de “ $1-\alpha$ ” para un rango de concentración de potasio. El criterio de aceptación de la calibración del optodo se estimó obteniendo un valor superior a 0.95 de coeficiente de determinación (r^2) a un nivel de aceptación del 95 % (Van Loco et al., 2002). En caso que el modelo de calibración sigmoide no cumpla con los requeridos de linealidad, se planeó la transformación desde un modelo sigmoide a un modelo lineal según la ecuación 10 (ver pág. 51).

- Optimización de la composición del bulk-optodo y nano-optodo

La optimización de la composición del optodo se hizo a través de variar la proporción del ionóforo valinomicina, intercambiador de iones, tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y del cromoionóforo ETH 5294 para obtener una mejor respuesta y mayor selectividad de la fase sensora del optodo a iones potasio, traducido como una mayor amplitud en el cambio de color de la fase sensora del optodo.

El equilibrio iónico dentro de la fase sensora del optodo se debe mantener constante durante el análisis (Du & Xie, 2017), debido a ello, las concentraciones del ionóforo, intercambiador de iones y cromoionóforo son iguales, es decir $C_I = C_S = C_C$. La propuesta inicial contempla concentraciones de 2.4 μM del ionóforo valinomicina, intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y cromoionóforo ETH 5294, durante la optimización se varió en proporciones sobre la composición inicial según la *Tabla 9*.

Tabla 9. Propuesta de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la proporción de las concentraciones del ionóforo valinomicina, intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y cromoionóforo ETH 5294.

Optimización		Proporción	Ionóforo Valinomicina	Intercambiador de iones Tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio	Cromoionóforo ETH 5294	Criterio de aceptación
		[I : S : C]				
Propuesta			Concentración (μmol.L ⁻¹)			
Variación del ionóforo	1	1:1:1	2.43	2.42	2.40	Comparación gráfica con la curva sigmoide teórica
	2	2:1:1	4.86	2.42	2.40	
	3	3:1:1	7.29	2.42	2.40	
Variación del intercambiador de iones	1	1:1:1	2.43	2.42	2.40	
	2	2:2:1	4.86	4.84	2.40	
	3	3:3:1	7.29	7.26	2.40	
Variación del cromoionóforo	1	1:1:1	2.43	2.42	2.40	
	2	2:2:2	4.86	4.84	4.80	
	3	3:3:3	7.29	7.26	7.20	

Los valores de constante de equilibrio del complejo ion potasio-valinomicina, $K_e^{KI^+}$ se determinaron con los datos experimentales por el ajuste de mínimos cuadrados para la zona central de la curva sigmoide de la actividad del ion potasio (aK^+) y “1 - α ” (Capitán-Vallvey et al., 2002). El criterio de aceptación de la optimización de la calibración se evaluó por comparación gráfica con la curva sigmoide teórica del optodo según la *ecuación 9* (ver *pág. 51*).

- Optimización de la proporción del polímero

El polímero PVC y el plastificante DOS son los componentes estructurales del bulk-optodo, que dan soporte a los componentes activos del optodo para que interactúe directamente el analito como el ionóforo. El soporte estructural también actúa como barrera

lipofílica e impiden la disolución de los componentes activos del optodo al medio acuoso de la solución problema.

El policloruro de vinilo (PVC) es el polímero más usado, por las excelentes propiedades inertes frente a medios abrasivos, es estable y de bajo costo. El uso de aditivos como estabilizantes o plastificantes puede modificar las propiedades físicas del material como la rigidez o flexibilidad del polímero para diversas aplicaciones. La homogeneidad estructural de la superficie de la fase sensora del optodo se evaluó a una concentración intermedia de 10^{-3} M de potasio. La proporción inicial contempló cantidades de 80 mg de PVC. Durante la optimización se modificaron las proporciones de polímero PVC y del plastificante DOS según la *Tabla 10*. La proporción idónea entre el plastificante y el polímero PVC se mantuvo en 2:1 para aplicaciones en optodos (Lapresta Fernández, 2007).

Tabla 10. Propuesta de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la proporción del polímero PVC y plastificante DOS.

Optimización		Polímero PVC	Plastificante DOS	Criterio de aceptación
		Cantidad (mg)		
Propuesta	1	40	80	Evaluar la homogeneidad de la fase sensora del optodo
	2	80	160	
	3	120	240	
	4	160	320	

- Optimización de la proporción del plastificante

El plastificante DOS disminuye la viscosidad del polímero y aumenta la homogeneidad de la fase sensora del optodo, en consecuencia, mejora la transferencia de iones potasio (K^+) desde la solución analito a la fase sensora del optodo (Konstantin N., 2013). La homogeneidad estructural de la superficie de la fase sensora del optodo se evaluó a una concentración intermedia de 10^{-3} M de potasio. La proporción inicial del plastificante se propuso en 160 mg de DOS y 80 mg de PVC. Las propuestas de variantes de la cantidad de plastificante DOS y PVC, que se testearon con fines de optimización, se presentan en la *Tabla 11*.

Tabla 11. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando el contenido másico del plastificante DOS y del polímero PVC.

Optimización		Polímero PVC	Plastificante DOS	Criterio de aceptación
		Cantidad (mg)		
Propuesta	1	80	80	Evaluar la homogeneidad de la fase sensora del optodo
	2	80	120	
	3	80	160	
	4	80	200	
	5	80	240	

- Optimización del valor de pH y de la concentración del buffer

Para seleccionar el valor de pH de trabajo adecuado se puede partir del valor teórico de pKa del cromoióforo ETH 5294 de 8.00 (Xie et al., 2016). El buffer tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) tiene un pKa de 8.06 (Buckemaier et al., 2003), con una capacidad amortiguadora de pH entre 7.0 y 9.2 al adicionar soluciones diluidas de ácido clorhídrico (HCl). Otro buffer útil es el acetato de sodio (CH_3COONa) con un pKa de 4.75 (Kuo et al., 2016), con una capacidad amortiguadora de pH entre 5.0 y 6.8 al adicionar soluciones diluidas de ácido acético (CH_3COOH). Los diferentes valores del pH del buffer con una concentración de 20 mM se muestran en la *Tabla 12*, donde la constante de equilibrio del optodo ($K_e^{\text{K}^+}$) para cada valor de pH se determinó a partir de la curva sigmoide de la actividad del ion potasio ($a\text{K}^+$) y de “1- α ”. También se evaluó la concentración del buffer para el valor de pH previamente optimizado. Los valores de pH del buffer y de las concentraciones del buffer evaluadas con fines de optimización se muestran en las *Tabla 13* y *Tabla 14*, respectivamente.

Tabla 12. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando el valor de pH del buffer.

Optimización	Valor de pH	Buffer	Criterio de aceptación
Propuesta	1	pH 5.0	Evaluar el sesgo de las curvas sigmoides
	2	pH 6.0	
	3	pH 7.0	
	4	pH 8.0	
	5	pH 9.0	

Tabla 13. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la concentración del buffer.

Optimización	Valor de pH	Concentración del buffer (M)	Criterio de aceptación
Propuesta	1	7	Comparación gráfica con la curva sigmoideal teórica
	2	7	
	3	7	
	4	7	

Para una concentración del buffer muy baja (<0.10 M), la capacidad amortiguadora del buffer fue insuficiente para tamponar el pH de la solución problema de iones potasio y para concentraciones elevadas del buffer (>0.40 M), el nivel de ruido analito se incrementó y produjo interferencia en las mediciones para las concentraciones de iones potasio.

- Optimización de la cantidad del surfactante

El surfactante Pluronic F-127 es un compuesto anfifílico o anfipático con dos extremos hidrofílicos de polietilenglicol (PEG) y una zona central hidrofóbica de poli óxido de propileno (PPO) en su estructura química. La parte hidrofóbica es capaz de encapsular a los componentes orgánicos del optodo disueltos en THF y formar interfases orgánicas en medios acuosos formando una emulsión debido a la parte hidrofílica del surfactante.

La formación del nano-optodo se realizó por métodos de dispersión del bulk-optodo mediante generadores de ultrasonido de alta energía (Pratap-Singh et al., 123 C.E.). La formación de una emulsión conformada de micelas esféricas está estabilizada por el surfactante Pluronic F-127 para prevenir la aglomeración (Sahu et al., 2011). La cantidad del surfactante Pluronic F-127 está relacionado con el tamaño de las micelas. Los tamaños promedio obtenidos por estos procedimientos son entre 40 nm y 100 nm (Xie & Bakker, 2017).

La cantidad inicial propuesta de surfactante Pluronic F-127 fue de 10 mg para formar el nano-optodo y las variaciones de la cantidad de surfactante se muestran en la Tabla 15.

Tabla 14. Propuestas de optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO), variando la cantidad del surfactante Pluronic F-127.

Optimización	Cantidad de optodo (μL)	Cantidad de Pluronic F-127 (mg)	Criterio de aceptación
Propuesta	1	10	Evaluar la dispersión y el tamaño del nano-optodo
	2	20	
	3	30	
	4	40	

3.4.4. Validación de la metodología analítica

La validación analítica del optodo se desarrolló según guías normativas internacionales (Eurolab España Eurachem, 2016) y se aplicó sobre la metodología previamente optimizada.

- Selectividad

La selectividad analítica de un sensor químico es la capacidad de no alterar la señal de respuesta de un analito específico en presencia de otros analitos independientes conocidos como interferentes (Comité conjunto para las guías en metrología, 2012). Una característica importante de los optodos es una elevada selectividad analítica a sus respectivos iones objetivos (Dekina et al., 2018; H. Li et al., 2017; MacKinnon, 2003; Mistlberger et al., 2014).

La estequiometría del complejo ion-ionóforo valinomicina es dependiente del tamaño y valencia de los iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}) (Dybal et al., 2009, 2010; Ehala et al., 2009). La evaluación de la selectividad se describe en la *Tabla 15*, en la cual se añadió la concentración de interferentes como los iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}) a una solución estándar de potasio y se comprobó que la señal de respuesta a iones potasio (K^+) no varíe significativamente. También se probó la selectividad a iones plata (Ag^+) debido a que durante el proceso de reversibilidad se agregó cloruro de plata (AgCl). Se consideró como criterio de aceptación no sobrepasar la

variabilidad teórica a cada nivel de concentración de potasio establecida por el $RSD_{Horwitz}$.

Los principales interferentes que se analizaron para este optodo selectivos a iones potasio (ISO) fueron los iones alcalinos y alcalinos térreos, debido a que pertenecen a la misma familia química del potasio y pueden competir por los sitios de complejación con el ionóforo valinomicina. Ciertas características pueden afectar la respuesta del optodo en presencia de iones interferentes diferentes al ion potasio objetivo, por lo que se mantuvieron constantes los parámetros analíticos como la fuerza iónica del medio, la concentración del buffer tampón y el valor del pH del buffer.

Tabla 15. Validación metodológica de la selectividad del optodo selectivo a diferentes concentraciones de iones potasio (ISO) frente a otros cationes interferentes.

Validación	Selectividad				
	Ion Interferente	Concentración de potasio interferente (J^+) (M)			Criterio de aceptación
Propuesta	Na^+	10^{-4}	10^{-2}	1.0	RSD Horwitz para: $10^{-4} = \pm 8\%$ $10^{-2} = \pm 4\%$ $1.0 = \pm 2\%$
	Li^+				
	Ca^{+2}				
	Mg^{+2}				
	$Na^+ - Li^+ -$ $Ca^{+2} - Mg^{+2}$				
	Ag^+				

En la *Tabla 16* se presenta la evaluación metodológica de la selectividad del optodo a iones potasio mediante el cálculo de la constante de formación del complejo ion interferente y del ionóforo valinomicina ($K_e^{Mi-K^+}$), donde el metal interferente (M_i) representa a los iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}) para todo el rango de trabajo previamente establecido. Esta constante de formación de complejo frente a iones interferentes es llamada, coeficiente de selectividad ($k_{K^+-J}^{opt}$), donde J son los interferentes como iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{+2}) y magnesio (Mg^{+2}). Este coeficiente de selectividad se usó para evaluar el grado de desviación de la concentración de

potasio en presencia de los iones interferentes. Este coeficiente se calculó por la distancia horizontal o sesgo entre las curvas sigmoides de K^+ e interferente a un nivel de $\alpha = 0.5$ (Morf et al., 1990; Phichi et al., 2020). La interpretación de una constante de selectividad igual a 1.0 de una concentración de iones interferentes es que da una señal analítica equivalente a un 10 % de la concentración de potasio y para valores de coeficiente de selectividad mayores a 1.0, la interferencia es menor. Por ende, el criterio de aceptación es que los coeficientes de selectividad de los interferentes sean mayores a 1.0 en todo el rango de concentraciones potasio del bulk-optodo y nano-optodo.

Tabla 16. Validación metodológica de la selectividad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) frente a otros cationes interferentes.

Validación	Selectividad							
	Interferente	Concentración del interferente (M)						Criterio de aceptación
Propuesta	1	Na^+						Sesgo de las curvas sigmoides a $\alpha = 0.5$ Rango de bulk-optodo: 10^{-6} - 1 M Rango de nano-optodo: 10^{-4} - 1 M
	2	Li^+						
	3	Ca^{+2}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	
	4	Mg^{+2}						

- Sensibilidad

La sensibilidad analítica de un sensor químico es la relación entre un pequeño cambio de concentración del analito y su correspondiente variación de la señal analítica. Un requisito de la sensibilidad es que esta relación debe ser lo suficientemente grande para no confundirse con el ruido analítico (Comité conjunto para las guías en metrología, 2012). La estimación de la sensibilidad analítica se realizó a partir de la desviación estándar de muestras blanco o estándares de muy baja concentración de potasio. La evaluación de la sensibilidad incluyó la estimación del límite de detección (LD) definido como la menor cantidad de analito potasio, cuya señal puede distinguirse del ruido analítico. También se determinó el límite de cuantificación (LC) definido como la menor cantidad de potasio con niveles de precisión aceptables para poder distinguirse de los blancos analíticos. El LD y LC se calcularon según se presenta en la *Tabla 17*.

Tabla 17. Estimación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) del optodo selectivo a iones potasio (ISO).

Validación	Sensibilidad	
Un nivel de concentración cercano al blanco reactivo 10^{-6} M (bulk-optodo) y 10^{-4} M (nano-optodo) de potasio	10 repeticiones y estimar la desviación estándar (σ) de la concentración de potasio	Criterio de aceptación
		Límite de detección (LD)
		$LD = 3 \times \sigma$
		Límite de cuantificación (LC)
		$LC = 10 \times \sigma$

- Precisión

La precisión analítica durante la medición de un analito objetivo se puede definir por la capacidad de repetibilidad y reproducibilidad del sistema de medición. Las condiciones de repetibilidad de medición son: el mismo procedimiento de medida, los mismos analistas, las mismas condiciones de operación y lugar de trabajo, en un periodo de tiempo corto y las condiciones de reproducibilidad de medición son: un diferente procedimiento de medida, diferentes analistas, diferentes condiciones de operación y lugar de trabajo, en días diferentes de medición (Comité conjunto para las guías en metrología, 2012). La verificación de la repetibilidad y reproducibilidad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) se describe en la *Tabla 18*, en la cual, las mediciones de repetibilidad se hicieron sobre un mismo optodo y las mediciones de reproducibilidad fueron sobre diferentes optodos. Además, el criterio de aceptación se verificó a partir del cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) de las mediciones del optodo a tres niveles de concentración de potasio y se compararon con el valor de RSD Horwitz teóricos (Horwitz & Albert, 2006).

Tabla 18. Validación metodológica de la precisión de repetibilidad y reproducibilidad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) para tres niveles de concentración de potasio de 1.0 M, 10^{-3} M y 10^{-6} M para el bulk-optodo y de 1.0 M, 10^{-2} M y 10^{-4} M para el nano-optodo.

Validación	Precisión		
	Repetibilidad Mismo analista	Reproducibilidad Diferente analista	Criterio de aceptación
	Tres niveles de concentración		La desviación estándar relativa (RSD) no debe ser mayor al RSD de Horwitz
Bulk-optodo	1.0 M, 10 ⁻³ M y 10 ⁻⁶ M de potasio		
Nano-optodo	1.0 M, 10 ⁻² M y 10 ⁻⁴ M de potasio		

- Veracidad

La veracidad analítica se describe como la proximidad entre el promedio de los resultados obtenidos por un sistema de medición y un valor de referencia obtenido por otro método analítico (Comité conjunto para las guías en metrología, 2012).

La veracidad analítica del optodo selectivo a iones potasio (ISO) se comprobó por comparación de los resultados analíticos del optodo con una metodología de referencia. Los métodos de referencia más usados son la espectroscopia de absorción atómica (AA) o espectroscopia de plasma de acoplamiento inductivo con emisión óptica o masas (ICP-OES / ICP-MS), el análisis de la veracidad se describe en la *Tabla 19*.

Tabla 19. Validación metodológica de la veracidad del optodo selectivo a iones potasio (ISO) por comparación con la espectroscopia de absorción atómica (AA) y el electrodo selectivo a iones (ISE).

Validación	Veracidad	
	Inicial	Criterio de aceptación
Concentración 10^{-3} M de potasio	Método de referencia: Espectroscopia de absorción atómica (AA) Electrodo selectivo a iones (ISE)	El valor de las concentraciones de ambos métodos debe ser estadísticamente iguales en una prueba de t-student de dos colas
	Método propuesto: Optodo selectivo a iones potasio (ISO)	

- Tiempo de respuesta

El tiempo de estabilización es el tiempo máximo de contacto entre el optodo y una solución de potasio, durante el cual, el color de la fase sensora se mantiene estable. Para el bulk-optodo se calculó la variabilidad de la señal analítica por un intervalo de tiempo de hasta 2 horas después de desarrollado el color, no se analizó el cambio en la señal analítica por más tiempo, debido a la poca homogeneidad de la fase sensora del bulk-optodo como se explicó anteriormente, debido a la solubilidad parcial del soporte polimérico PVC con el plastificante DOS en el medio acuoso de la muestra problema. Para el nano-optodo se calculó la variabilidad de la señal analítica por un intervalo de tiempo de hasta 48 horas después de desarrollado el color. La ampliación en la estabilidad de la señal analítica se explicó por la elevada homogeneidad de la fase sensora del nano-optodo, debido a no tener un soporte polimérico plastificado y al estabilizador de superficie pluronic F-127, responsable de contener y aislar a la fase orgánica del nano-optodo del medio acuoso.

El tiempo necesario hasta la estabilización de la señal analítica del optodo se estimó por mediciones periódicas del mismo optodo según la Tabla 21. Este procedimiento es necesario para estimar el tiempo en el cual aparecen los errores aleatorios en la medición del optodo. Los efectos externos como la humedad de la fase sensora del optodo, la temperatura del ambiente y fuentes de luz externa pueden producir la descomposición de los componentes activos del optodo.

Tabla 20. Validación metodológica del tiempo de respuesta del optodo selectivo a iones potasio (ISO) por mediciones a diferentes intervalos de tiempo.

Validación		Tiempo de vida		
		Tiempo	Unidades	Criterio de aceptación
Propuesta	Bulk-optodo: 1.0 M, 10 ⁻³ M y	15	minutos	El valor absoluto de concentración no supere la máxima tolerancia del RSD _{Horwitz}
		30		
	10 ⁻⁶ M de potasio Nano-optodo: 1.0 M, 10 ⁻² M y	1	horas	
		2		
		3		
		6		
		8		
		24		
		48		

El criterio de aceptación se evaluó a partir de la variación de la señal analítica a través del tiempo para tres niveles de concentración de potasio de 1.0 M, 10^{-3} M y 10^{-6} M para el bulk-optodo y de 1.0 M, 10^{-2} M y 10^{-4} M para el nano-optodo. Para cada nivel de concentración de potasio se estableció un rango de aceptación según la tolerancia del $RSD_{Horwitz}$, entonces, cuando una medición a un tiempo determinado no cumpla con este criterio de aceptación, se alcanzó el tiempo de vida máxima del optodo para dicha concentración de potasio.

3.5. Aplicabilidad a sistemas portátiles basado en captura de imágenes

En este trabajo se desarrolló de un sensor óptico (optodo) basado en el ionóforo valinomicina y el cromoionóforo ETH5294 para aplicarse en la medición del analito ion potasio con un sistema de detección del color de la fase sensora del optodo a partir de la captura de imágenes con una cámara digital de 5 megapíxeles (MP) y para el procesamiento de señal en un espacio de color RGB, usando un transductor de señal tipo ordenador de placa simple (SBC) *Raspberry Pi 4 B*. El esquema del dispositivo de captura de imágenes se presenta en la *Figura 19*, siendo compatible con la mayoría de las cámaras que actualmente existen en el mercado, capaces de obtener el cambio de color relativo según el grado de desprotonación del cromoionóforo I a partir de las señales del color en el espacio RGB de la fase sensora del optodo.

Los equipos de captura de imagen como cámaras fotográficas, cámaras de teléfonos

inteligentes o *smartphone* no tienen la capacidad de controlar parámetros como la intensidad en la luz de fondo y ajustes en el lente de la cámara como la sensibilidad espectral y las correcciones gamma (Fernandes et al., 2020). También las especificaciones técnicas de las cámaras digitales no son iguales entre diferentes modelos y fabricantes, entonces el uso de cámaras digitales puede generar poca reproducibilidad en la detección del color (Tiuftiakov et al., 2021). Para solventar esta limitante, en este trabajo se planteó un sistema de detección de color que no dependa de los parámetros externos, entonces se propuso un sistema de corrección de color a partir de dos patrones de color, uno de color negro equivalente a (0,0,0) en el espacio de color RGB y otro de color blanco de (255,255,255) en el espacio RGB. Este ajuste vectorial del color permite corregir la variabilidad en la detección del color de la fase sensora del optodo, logrando así, un sistema de medición de color independiente de factores externos como la luz o la resolución de la cámara.

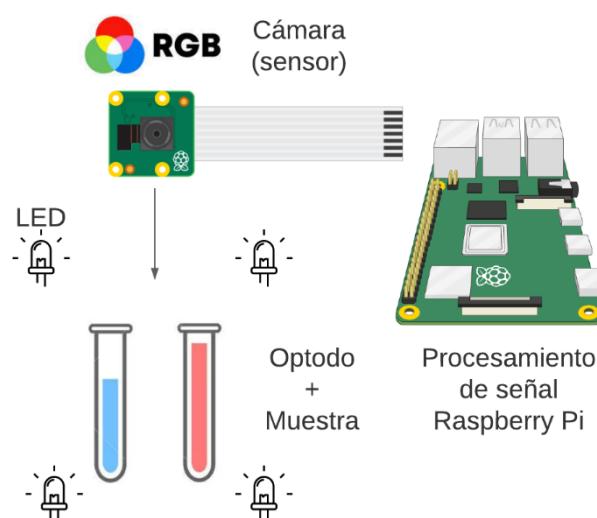


Figura 19. Diagrama de dispositivo de captura de imágenes por una cámara digital de 5 MP (sensor) y el procesamiento de la señal con un ordenador de placa simple (SBC) *Raspberry Pi* 4 B y una fuente de luz LED SMD 5050.

El proceso de captura de imágenes, conversión a imágenes digitales y detección del color se realizó por un proceso simple y rápido. Algunos parámetros se controlaron como las fuentes de luz externas para minimizar la variabilidad durante el proceso de medición (G. Chen et al., 2019), también se usó una celda de medición cerrada para aislar a las muestras de los factores externos que pueden alterar los resultados analíticos. La eficacia del nuevo

sistema de medición por cámaras digitales se puede evaluar mediante la comparación entre las curvas de calibración sigmoide obtenidas mediante la metodología clásica de espectrofotometría UV-Vis y mediante los colores obtenidos de las imágenes RGB por el tratamiento de señal con el *Raspberry Pi*.

Se puede usar la *ecuación 11* (ver pág. 52) para calcular el grado de desprotonación del cromoforo del optodo “ α ” para obtener la concentración del analito objetivo. Esta ecuación es derivada de la ley de Lambert-Beer, donde la señal colorimétrica es tomada de los valores de color del espacio RGB. Para el cálculo de “ α ” se forzó estados de protonación del cromoforo I (ETH 5294), para la completa protonación se utilizó HCl 10 mM y para la desprotonación se utilizó buffer TRIS 0.2 M pH 7.0. Durante el tratamiento de la señal, la señal óptica pasa por una transformación de la información, inicialmente la señal es el color de la fase sensora del optodo proporcional a la concentración del analito objetivo, el transductor de señal modifica la información a un lenguaje fácilmente entendible, como el espacio de color RGB y luego con el uso de la *ecuación 15* (ver pág. 60), se obtiene un valor “ α ”, esta señal es fácilmente comparable entre sistemas de medición.

3.5.1. Proceso de captura de imágenes

Las condiciones de captura de imágenes fueron usando un ordenador de placa simple (SBC) *Raspberry Pi 4 B* (Raspberry Pi Foundation, Cambridge, England, United Kingdom) con una cámara digital de 5 MP a unos 10 cm de distancia en forma perpendicular de la zona de ubicación de la muestra y una fuente de luz LED SMD 5050 de 7.5 watts de potencia y 585 lúmenes de intensidad de luz para el color blanco, ubicados alrededor de la muestra en forma de cuadrado a unos 8 cm de distancia de la cámara digital.

Durante las primeras experiencias se observó que los colores en el espacio RGB son altamente sensibles a la iluminación, por ende, para disminuir la variabilidad en la señal, se controló la intensidad de la luz de la fuente LED y además se calibró el color con dos estándares de color negro de valor (0,0,0) y color blanco de valor (255,255,255) en el espacio RGB. El proceso de calibración de color se realizó con dos estándares de color, primero se utilizó una superficie de color negro (RGB = 0,0,0), se desplazó los valores experimentales obtenidos hasta obtener los valores de referencia. Luego se utilizó una superficie de color blanco (RGB = 255,255,255), se normalizó los valores experimentales obtenidos hasta obtener los valores de referencia, según la *ecuación 17*.

$$\text{RGB}_{\text{CORREGIDO}} = (\text{RGB}_{\text{EXP}} - \text{C}_{\text{Negro}}) \frac{255}{\text{C}_{\text{Blanco}} - \text{C}_{\text{Negro}}} \quad (16)$$

Donde:

Color_{CORREGIDO RGB} Valor de color en el espacio RGB corregido (real).

Color_{EXP RGB} Valor de color en el espacio RGB inicial (experimental).

Color_{Blanco} Valor de color blanco en el espacio RGB inicial (experimental).

Color_{Negro} Valor de color negro en el espacio RGB inicial (experimental).

3.5.2. Cuantificación de potasio en suelos

Inicialmente se realizó un proceso de calibración similar a la sección 3.4.2 Proceso de medición del nano-optodo. El proceso de medición del nano-optodo se realizó con 2.0 mL del nano-optodo y 0.5 mL de la solución problema en buffer TRIS 20 mM de pH 7.00. Luego con el uso del dispositivo de medición Raspberry pi se tomó una fotografía a los 15 minutos de inicio el contacto del nano-optodo con la muestra, se usó un área aproximada de 50 x 50 píxeles (equivalente a un cuadrado de 0.42 cm²) para calcular el color promedio en el espacio de color RGB.

El proceso de calibración del nano-optodo se realizó con soluciones estándares de potasio en un intervalo entre 10⁻¹ M y 10⁻⁵ M. Para la cuantificación de las muestras de suelos contenidas en las disoluciones acuosas de buffer TRIS 20 mM de pH 7.0, se mezcló 2.0 mL del nano-optodo con 0.5 mL de la muestra en buffer TRIS 20 mM de pH 7.00 o en una proporción [4:1] para el nano-optodo y muestra. Luego se midió el color en el espacio RGB a través de la captura de imagen con la cámara digital. Entonces se midió los colores individuales rojo, verde y azul del espacio RGB y se calculó la variable “α” de la ecuación 15 (*ver pág. 60*) para realizar la curva de calibración lineal en todo el rango de trabajo de potasio.

3.5.3. Efecto del color de la fuente de luz

Se ha mencionado anteriormente la dependencia de la iluminación en las propiedades colorimétricas (H. Li et al., 2013), por ende, durante el proceso de captura de color de imágenes digitales se mantuvo controlado la fuente de luz LED.

En un proceso de medición portátil, es complicado controlar factores externos como

la luz ambiental, entonces se probó la variabilidad del color en señal RGB bajo distintos tipos de fuente de luz LED. Los colores estudiados son descritos en la *Tabla 21* y las características fueron obtenidas de la ficha técnica de las luces LED. Se realizó curva de calibración de K^+ para el nano-optodo siguiendo los pasos descritos en 3.4.2. Proceso de medición del nano-optodo y se realizó las mediciones con el dispositivo de captura de imágenes Raspberry-pi.

Tabla 21. Características técnicas de las luces LED SMD-5050.

Color	λ (nm)	Señal RGB	Intensidad de luminosidad Mili-candela (mcd)
Rojo (R)	620-625 nm	(255,0,0)	160-280
Verde (G)	520-525 nm	(0,255,0)	450-756
Azul (B)	460-465 nm	(0,0,255)	115-208
Blanco	3 LEDs RGB	(255,255,255)	-
Amarillo	590-595 nm	(255,255,0)	-
Magenta	395-400 nm	(255,0,255)	-

3.5.4. Reversibilidad de la fase sensora del nano-optodo

Debido a la naturaleza estructural del nano-optodo, la solución acuosa que contiene los iones potasio y las micelas de la fase sensora orgánica están en una misma fase acuosa. Su separación física-química es complicada y no ha sido estudiada. Entonces se planteó el uso de un compuesto químico para la precipitación de los iones potasio, permitiendo la liberación del ionóforo valinomicina y su posterior reutilización del nano-optodo. La formación de un complejo de potasio de mayor estabilidad que el complejo valinomicina-potasio ha sido estudiado. La literatura ha mostrado que el ion tetrafenilborato (TP_4B^-) es capaz de enlazarse a iones potasio y formar un precipitado blanco insoluble, incluso a concentraciones relativamente bajas (10^{-4} M) (Crane, 1956). El proceso de precipitación es optimizado incluyendo un agente precipitante como cloruro plata ($AgCl_3$) para lograr una mejor separación del precipitado y para eliminar el exceso de iones tetrafenilborato. Por ende, se propuso un proceso de formación de un precipitado y separación física mostrado en la *Figura 20*, partiendo del nano-optodo (2 mL) en contacto con la solución acuosa que contiene potasio (0.5 mL). Las condiciones de medición deben ser controladas después del proceso de recuperación del nano-optodo, como el valor del pH= 7.0, que son verificados.

El control de pH se realizó con ayuda del buffer TRIS. Así mismo, el volumen total debe ser igual antes y después del proceso de reversibilidad, dado que las propiedades colorimétricas son dependientes del volumen final (2.5 mL). La adición de los agentes precipitantes aumenta el volumen final y los procesos de centrifugación y sonicación por ultrasonido puede disminuir el volumen, entonces se debe agregar agua ultrapura (H_2O_{UP}) o evaporar el líquido hasta recuperar el volumen final.

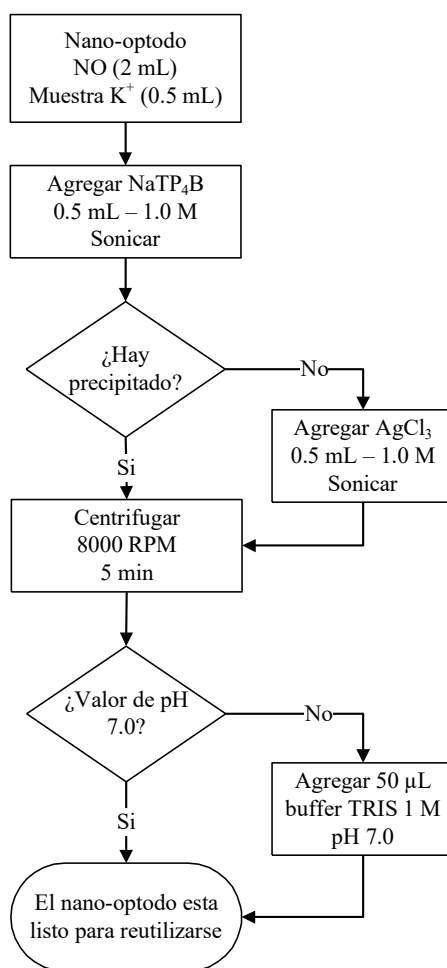


Figura 20. Diagrama experimental del testeo del proceso de reversibilidad del nano-optodo.

3.6. Muestreo y extracción de potasio de los suelos

El muestreo se realizó durante las fechas 29-30/07/2023. Se tomaron muestras de suelos en 2 ubicaciones diferentes (2 granjas) mostradas en la Tabla 22 y la *Figura 21*. Las granjas se eligieron por el fácil acceso a la ubicación y disponibilidad de la información

brindada por los dueños, incluyendo muestreo, tipo de cultivo y prácticas agrícolas. Las muestras fueron obtenidas en la etapa reproductiva del cultivo, correspondiente al crecimiento y maduración del producto alimentario.

Nota: Los suelos de las granjas no son homogéneas, las zonas de muestreo elegidas fueron en las cuales la planta estaba completamente desarrollada.

Tabla 22. Caracterización física de las granjas usadas para los muestreos de suelos.

Granja	Tamaño (hectareas)	Localidad	Coordenadas	Textura del suelo	Tipo de practica	Cultivo	Tratamiento	Rendimiento
Fundo El Tambo	5.7	Canta	Lat. -11.4773 Long. -76.6343	Franco Arenoso	Arado	Brocoli	Pesticida I y II	Aprox. 10-14t/ha
Fundo Tunapis	2.8	San Buena Ventura	Lat. -11.4875 Long. -76.6591	Franco Arcillo Arenoso	Barrena	Alfalfa	Estiercol	Aprox. 20t/ha



Figura 21. Mapas de las zonas agrícolas de a) Fundo El Tambo y b) Fundo Tunapis.

El muestreo se realizó según indicaciones de Estándares de Calidad Ambiental (ECA) (Ministerio del Ambiente -Perú, 2014), en el cual se tomó dos profundidades diferentes de las muestras de suelos (horizontes) de las muestras de cada granja. Uno a 0-30 cm y el otro a 30-60 cm de profundidad como se muestra en la Figura 22. Se tomaron 5 puntos de muestreo en cada ubicación para cada profundidad, separadas aproximadamente 1 m, formando una equis (cuatro esquinas más un punto central) y se mezclaron para formar

una muestra uniforme a la profundidad dada. Las muestras se tomaron usando una barrena y se mezclaron antes de transferirlas a una bolsa de plástico, se etiquetaron y se guardaron en una bolsa portátil para preservar las muestras hasta llegar al laboratorio de análisis (UNI).



Figura 22. Ubicaciones de muestreo en granjas locales del Canta-Lima.

Las muestras de suelos se secaron a una temperatura de 75 °C, según Figura 23, hasta peso constante (mínimo por 24 horas), luego se extrajo manualmente objetos extraños como piedras (gravas), residuos de raíces o materia orgánica. Finalmente, las muestras se molieron con un mortero de porcelana y se tamizó con el tamiz malla N° 100 (ASTM E11) de 203

mm (8 in) de diámetro con una malla de acero inoxidable con aberturas de 150 µm.

La extracción de los iones potasio, se realizó en una proporción de 1:5, es decir, se pesó 20 g de muestras preparadas y se añadió 100 mL de buffer TRIS 20 mM de pH 7.0 en frascos de tapa, se mezcló en un agitador magnético a 800 RPM durante 24 horas, se transvasó el líquido sobrenadante a tubos de centrifuga de 50 mL y se centrifugo a 4000 RPM por 20 minutos. El líquido sobrenadante contiene los iones de potasio, se filtró al vacío con un filtro Whatman N.º 42, algunas partículas probablemente serán lo suficientemente pequeñas que pasarán al filtro, entonces se filtró a través de un filtro de nailon de 0.45 µm. Estos extractos fueron estables por 48 horas, después de ese tiempo se requirió una filtración adicional.

Nota: Los extractos deben almacenarse refrigerados antes de su uso en ambientes de 4° C de temperatura.

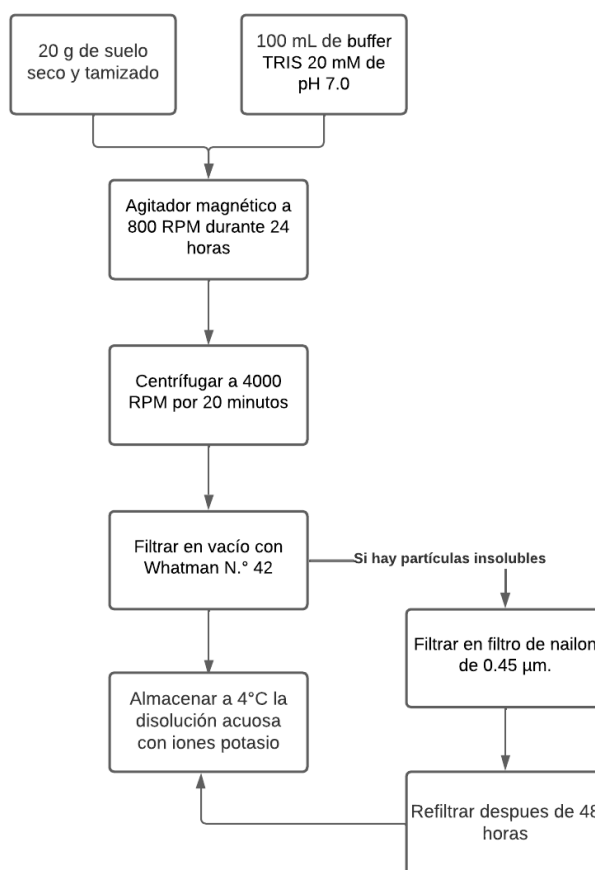
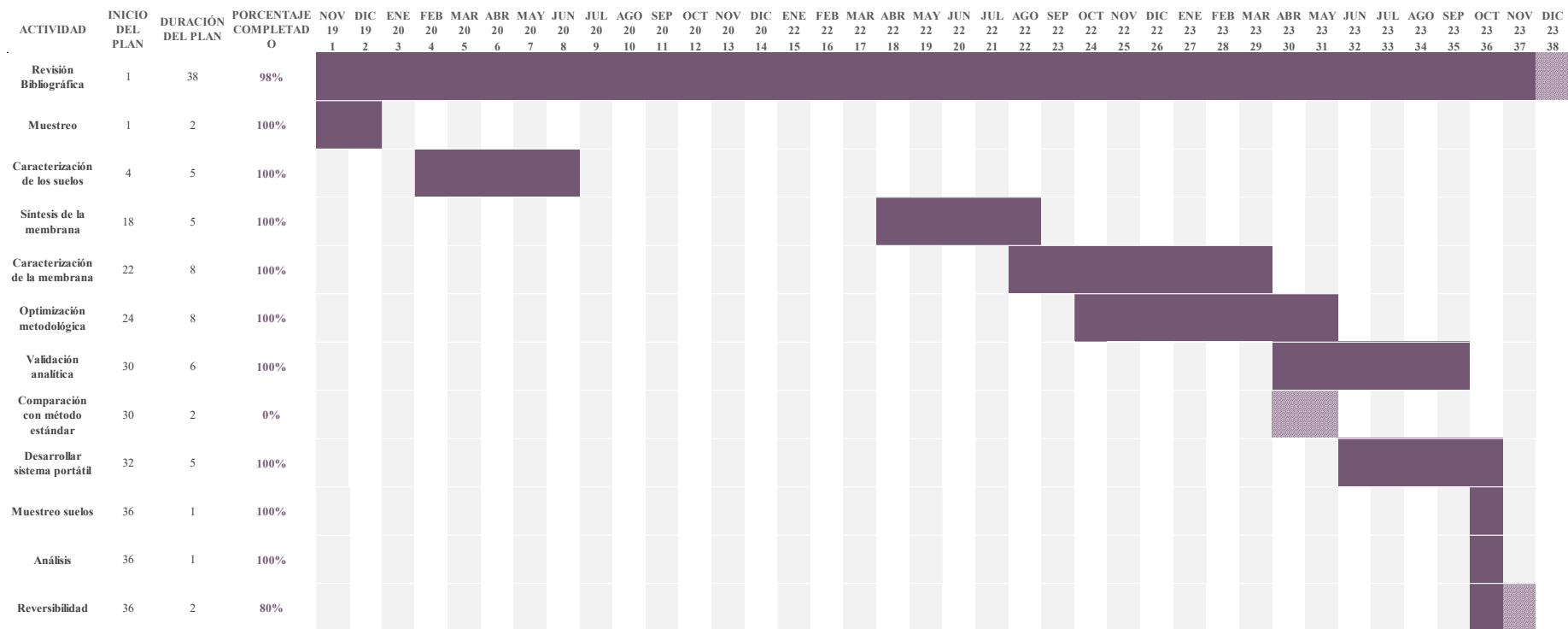


Figura 23. Diagrama experimental de la extracción de iones potasio para los suelos.

3.7. Diagrama de Gantt



CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Síntesis del bulk-optodo y nano-optodo

La propuesta inicial de la síntesis de la fase sensora del optodo selectivo a iones potasio (ISO) se realizó en colaboración con el Dr. Aleksander Radu de la universidad Keele del Reino Unido en la Escuela de Química y Ciencias Físicas como parte del proyecto colaborativo n°227-2018-FONDECYT. Las primeras experiencias del desarrollo del optodo se sintetizaron siguiendo los pasos descritos en la sección 3.2.1 Síntesis de la fase sensora del bulk-optodo.

Los bulk-optodos depositados en placas de vidrio obtenidos se muestran en la *Figura 24*, donde el color rojo de la fase sensora es representativo de la forma desprotonada del cromoióforo ETH 5294. Antes de las mediciones, el bulk-optodo se sumergió en solución de ácido clorhídrico 10 mM (HCl) por 2 minutos para forzar la manera protonada del cromoióforo ETH 5294, representada por el color azul de la fase sensora.

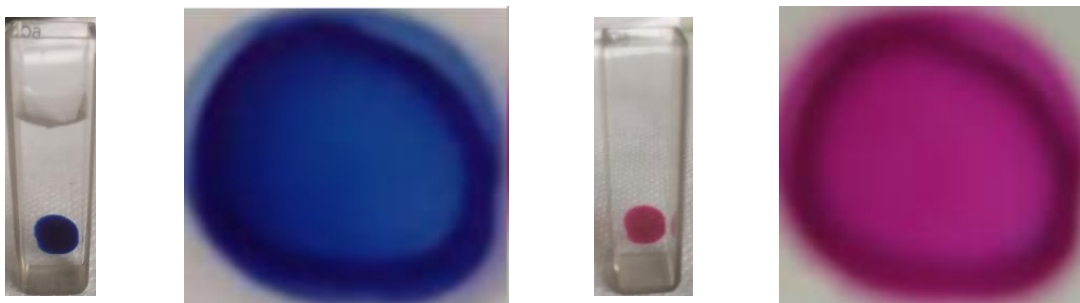


Figura 24. Cambio de color de la fase sensora del bulk-optodo selectivo a iones potasio (ISO) asociado al grado de desprotonación del cromoióforo ETH 5294. Forma protonada del optodo de color azul (izquierda). Forma desprotonada del optodo de color rojo (derecha).

Los nano-optodos fueron sintetizados a partir de un proceso de miniaturización de los bulk-optodos, por lo tanto, estos mantienen algunas propiedades analíticas que sus respectivos bulk-optodos. La proporción del optodo en concentraciones de ionóforo, intercambiador de iones y cromoióforo son iguales en el bulk-optodo y en el nano-optodo, pero las demás variables son diferentes y se analizaron más adelante en este capítulo.

El proceso de miniaturización usado fue la dispersión de alta energía como los generadores de ultrasonido, la metodología fue descrita en 3.2.2 Síntesis de la fase sensora del nano-optodo, donde una alícuota de 20 μL del cocktail del optodo disuelto en THF fue suspendido en 2 mL del buffer TRIS 20 mM de pH 7.00 con 20 mg del surfactante Pluronic F-127 y se sónico a 30 °C en un baño maría a una potencia de 70 % de 40 kHz por 60 minutos o hasta una completa disolución de la fase sensora. Los nano-optodos preparados se presentan en la *Figura 25*, donde se muestra la solubilización del bulk-optodo en un medio acuoso por la formación de micelas de tamaño nanométrico.

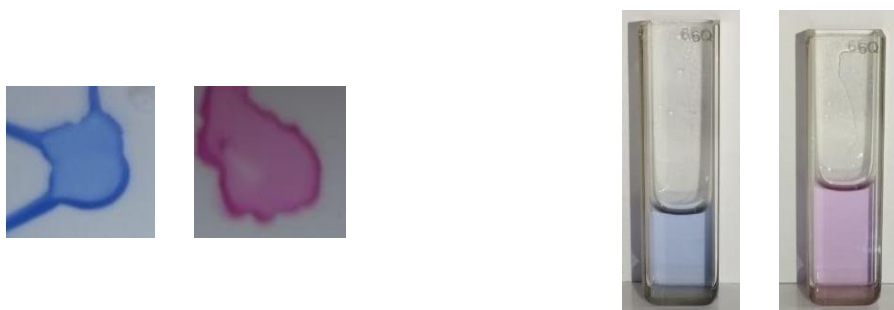


Figura 25. Proceso de miniaturización del bulk-optodo fijado en un soporte polimérico a un nano-optodo soluble en medio acuoso. Los cambios de color son similares a su contraparte bulk.

4.2. Caracterización del bulk-optodo y nano-optodo

4.2.1. Caracterización por UV-VIS

El proceso de caracterización de los bulk-optodos y nano-optodo selectivos a iones (ISO) se realizó según la sección 3.3 Caracterización del bulk-optodo y nano-optodo. El perfil de absorción de la luz en el rango del espectro visible entre 400 nm y 800 nm del bulk-optodo se muestra en la *Figura 26* y del nano-optodo en la *Figura 27*.

Los resultados de las Figuras 26 y 27 mostraron picos de absorción a longitudes de onda de cercanos a 540 nm, siendo 529 nm el pico máximo experimental correspondiente a la absorción de la forma desprotonada del cromoionóforo ETH 5294 (C) y longitudes de onda cercanos a 600 nm y 660 nm, siendo 615 nm y 667 nm los picos máximos experimentales para la forma protonada del cromoionóforo ETH 5294 (C-H⁺). También se

muestran los perfiles de las soluciones de buffer TRIS 20 mM de pH 7.0 y de hidróxido de sodio 10 mM. Estos resultados coinciden con referencias del comportamiento ácido-base del cromoióforo ETH 5294 (Seiler et al., 1991), (Firooz et al., 2012).

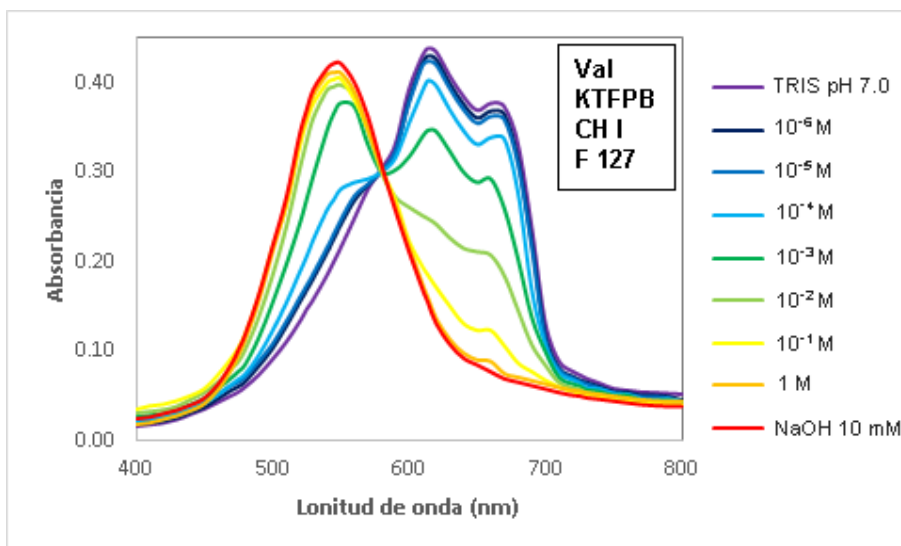


Figura 26. Espectro de absorción molecular UV-vis de los bulk-optodos selectivos a iones potasio (ISO) para diferentes concentraciones desde 1.0 M a 10^{-6} M de potasio.

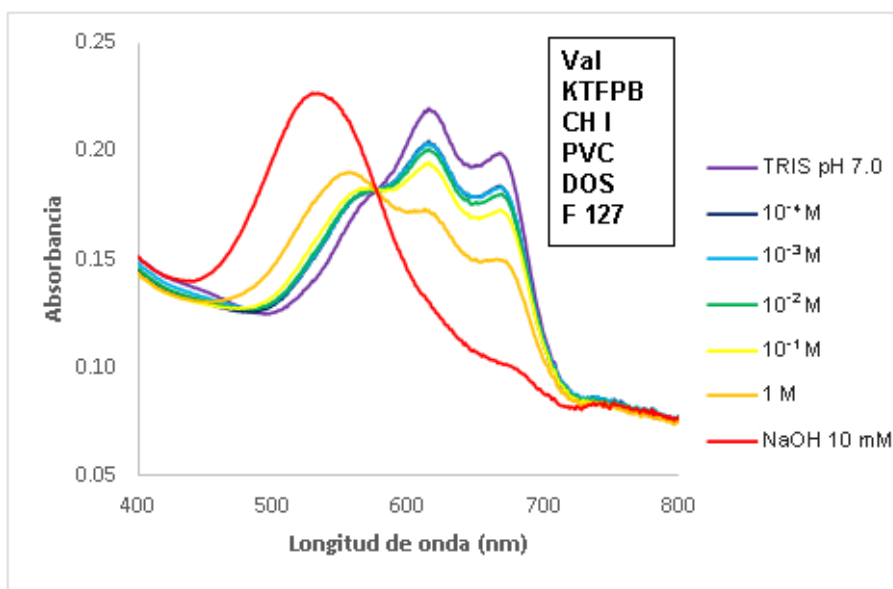


Figura 27. Espectro de absorción molecular UV-vis de los nano-optodos selectivos a iones potasio (ISO) para diferentes concentraciones desde 1.0 M a 10^{-4} M de potasio.

Un tipo de caracterización específico para sensores colorimétricos como el optodo en nanomateriales inmiscibles en agua es la estimación del valor de disociación ácida (pK_a) del cromoionóforo hidrófobo, descrito como el correcto proceso de desprotonación del cromoionóforo. En este caso el valor de referencia del cromoionóforo ETH 5294 (cromoionóforo I) es de 8.0 (Xie et al., 2016). Los valores experimentales obtenidos fueron de $pK_a = 7.27$ para el bulk-optodo y de $pK_a = 7.46$ para el nano-optodo. La constante de disociación más pequeña en el nano-optodo se deba posiblemente a que en este caso se requiera menor concentración de iones hidrógenos para protonarlo, al presentarse mejor contacto entre nanopartículas y a la mayor polaridad de la membrana pluronic F-127 sobre la membrana PVC-DOS (Xie et al., 2016)

4.2.2. Caracterización por DLS

Las medidas de caracterización del DLS de los nano-optodos se realizaron en el Grupo de Investigación en Síntesis de Materiales Avanzados - GISMA- Universidad Nacional de Ingeniería en colaboración con el Dr. Hugo Alarcón.

Las condiciones de medición se establecieron en el equipo de medición DLS de marca Brookhaven Instruments con una temperatura de medición de 25.0 °C, debido a que los nano-optodos están suspendidos en agua, se usó el índice de refracción de fluidos de 1.33 en un ángulo de 90.0 grados, además con un índice de refracción real para el material de pluronic F-127 y un índice de refracción imaginario de 0.00, valor usado para muestras poliméricas. Adicionalmente, se tomó en cuenta el valor de la concentración micelar crítica (CMC) del pluronic F-127 es 0.1 % a 30 °C (Vélez Martínez, 2015), siendo esta la mínima concentración necesaria del surfactante pluronic F-127 para la generación de las micelas. La *Figura 28* muestra los resultados de DLS de los nano-optodos a partir de 10 mg del surfactante pluronic F-127 en 2 mL de agua ultrapura (0.5 % p/p), que arrojó picos de tamaños de micelas promedio de 87.0 nm (A) y cuando se adicionó 20 μ L de cocktail del optodo se obtuvieron picos de tamaños promedio de micelas de 412.4 nm (B). También se testearon nano-optodos preparados con 20 mg del surfactante pluronic F-127 en 2 mL de agua ultrapura (1.0 % p/p) donde se reportaron picos de tamaños de micelas promedio de 82.2 nm (C) y cuando se adicionó 20 μ L de cocktail del optodo se obtuvo picos de tamaños de micelas promedio de 181.7 nm (D).

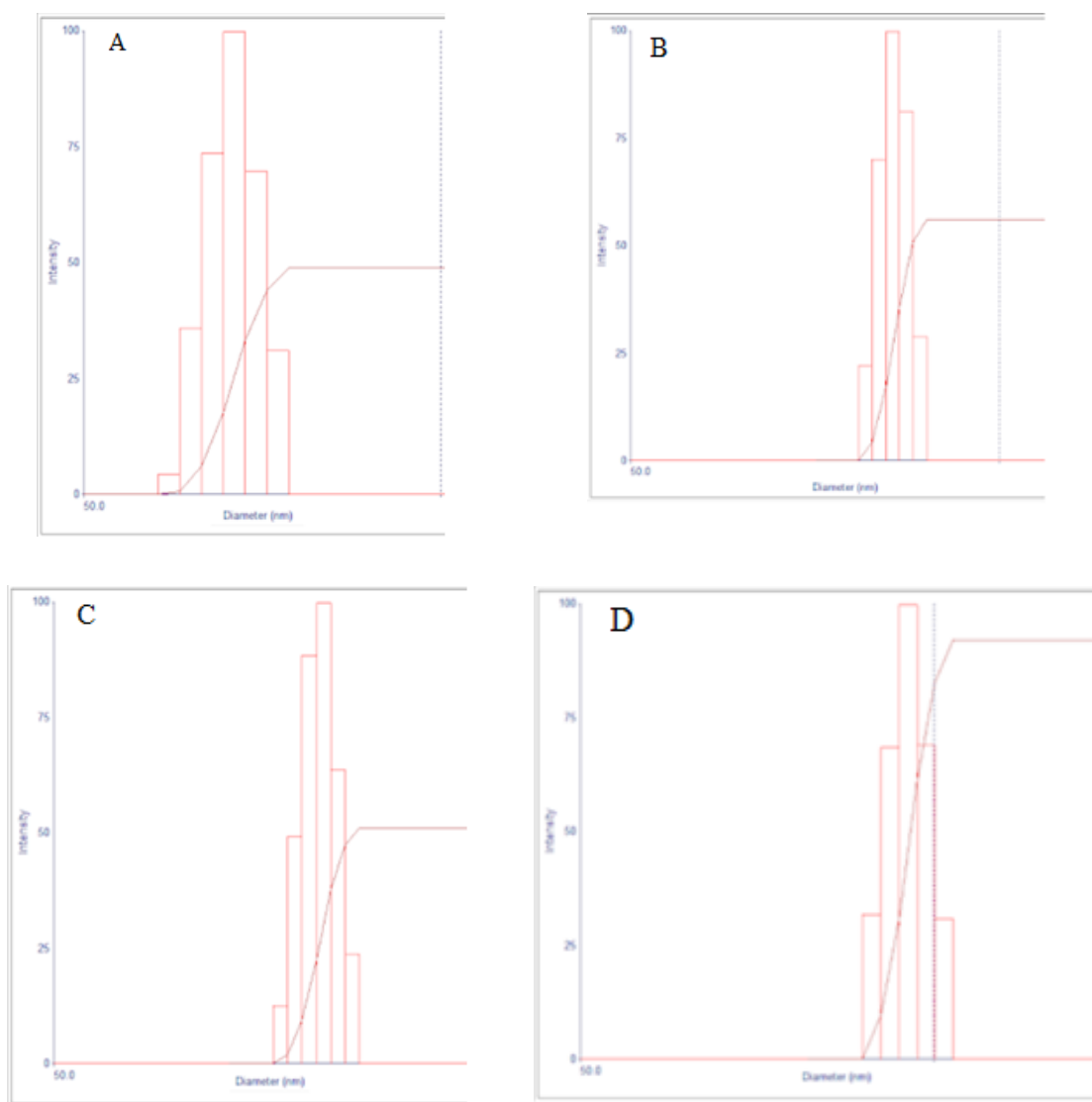


Figura 28. Perfil de distribución de tamaño de los nano-optodos para 0.5 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (A), en ausencia del optodo (B), 1.0 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (C) y en ausencia del optodo (D).

Los resultados mostraron que, para concentraciones superiores a la concentración micelar crítica, los nano-optodos son estables en el tiempo y las micelas no tienden a segregar. A una concentración del surfactante de 1.0 % de pluronic F-127 se obtuvieron partículas menores a 100 nm para la micela hueca, es decir, sin optodo. Las micelas crecen en tamaño mayores a 100 nm, cuando se añadió los componentes del optodo hasta un tamaño de 181.7 nm.

4.2.3. Caracterización por SEM

Las medidas de caracterización del SEM de los nano-optodos se realizaron en el Instituto de química de la Universidad Estatal Paulista Campus de Araraquara – IQ UNESP en colaboración con la Dra. María del Pilar Taboada.

Los experimentos SEM se realizaron con las siguientes condiciones de medición:

- Equipo de medición: Scanning electron microscope (SEM) JEOL a 7500 F
- Técnica: Análisis de espectroscopia de energía dispersiva de rayos X (EDS) por medición combinada de FEG – SEM con un rayo de electrones de 20 kV con un aumento en el lente de x 30 000

Debido a que la naturaleza no conductora del nano-optodo, se necesitó recubrir con capa conductora al nano-optodo. En este caso se aplicó una capa de carbono sobre las nano-optodos previamente secados. Esto explica las zonas oscuras en las mediciones realizadas.

La *Figura 29* muestra los resultados de SEM de los nano-optodos a partir de 10 mg del surfactante pluronic F-127 en 2 mL de agua ultrapura (0.5 % p/p) en presencia de 20 μ L de cocktail del optodo. También se testearon muestras de nano-optodos preparados con 20 mg del surfactante pluronic F-127 en 2 mL de agua ultrapura (1.0 % p/p) en presencia de 20 μ L de cocktail del optodo. Las imágenes SEM muestran que a una proporción de 0.5 % de surfactante pluronic F-127 los nano-optodos fueron escasos y en tamaños menores a 100 nm y para una proporción de 1.0 % de surfactante pluronic F-127 los nano-optodos fueron fáciles de observar y se encontró nano-optodos de tamaño promedio a 100 nm. En ambos casos las micelas pasaron por un proceso de secado previo a la medición de resultados. Esto ocasionó que los nano-optodos se aglomeren (*Figura 29*).

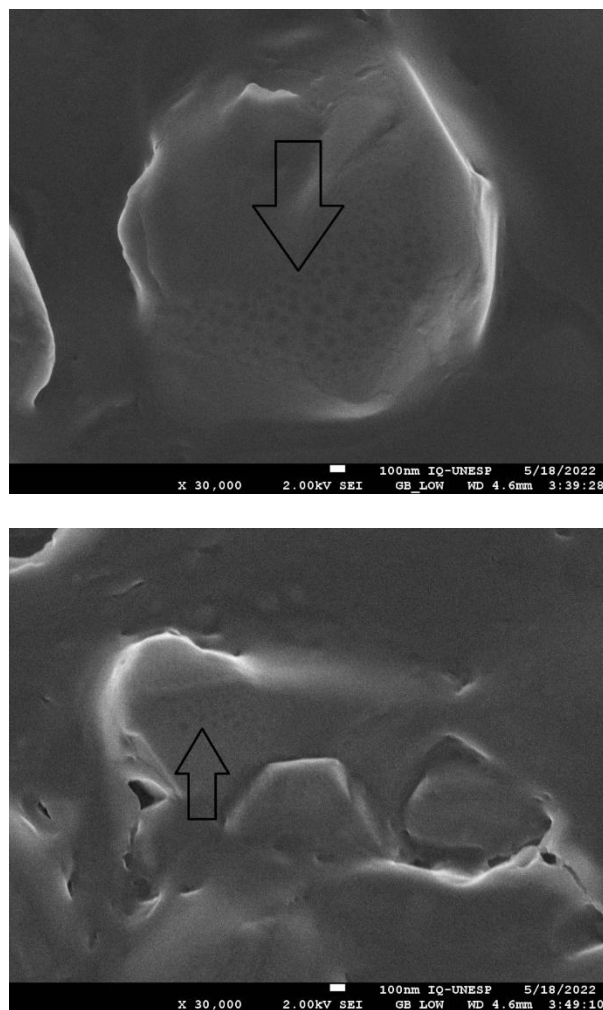


Figura 29. Imágenes de SEM para los nano-optodos para 0.5 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (A) y 1.0 % de pluronic F-127 en presencia del optodo (B).

4.2.4. Comprobación del efecto Tyndall

El efecto Tyndall en soluciones coloidales es un fenómeno ampliamente estudiado que provoca la desviación de la luz en soluciones con micelas de tamaño nanométrico. Experimentalmente, se usó un rayo láser, debido a que es una fuente de luz con un ancho bastante estrecho y similar a la longitud de onda en el rango visible (400 -800 nm). Este haz del láser no puede verse directamente en el aire y en soluciones ideales. La dispersión de la luz por las partículas coloidales, conocida como efecto Tyndall, permite ver el rayo de luz que atraviesa la solución del nano-optodo y se muestran la presencia de nanopartículas que reflejan la luz como partículas luminosas conocidas como orbes como se muestra en la *Figura 30*.

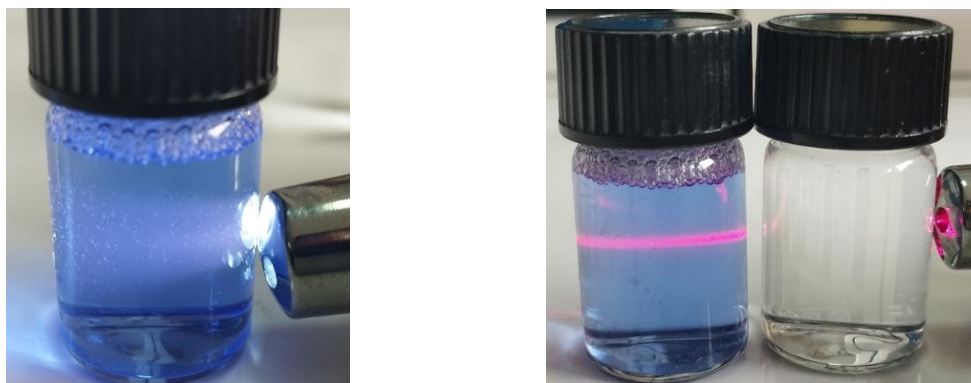


Figura 30. Comprobación del efecto Tyndall en soluciones de nano-optodo. En presencia de una fuente de luz (Izquierda). En presencia de un rayo láser (Derecha).

4.3. Optimización de la composición del bulk-optodo y nano-optodo

La optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO) se realizó con las propuestas de la *Tabla 9* (ver *pág. 87*) La proporción del ionóforo valinomicina, intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y cromoionóforo ETH 5294 se mantuvo constante tanto en el bulk-optodo cuanto en el nano-optodo. La composición correcta de los componentes activos del optodo es proporcional al desempeño del optodo, dicha proporción está relacionada con una mejor respuesta y una mayor selectividad de la fase sensora a iones potasio frente a otros iones interferentes.

Durante los ensayos preliminares se logró obtener ciertas restricciones en las relaciones entre las concentraciones de los componentes activos del optodo como la concentración del ionóforo (C_I), del intercambiador de iones (C_S) y el cromoionóforo (C_C). Específicamente que la concentración del ionóforo tiene que ser igual o mayor a la del intercambiador de iones y esta tiene que ser igual o mayor a la del cromoionóforo, esto se resumen en la siguiente expresión $C_I \geq C_S \geq C_C$. Este requisito ha sido profundamente analizado y es necesario para obtener una fase sensora homogénea y mantener la electroneutralidad dentro de la fase sensora del optodo para obtener una señal analítica capaz de cumplir los procesos de optimización y validación.

En la optimización se mantuvo igual las concentraciones de los tres componentes activos del optodo, es decir $C_I = C_S = C_C$. Esta igualdad en las concentraciones de los tres

componentes permitió la simplificación de un modelo de calibración sigmoide y lineal, donde las curvas de calibrado que se muestran en todo el proceso de optimización fueron realizadas utilizando las *ecuaciones 9 y 10* (ver *pág. 51*) para el modelo sigmoide y lineal respectivamente. La metodología optimizada del optodo utilizó concentraciones de los componentes activos del optodo de 2.43 μM para el ionóforo valinomicina, de 2.42 μM para el intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y de 2.40 μM para el cromoionóforo ETH 5294.

Los resultados de la curva sigmoide de la variación de la concentración del ionóforo valinomicina se muestran en la *Figura 31*. Cuando la cantidad del ionóforo valinomicina fue aumentando, se encontró un exceso del ionóforo en la fase sensora del optodo con respecto a los demás componentes. Esto produjo el ingreso de iones potasio dentro del optodo para formar complejos del ionóforo valinomicina y ion potasio (K-I^+) y esto conllevó a un exceso de protones liberados a partir de la desprotonación cromoionóforo en forma protonada (C-H^+). Esto ocasionó que se alcance la forma desprotonada del cromoionóforo ETH 5294 (C) ($\alpha=1$) a menores concentraciones de potasio con respecto a la proporción [1:1:1] y el grado de desprotonación “ $1-\alpha$ ” llegó al valor de “0” del eje Y a menores concentraciones de iones potasio con respecto a la proporción [1:1:1].

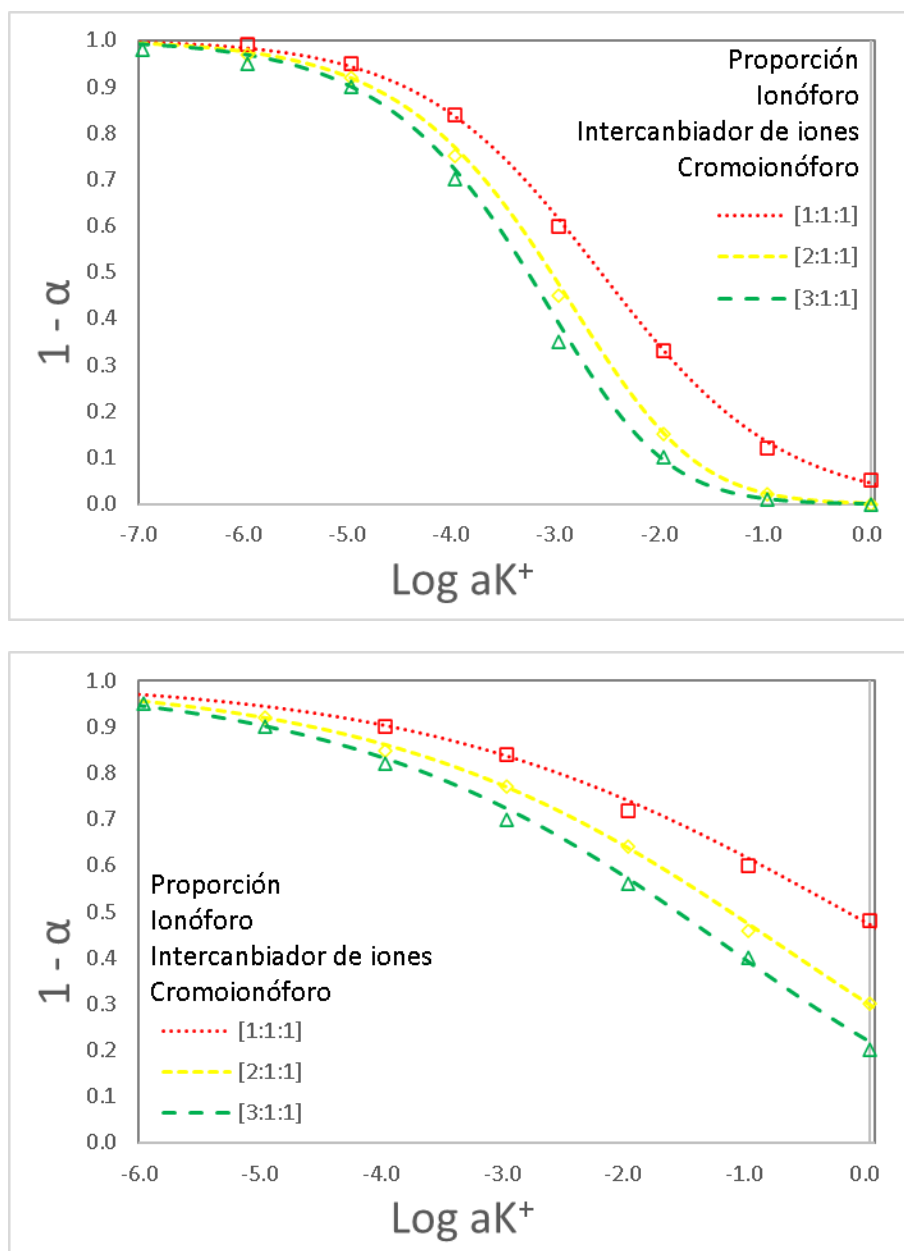


Figura 31. Curvas de calibración del modelo sigmoide para diferentes proporciones del ionóforo valinomicina del bulk-optodo (Arriba) y del nano-optodo (Abajo).

Los resultados de la curva sigmoide de la variación del intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio se muestra en la *Figura 32*. Cuando la cantidad del intercambiador de iones fue aumentando con respecto al cromoióforo, presentó un exceso de iones positivos que ingresan a la fase sensora del optodo con respecto al ionóforo valinomicina. Entonces parte del cromoióforo permanecerá en forma básica (C) para contrarrestar el exceso de cargas positivas. Este comportamiento se verificó al alcanzar el

valor de 1 para “1- α ” del eje Y a actividades de iones potasio (a_K) más altas y disminuir el rango de trabajo del potasio, es decir tiene un menor alcance en la sensibilidad analítica a bajas concentraciones de potasio.

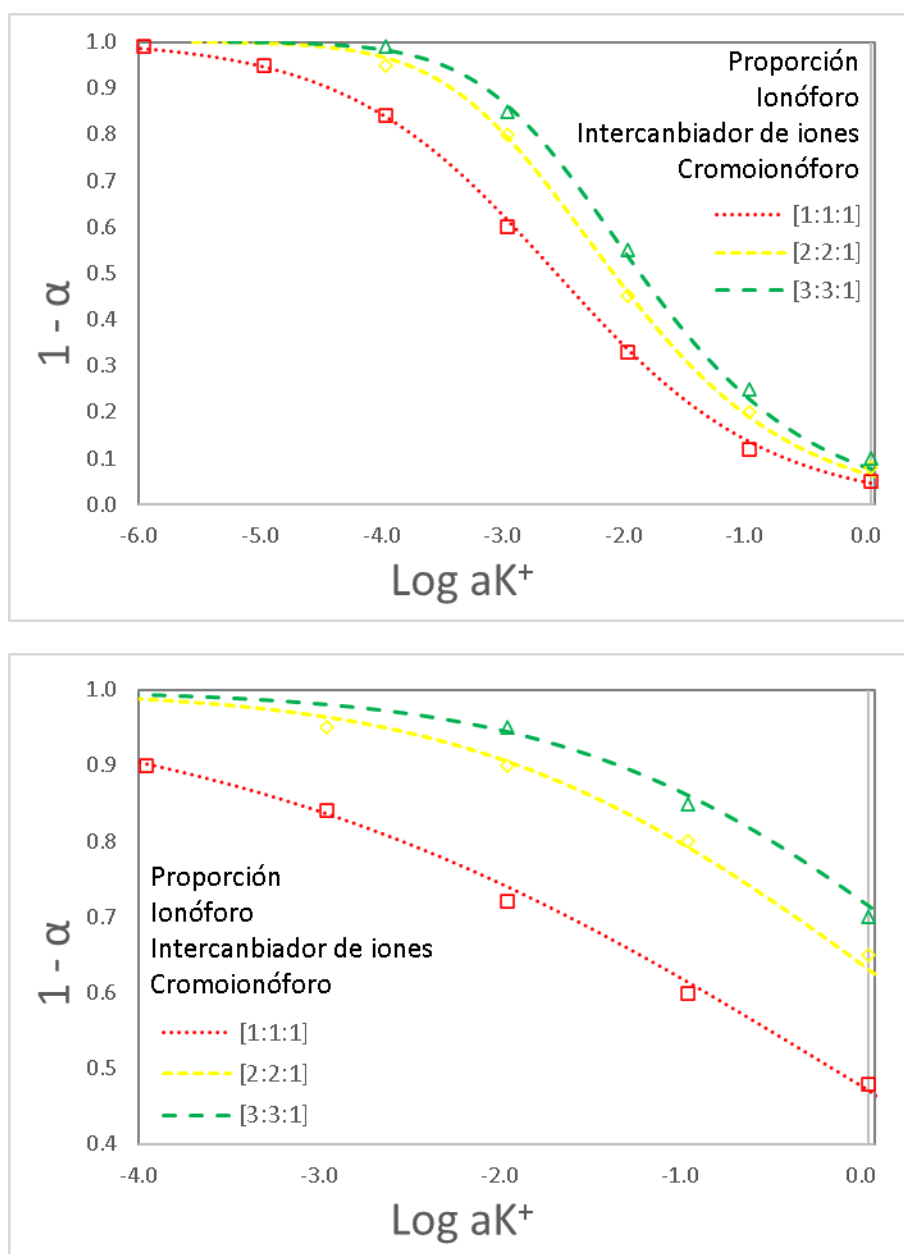


Figura 32. Curvas de calibración del modelo sigmoide para diferentes proporciones del ionóforo valinomicina e intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio del bulk-optodo (Arriba) y del nano-optodo (Abajo).

La curva de calibración sigmoide se desplazó hacia la derecha, según la cantidad del ionóforo valinomicina aumentó. Por ende, se varió el rango de trabajo del optodo, alcanzando para el bulk-optodo un valor de hasta 10^{-7} M de potasio y para el nano-optodo hasta 10^{-6} M de potasio, considerando una proporción del ionóforo: intercambiador de iones: cromoionóforo de [3:1:1]. Para mayores proporciones de [4:1:1] y [5:1:1] se observó una incompleta solubilización durante el proceso de síntesis, por lo que no se realizaron los *tests* de calibración para dichas concentraciones, debido a que las partículas insolubles interfieren con la interacción del paso de luz durante la medición analítica en el espectrómetro UV-Vis.

Los resultados de la curva sigmoide de la variación del cromoionóforo ETH 5294 se presentan en la *Figura 33*. Cuando se aumentó la cantidad del cromoionóforo ETH 5294, hubo una parte del cromoionóforo que permaneció en modo protonado, debido a que las cargas negativas no fueron suficientes para contrarrestar las cargas positivas del intercambiador de iones. Esto se comprobó al alcanzar el valor de 1 para “1- α ” del eje Y a menores actividades de iones potasio (a_K) y el valor de 0 para “1- α ” del eje Y a mayores actividades de iones potasio (a_K). En este caso, el incremento de los componentes activos del optodo, en una misma proporción, no cambian significativamente la curva de calibración sigmoide en todo el rango de concentraciones de potasio.

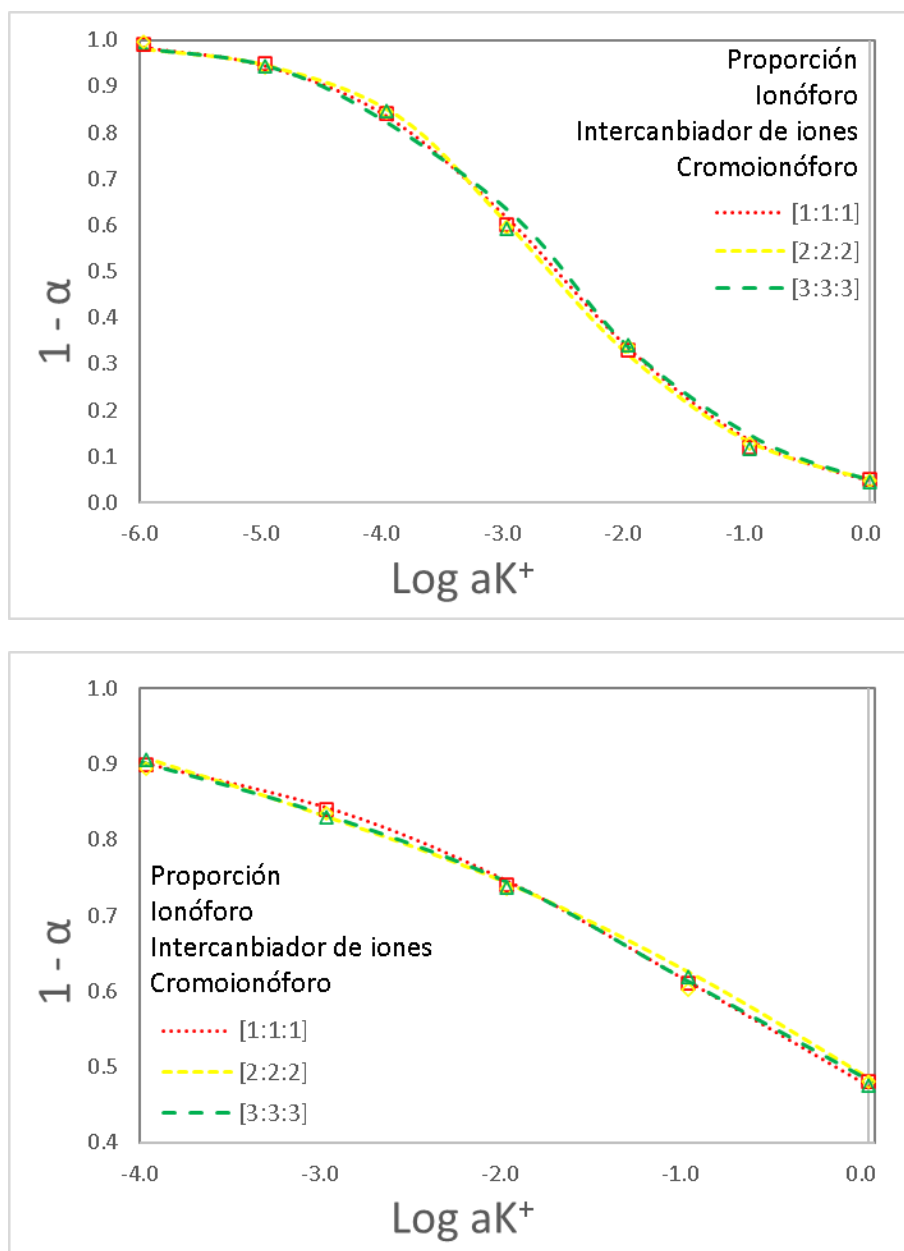


Figura 33. Curvas de calibración del modelo sigmoide para un aumento del cromoiónico del bulk-optodo (Arriba) y del nano-optodo (Abajo).

4.4. Optimización de la metodología analítica del bulk-optodo y nano-optodo

Todos los ensayos experimentales realizados durante la optimización de esta sección se hicieron para el bulk-optodo y estos ensayos se repitieron para el nano-optodo. La composición química del nano-optodo no varió con respecto al bulk-optodo, debido a que mantiene la misma proporción de ionóforo, intercambiador de iones y cromoiónico.

Los nano-optodos tienen características diferentes que el bulk-optodo como:

- No necesitan un solvente orgánico como el THF, debido a que son solubles en medio acuoso.
- No necesitan un soporte polimérico, por ende, el uso de polímero como PVC y plastificante como DOS no son necesarios.
- No es dependiente de soluciones tampón como buffer de TRIS, debido a que el surfactante tribloque Pluronic F-127 es capaz de aislar al optodo del medio acuoso y formar micelas conteniendo en su interior los componentes orgánicos del nano-optodo.

4.4.1. Optimización de la calibración del modelo sigmoide y modelo lineal del bulk-optodo y nano-optodo

La respuesta analítica del bulk-optodo y nano-optodo son descritos inicialmente por el modelo sigmoide, debido a la limitada linealidad se planteó optimizar la calibración a un modelo lineal para extender el rango de trabajo de potasio. Los resultados experimentales mostraron que el modelo de calibración sigmoide pierde linealidad en los extremos de la curva de calibrado, debido a eso, se justificó un cambio del modelo de calibración lineal en todo el rango de concentración de la curva de calibrado. La variación consistió en la aplicación de logaritmo al eje Y, es decir, la variable dependiente de la curva de calibración para el modelo sigmoide es el grado de desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 (α) y se cambió a logaritmo de una función de α como $[\text{Log}(\alpha/1-\alpha)]$ según la *ecuación 10* (ver *pág. 51*). Por lo tanto, durante la calibración lineal del bulk-optodo para el ion potasio se alcanzó el rango de concentraciones desde 10^{-6} M hasta 1.0 M y para el nano-optodo se alcanzó el rango de concentraciones desde 10^{-4} M hasta 1.0 M. En ambos optodos se estableció como eje Y, la variable dependiente, una función del logaritmo de α y en el eje X, la variable independiente, el logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$).

La optimización de la calibración sigmoide incluyo las propuestas se presenta en la *Tabla 8* (ver *pág. 86*) y luego el mejor resultado obtenido fue “ $1-\alpha$ ”, entonces este se transformó al sistema de calibración lineal. La propuesta de optimización se evaluó en la *Figura 34* para el bulk-optodo y en la *Figura 35* para el nano-optodo, en esta se propuso cambios sobre el eje Y basado en las absorbancias a longitudes de onda de 529 nm, 615 nm y 667 nm del optodo, valores propuestos del perfil de absorbancias del cromoionóforo ETH 5294.

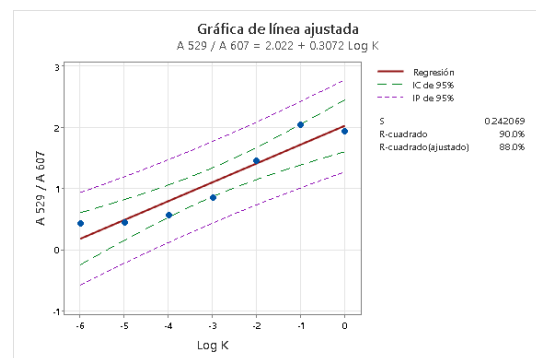
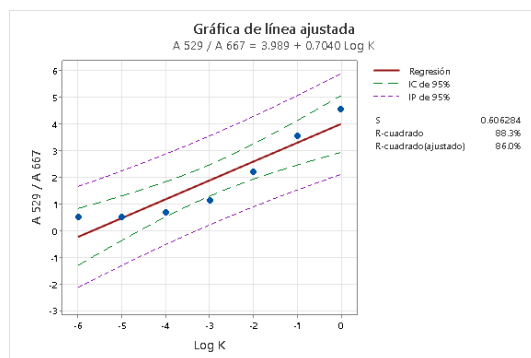
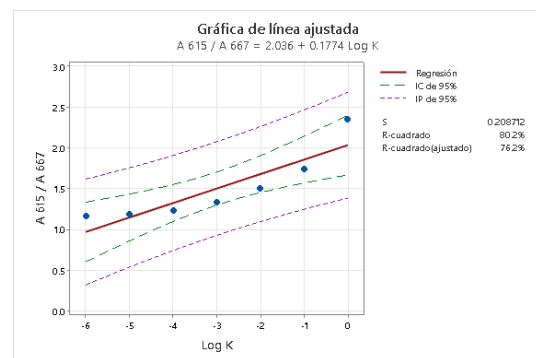
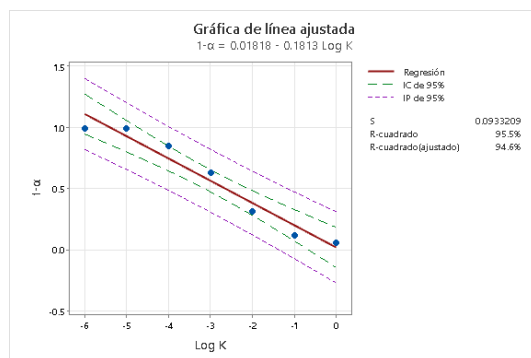
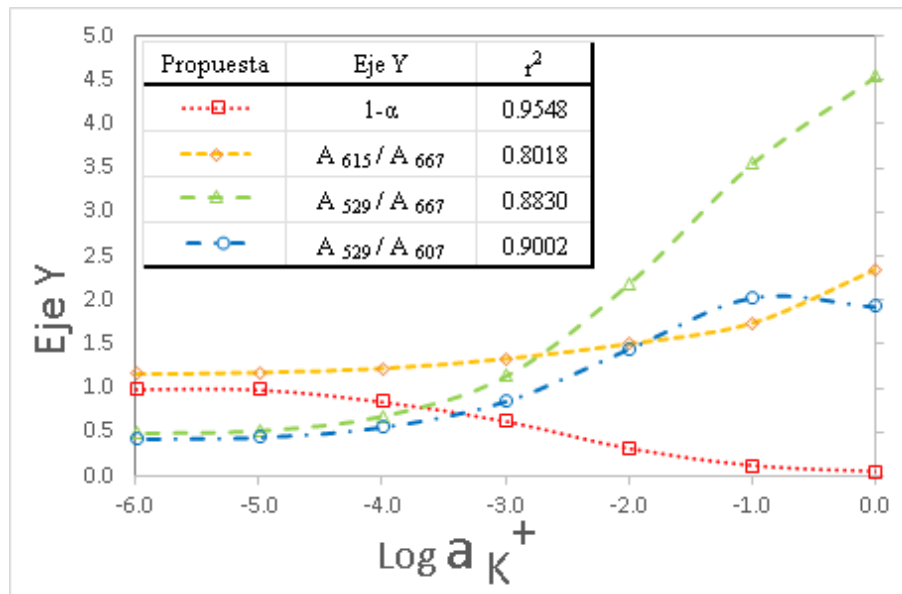


Figura 34. Curvas de calibración del modelo sigmoide del bulk-optodo para diferentes valores del eje Y. Las propuestas para ejes Y se analizaron a diferentes longitudes de onda de absorbancia del optodo (Arriba). Gráficas de calibración para cada propuesta, donde las líneas punteadas representan los intervalos de confianza (IC) e intervalos de predicción (IP) a un nivel de confianza del 95 % (Abajo).

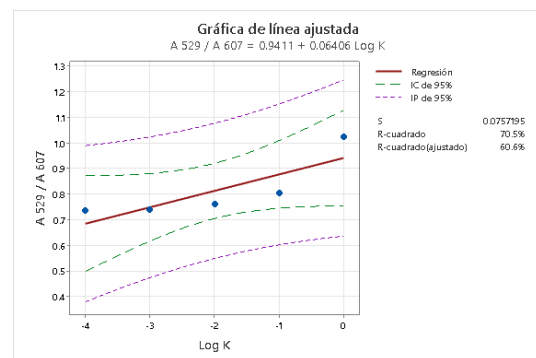
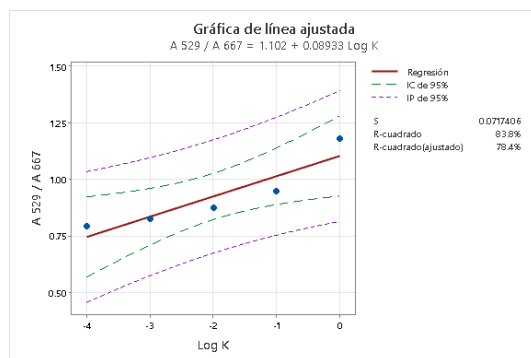
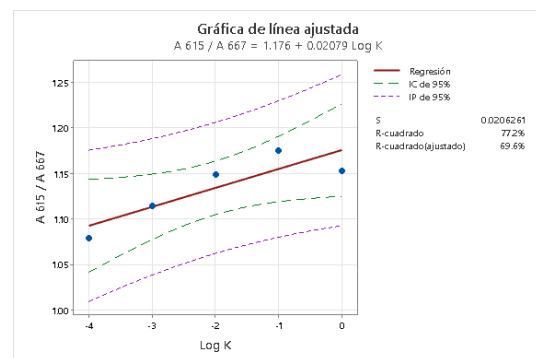
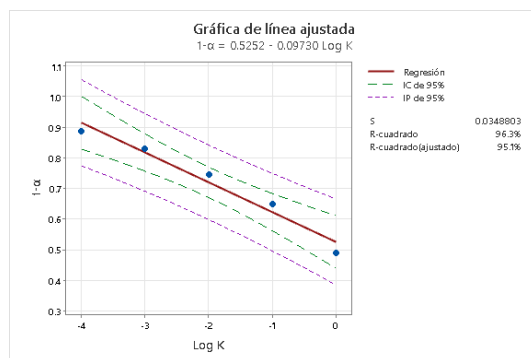
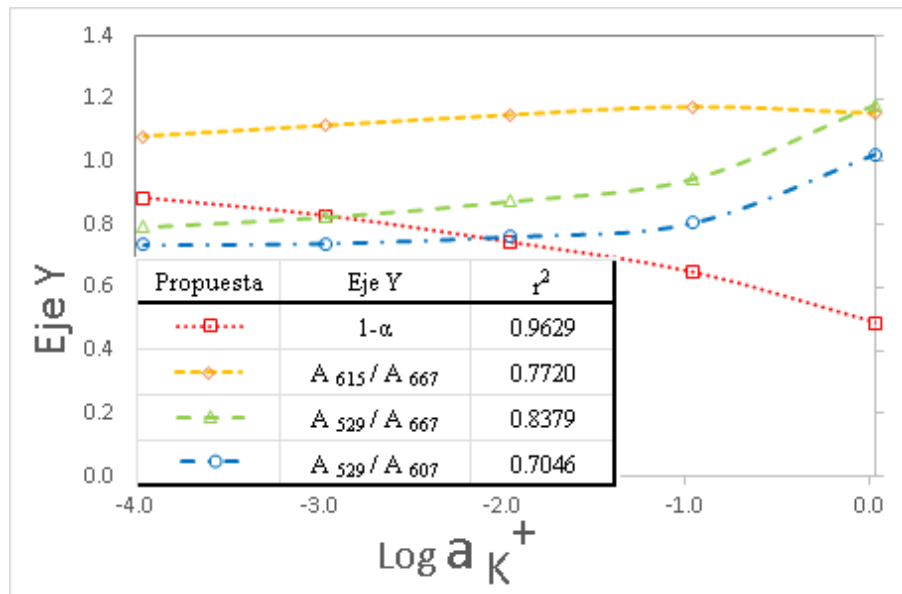


Figura 35. Curvas de calibración del modelo sigmoide del nano-optodo para diferentes valores del eje Y. Las propuestas para ejes Y se analizaron a diferentes longitudes de onda de absorbancia del optodo (Arriba). Gráficas de calibración para cada propuesta, donde las líneas punteadas representan los intervalos de confianza (IC) e intervalos de predicción (IP) a un nivel de confianza del 95 % (Abajo).

Los resultados mostraron que la propuesta del eje Y de “1- α ” se usaron para la calibración del modelo sigmoide según la *ecuación 9* y posterior conversión a un modelo de calibración lineal según la *ecuación 10* (ver pág. 51).

La propuesta inicial fue de “1- α ” para el eje Y, en este caso se obtuvo el mejor coeficiente de determinación $r^2 = 0.9548$ y para el nano-optodo se obtuvo un coeficiente de determinación $r^2 = 0.9629$. Para la calibración sigmoide todos los coeficientes de correlación de estas propuestas fueron menores al requisito mínimo de 0.995 (Van Loco et al., 2002), por lo tanto, se consideró necesario la conversión al modelo lineal, debido a la insuficiente correlación entre la señal de absorbancia y la actividad de los iones potasio.

En la *Figura 36* se muestra el cambio de color de la fase sensora del bulk-optodo y del nano-optodo para la propuesta de eje Y de “1- α ”, desde azul a rojo, directamente proporcional al aumento de la concentración de potasio en la solución. Adicionalmente, se muestra las fases sensoras tratadas en soluciones de hidróxido de sodio al 10 mM (NaOH) y buffer TRIS pH 7.0 a 20 mM.

TRIS Buffer 20 mM	NaOH 10 mM	Potassium concentration (M)						
		10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1.0
								
								

Figura 36. Cambio de color de la fase sensora del bulk-optodos (Arriba) y nano-optodos (Abajo) desde azul a rojo proporcional al aumento de la concentración de potasio.

En la *Tabla 23* y la *Tabla 24* se muestran las absorbancias del bulk-optodo y nano-optodo respectivamente para las longitudes de onda de 529 nm, 615 nm y 667 nm. Donde la actividad del ion potasio (a_{K^+}) se calculó según la ecuación de Debye-Hückel (Lei et al., 2020; Reis, 2021), la actividad del hidrógeno (a_{H^+}) fue tomada como un valor constante debido al pH controlado por el buffer TRIS 20 mM de pH 7.00 y la constaste de equilibrio

del complejo ion potasio-valinomicina $\text{Log}(K_e^{\text{KI}^+})$ se calculó de la ecuación 7 (ver pág. 50) (Capitán-Vallvey et al., 2003).

Tabla 23. Valores de absorbancia del bulk-optodo para las longitudes de onda de 529 nm, 615 nm y 667 nm a diferentes niveles de concentración de potasio, también se calculó el grado de desprotonación del cromoionóforo I como $1-\alpha$ y la concentración de potasio como el logaritmo de la actividad del potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$).

Concentración de K^+ (M)	$\text{Log } a_{\text{K}^+}$	$A_{529 \text{ nm}}$	$A_{615 \text{ nm}}$	$A_{667 \text{ nm}}$	$1-\alpha$
NaOH 10 mM		0.392	0.154	0.069	
1	0.00	0.386	0.200	0.085	0.053
0.1	-1.00	0.377	0.185	0.106	0.120
0.01	-2.00	0.362	0.249	0.165	0.314
0.001	-3.00	0.296	0.347	0.259	0.625
0.0001	-4.00	0.225	0.402	0.327	0.847
0.00001	-5.00	0.188	0.425	0.359	0.985
0.000001	-6.00	0.183	0.431	0.370	0.991
TRIS pH 7.0		0.158	0.439	0.373	

Los resultados de calibración para los bulk-optodos mostraron un rango de concentración de desde 10^{-6} M a 1.0 M de potasio y los resultados de calibración para los nano-optodos mostraron un rango de concentración de desde 10^{-4} M a 1.0 M de potasio. El rango de calibración del nano-optodo fue más estrecho en comparación del bulk-optodo respectivo, esto se explicó debido a que el mecanismo de detección de iones potasio es diferente al del nano-optodo (Soda et al., 2019a). El mecanismo de detección del bulk-optodo se explicó por un equilibrio dinámico del intercambio de iones entre el ion potasio (K^+) del analito y el ion hidrogeno (H^+) de la desprotonación del cromoionóforo I (ETH-5294) durante la formación del complejo ionóforo valinomicina y iones potasio.

Tabla 24. Valores de absorbancia del nano-optodo para las longitudes de onda de 529 nm, 615 nm y 667 nm a diferentes niveles de concentración de potasio, también se calculó el grado de desprotonación del cromoionóforo como $1-\alpha$ y la concentración de potasio como el logaritmo de la actividad del potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$).

Concentración de K^+ (M)	$\text{Log } a_{\text{K}^+}$	$A_{529 \text{ nm}}$	$A_{615 \text{ nm}}$	$A_{667 \text{ nm}}$	$1-\alpha$
NaOH 10 mM		0.227	0.130	0.103	
1	0.00	0.177	0.173	0.150	0.489
0.1	-1.00	0.157	0.195	0.166	0.650
0.01	-2.00	0.153	0.201	0.175	0.745
0.001	-3.00	0.151	0.204	0.183	0.829
0.0001	-4.00	0.150	0.204	0.189	0.886
TRIS pH 7.0		0.141	0.220	0.200	

En la *Figura 37* se muestran la curva de calibración del modelo sigmoide optimizado de la *ecuación 9* (ver *pág. 51*) tanto para el bulk-optodo y nano-optodo donde el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ para cada concentración es representado por las barras verticales. El modelo de calibración sigmoide se optimizó a un modelo de calibración lineal según la *ecuación 10* (ver *pág. 51*). Este nuevo modelo lineal se presenta en la *Figura 38*. Donde la linealidad del bulk-optodo en un rango de trabajo de concentración desde 1.0 M a 10^{-6} M de potasio obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9945 (99.4 %) y la linealidad del nano-optodo selectivo a iones potasio (ISO) en un rango de trabajo de concentración desde 1.0 M a 10^{-4} M de potasio reportó un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9953 (99.5 %). En la *Tabla 25* se realizó un análisis de varianza para ambos modelos de calibración lineal, se obtuvo un $p\text{-value} = 0.00$, con lo cual se rechaza la hipótesis nula: los coeficientes de la ecuación (pendiente e intersección) son iguales a cero, por ende, se comprueba que el valor de la pendiente y el valor del intercepto son estadísticamente diferentes del valor de cero. Tanto para el bulk-optodo y nano-optodo se verificó la linealidad, debido a que los coeficientes de determinación (r^2) fueron mayores al criterio de aceptación de 0.99 (Van Loco et al., 2002).

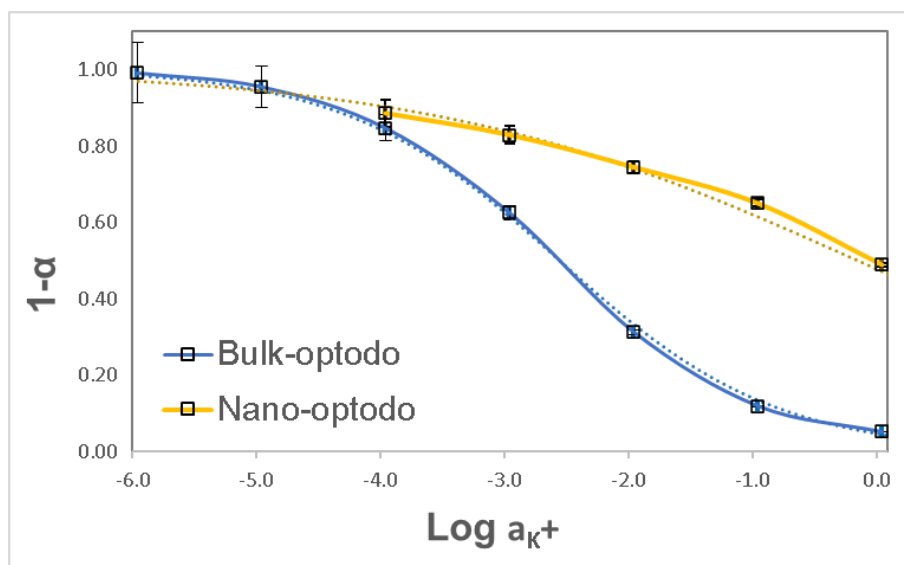


Figura 37. Curva de calibración sigmoide del bulk-optodo y nano-optodo a partir del logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{K^+}$) y de $(1-\alpha)$, donde las barras representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales para cada concentración de potasio y las líneas discontinuas representan los modelos de calibración sigmoide teóricos.

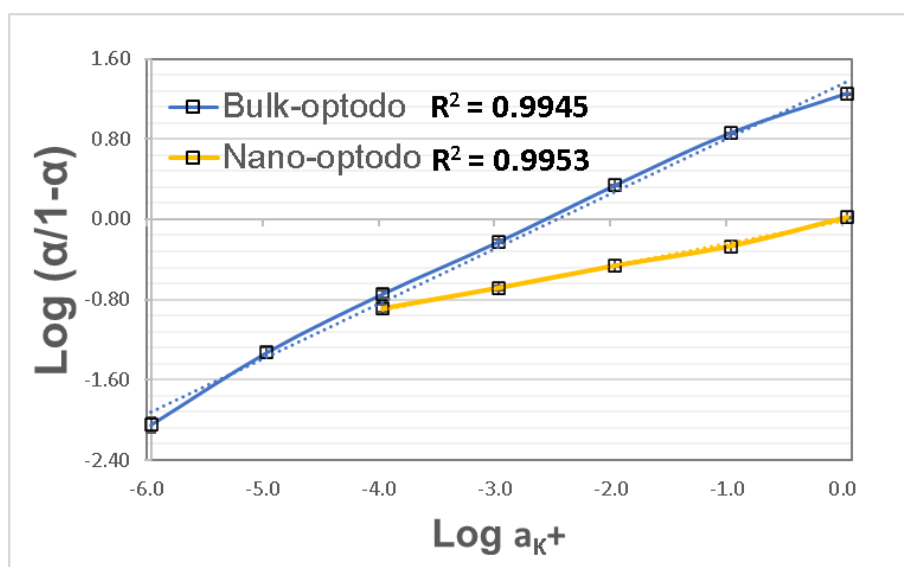


Figura 38. Curva de calibración lineal del bulk-optodo y nano-optodo a partir del logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{K^+}$) y del $\text{Log } [\alpha/1-\alpha]$, donde las barras representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales para cada concentración y las líneas discontinuas representan los modelos de calibración lineal teóricos.

En el caso del nano-optodo este mecanismo se explicó por el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo ionóforo valinomicina y iones potasio, es decir, los iones potasio no lograron retornar a la solución original y quedaron atrapados en el interior del nano-optodo. Esto ocasionó un cambio en la composición de iones potasio de la solución problema, por el cual el analito se consumió en su totalidad durante el proceso de detección de este. Este mecanismo de detección es llamado modo exhaustivo de medición (Soda et al., 2019).

Tabla 25. Análisis de regresión: Log K vs Log ($\alpha/1-\alpha$) para bulk-optodo (izquierda) y para el nano-optodo (derecha)

La ecuación de regresión es
 $\text{Log } (\alpha/1-\alpha) = 1.378 + 0.5490 \text{ Log K}$

La ecuación de regresión es
 $\text{Log } (\alpha/1-\alpha) = - 0.01162 + 0.2235 \text{ Log K}$

Resumen del modelo

	S R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)
	0.0967727	99.45%
		99.34%

Resumen del modelo

	S R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)
	0.0279603	99.53%
		99.38%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	8.43879	8.43879	901.10	0.000
Error	5	0.04682	0.00936		
Total	6	8.48561			

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	0.499682	0.499682	639.16	0.000
Error	3	0.002345	0.000782		
Total	4	0.502027			

La *Figura 39* y *Figura 40* se muestran los análisis de regresión lineal de la concentración de potasio como Log K^+ (Eje X) y una función de α como $\text{Log } (\alpha/1-\alpha)$ (Eje Y) para el bulk-optodo y nano-optodo respectivamente, calculado a partir de las absorbancias obtenidas de la espectroscopia UV-Vis, incluyendo las ecuaciones de calibración, los coeficientes de regresión mayores al 95 %, con los intervalos de confianza (IC) del modelo de calibración lineal del bulk-optodo y nano-optodo respectivamente. Donde todas las concentraciones de potasio, puntos de calibración, están dentro del límite de confianza al 95 %. Además, el análisis de normalidad de los residuales, ósea, el sesgo entre la concentración

de potasio real y teórica está aleatoriamente distribuida en la gráfica de probabilidad de normalidad con valores por arriba y debajo de la línea de tendencia en ambos sensores ópticos, bulk-optodo y nano-optodo.

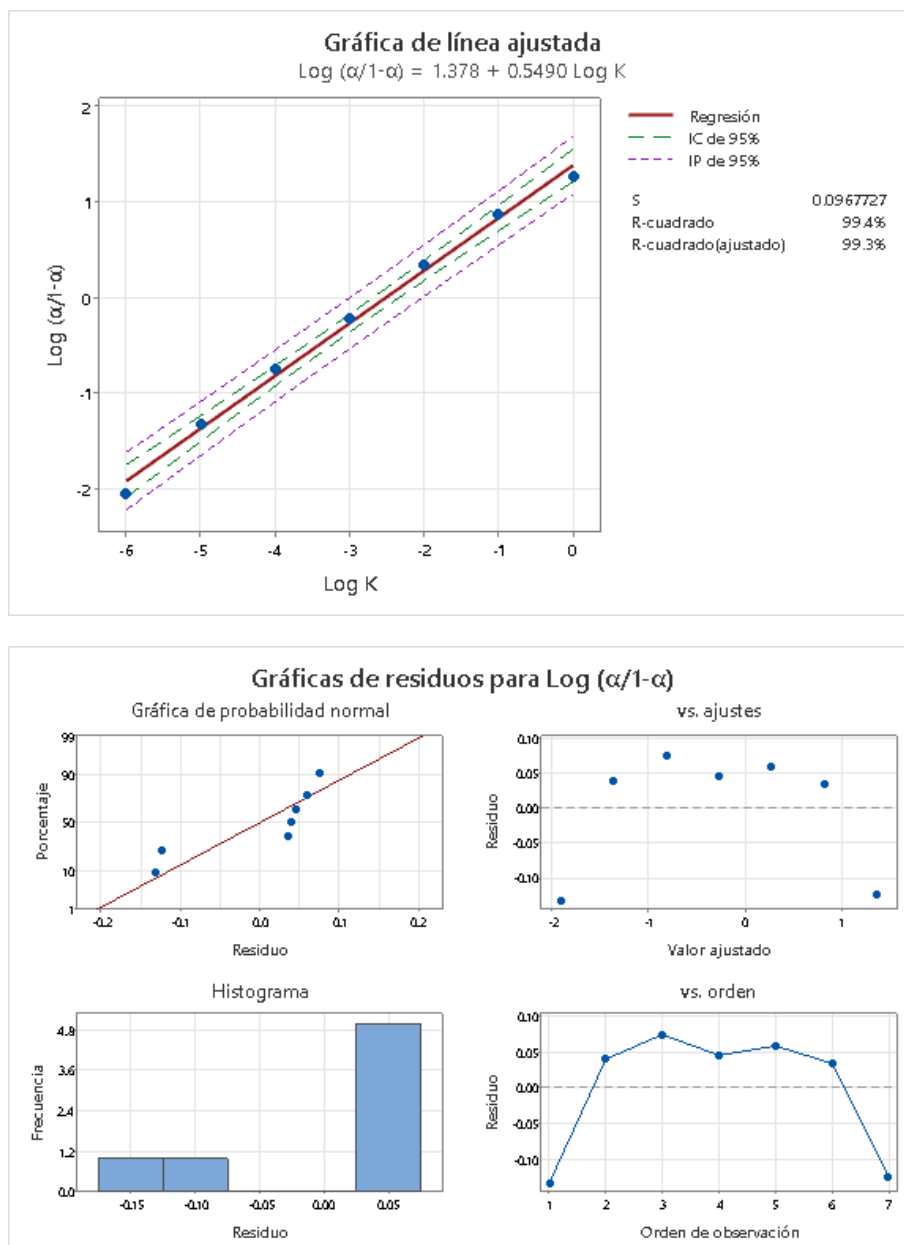


Figura 39. Gráfica del modelo de calibración lineal del bulk-optodo y el análisis de normalidad de los residuales por la metodología espectroscópica UV-Vis.

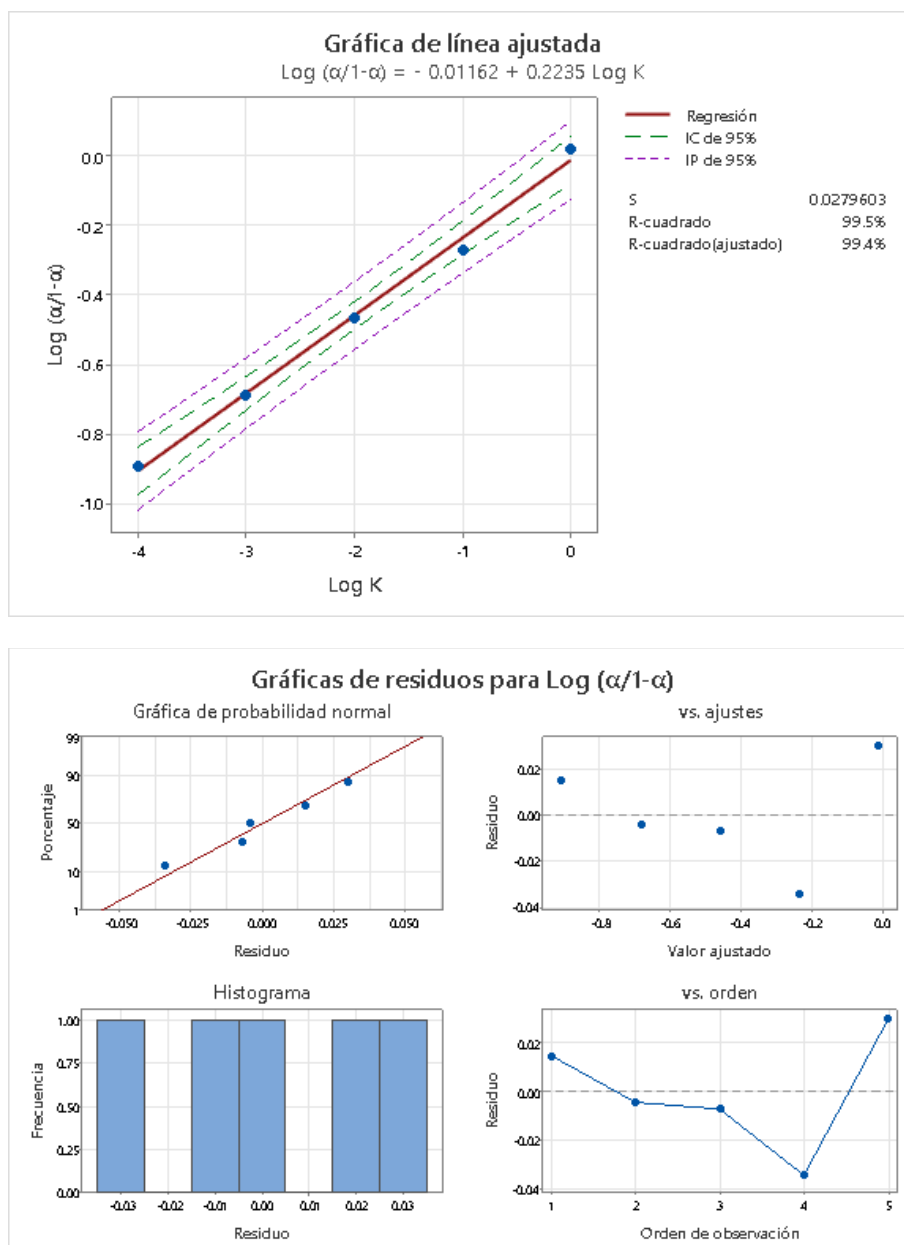


Figura 40. Gráfica del modelo de calibración lineal del nano-optodo y el análisis de normalidad de los residuales por la metodología espectroscópica UV-Vis.

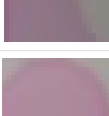
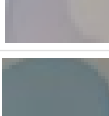
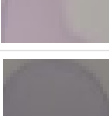
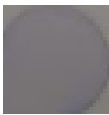
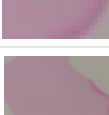
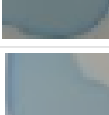
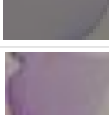
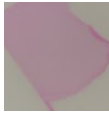
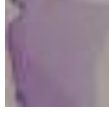
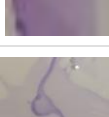
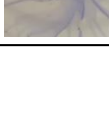
La menor capacidad de detección en el caso del nano-optodo se explicó por la alteración del equilibrio en la formación del complejo valinomicina – potasio, es decir, los iones potasio no lograron retornar a la solución y se quedaron atrapados en el interior de las micelas del nano-optodo. Por lo cual, la capacidad de carga en el interior del nano-optodo de iones potasio descendió progresivamente durante el proceso de detección. Este mecanismo de detección es llamado modo exhaustivo de medición (Soda et al., 2019).

4.4.2. Optimización de la proporción del polímero y plastificante

La optimización de la proporción del polímero PVC y plastificante DOS en la composición del bulk-optodo se realizó con las propuestas de la *Tabla 10* y la *Tabla 11* (ver pág. 88). La proporción entre el polímero y plastificante está relacionada con una buena homogeneidad de la fase sensora del optodo y con un tiempo de respuesta rápido, siendo el cambio de color de la fase sensora del optodo desde un color azul (sin potasio) a un color rojo (en presencia de potasio).

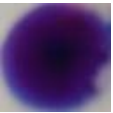
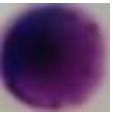
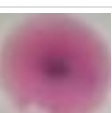
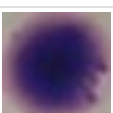
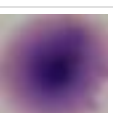
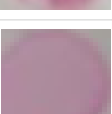
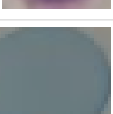
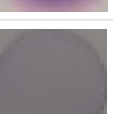
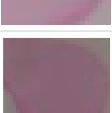
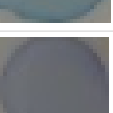
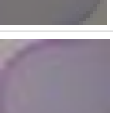
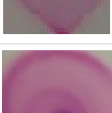
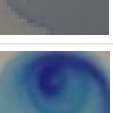
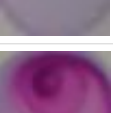
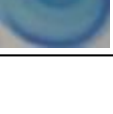
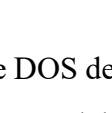
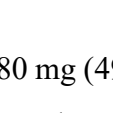
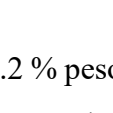
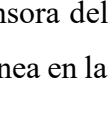
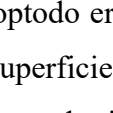
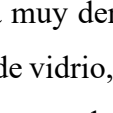
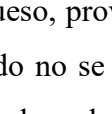
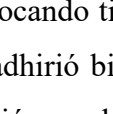
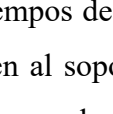
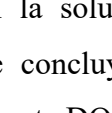
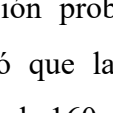
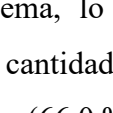
Experimentalmente, se observa que en la *Tabla 26* que para una proporción de [1:2] de polímero PVC y plastificante DOS se logró una buena fijación sobre el soporte de vidrio y visualmente las fases sensoras del optodo son homogéneas.

Tabla 26. Característica de la fase sensora del bulk-optodo para diferentes cantidades de polímero PVC y plastificante DOS, manteniendo la misma proporción [1:2].

Propuesta	Composición	NaOH	HCl	10 ⁻³ M de K ⁺
		10 mM	10 mM	
1	PVC 40 mg			
	DOS 80 mg			
2	PVC 80 mg			
	DOS 160 mg			
3	PVC 120 mg			
	DOS 240 mg			
4	PVC 160 mg			
	DOS 320 mg			

Experimentalmente, se probaron los bulk-optodos a diferentes proporciones del polímero PVC y plastificante DOS, específicamente a proporciones de [1:1], [1:1.5], [1:2], [1:2.5] y [1:3] según la *Tabla 27*. Los optodos se sintetizaron con 80 mg de PVC y con diferentes cantidades del plastificante DOS, estos presentaron diferentes grados de densidad y homogeneidad de la fase sensora del optodo, por ende, la intensidad de los colores del optodo se varió según la proporción de polímero y plastificante.

Tabla 27. Fase sensora del optodo para diferentes proporciones del polímero y plastificante, desde proporciones de [1:1] a [1:3].

Propuesta	Composición	NaOH 10 mM	HCl 10 mM	10^{-3} M de K^+
1	PVC 80 mg			
	DOS 80 mg			
2	PVC 80 mg			
	DOS 120 mg			
3	PVC 80 mg			
	DOS 160 mg			
4	PVC 80 mg			
	DOS 200 mg			
5	PVC 80 mg			
	DOS 240 mg			

Para una cantidad de plastificante DOS de 80 mg (49.2 % peso/peso) y 120 mg (59.2 % peso/peso) se observó que la fase sensora del optodo era muy densa, impidiendo que la membrana se expanda de forma homogénea en la superficie de vidrio, en este caso el espesor de la membrana del optodo fue muy grueso, provocando tiempos de respuesta largos. A lo largo del proceso de medición, el optodo no se adhirió bien al soporte y la membrana se disolvió parcialmente al contacto con la solución problema, lo que ocasiono bordes irregulares en el optodo. Entonces se concluyó que la cantidad del plastificante fue deficiente. Para una cantidad de plastificante DOS de 160 mg (66.0 % peso/peso) y 200 mg (70.8 % peso/peso) la membrana se esparció de manera regular y la transición del cambio de color del optodo fue directamente proporcional a la concentración de potasio. Finalmente, para una cantidad de plastificante DOS de 240 mg (74.4 % peso/peso) la fase sensora resultó con una densidad muy baja y no se logró formar una membrana homogénea, además la señal analítica no fue estable en el tiempo y fue cambiando hacia un color rojo para un mismo optodo a través del tiempo.

4.4.3. Optimización del valor de pH y concentración del buffer

Las optimizaciones anteriores estuvieron relacionadas con la eficiencia y el desempeño del optodo. El valor del pH del buffer del optodo está relacionado con el equilibrio de la reacción de desprotonación del cromoionóforo ETH 5294, esto influye en el rango del trabajo del optodo, por ende, en su sensibilidad analítica y en sus límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Las curvas sigmoides se realizaron según la *Tabla 12* (ver pág. 89). El bulk-optodo y nano-optodo se analizaron para pH ácidos entre 5.0 a 7.0 con el buffer acetato de sodio 20 mM con ácido acético para modificar el valor de pH y para pH alcalinos entre 7.0 a 9.0 con el buffer TRIS 20 mM con ácido clorhídrico para variar el valor de pH. Estos distintos valores de pH se evaluaron según la comparación de sus curvas sigmoides, donde el eje X fue la actividad del ion potasio (aK^+) y el eje Y fue “1- α ”. Los resultados se muestran en la *Figura 41*, donde el bulk-optodo tiene diferentes respuestas a diferentes valores de pH del buffer del optodo. Cuando el pH del buffer fue aumentando, la curva sigmoide se fue desplazando a la izquierda, debido a que se desplazó el equilibrio de la desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 controlada por el pH de la solución. Este comportamiento fue similar en ambos buffers usados como TRIS (pH 7.0 – 9.0) y acetato de sodio (pH 5.0 – 6.0). Entonces el valor del pH óptimo se escogió según el rango de trabajo del optodo necesario, en este trabajo, se escogió el valor de pH 7.0 para un rango de actividad del ion potasio (aK^+) desde 10^{-6} M a 1.0 M.

En el caso del nano-optodo, la variabilidad de pH no refleja un efecto directo sobre las curvas sigmoides, sin embargo, un factor más determinante fue el tipo de buffer entre TRIS (pH 7.0 – 9.0) y acetato de sodio (pH 5.0 – 6.0). Para el buffer TRIS se obtuvo una curva sigmoide con una mejor pendiente, comparado con la curva sigmoide con el buffer acetato de sodio. También para el buffer TRIS alcanzó un mayor porcentaje de desprotonación del cromoionóforo ETH 5294 según aumento las concentraciones de potasio.

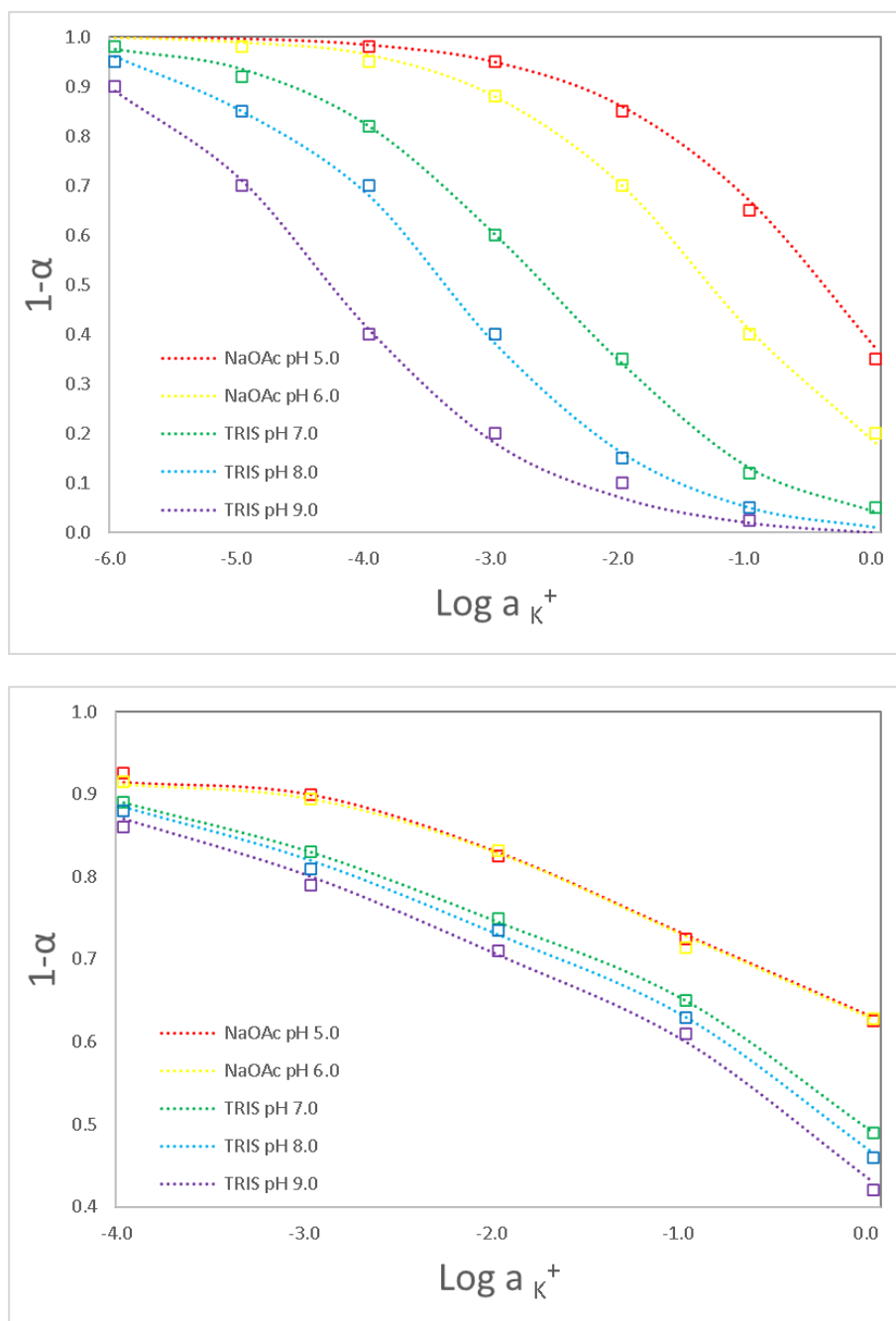


Figura 41. Curvas de calibración del modelo sigmoide para distintos valores de pH para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).

No se probaron valores de pH extremos, como pH menores a 4.2, debido a que los carbonatos presentes en la solución acuosa se disociarían a iones bicarbonato (HCO_3^-) y iones protones (H^+), entonces la liberación de protones del cromoionóforo sería difícil de controlar durante el análisis de los iones potasio. También a pH mayores de 10.0 la concentración elevada de iones hidroxilo (OH^-) del medio acuoso, haría que el buffer no

logre tamponar apropiadamente a la solución problema.

En la *Figura 42* se muestran las curvas de calibración del modelo sigmoide para distintas concentraciones del tampón buffer a pH constante. Para concentraciones de buffer de 10 mM de TRIS a pH 7.0, la capacidad de tampón del buffer fue insuficiente y la señal analítica no llegó a estabilizarse con el tiempo. Para concentraciones de 20 mM y 30 mM hubo una buena capacidad amortiguadora y no se mostró variabilidad en las curvas sigmoides estudiadas. Finalmente, para una concentración de 40 mM y 50 mM la capacidad amortiguadora fue excesiva y se observó una señal analítica inestable a través del tiempo por mucho ruido analítico, especialmente para concentraciones bajas de potasio. Esta tendencia es más pronunciada en el nano-optodo, donde para 50 mM de buffer TRIS a pH 7.0 el mayor grado de desprotonación “ $1-\alpha$ ” es bajo, con valores menores de 0.30 para “ $1-\alpha$ ”.

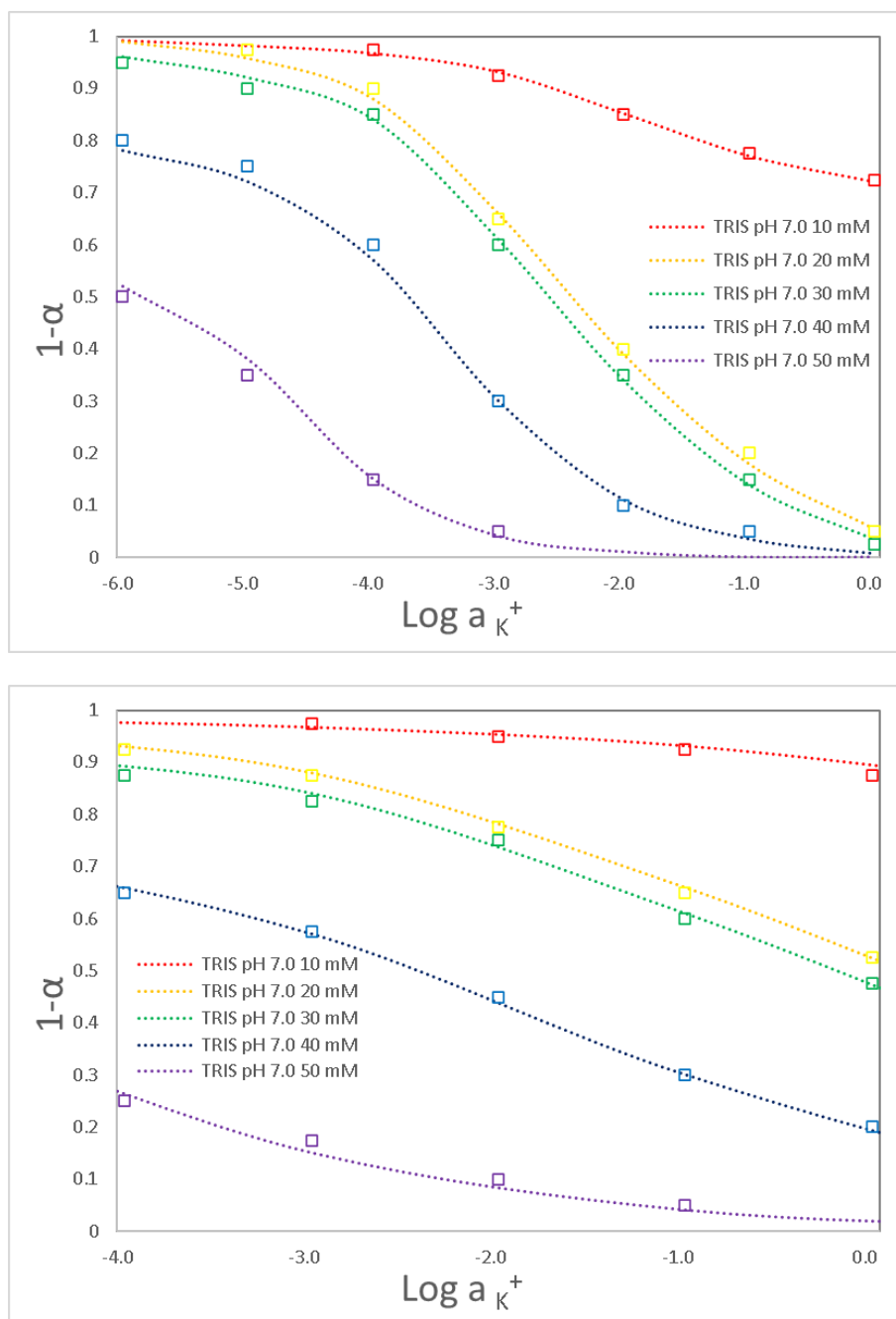


Figura 42. Curvas de calibración del modelo sigmoide para distintas concentraciones del tampón buffer a pH constante en la solución problema en contacto con el bulk-optodo (arriba) y del nano-optodo (debajo).

4.4.4. Optimización de la cantidad del surfactante

El surfactante Pluronic F-127 fue el responsable de la miniaturización de los bulk-optodos durante la síntesis de los nano-optodos. La cantidad del surfactante adecuada brindó

estabilidad al nano-optodo. Las cantidades del surfactante Pluronic F-127 que se testearon en la preparación del nano-optodo se muestran en la Tabla 14 (*ver pág. 91*). Los resultados de la *Tabla 28* mostraron que para cantidades de 10 mg (0.5 % peso/peso) y 20 mg (1.0 %) del surfactante pluronic F-127, la solución del nano-optodo fue transparente después del tratamiento de sonicación a temperatura ambiente, indicativo que los componentes activos del nano-optodo fueron completamente solubilizados. Así mismo, para cantidades de 30 mg (1.5 %), 40 mg (2.0 %) y 50 mg (2.5 %) del surfactante, la solución del nano-optodo no fue transparente después del tratamiento de sonicación a temperatura ambiente y se observó partículas blancas insolubles, residuos de pluronic F-127 no solubilizado. Por lo tanto, se necesitó un paso adicional de purificación. Con este objeto, se centrifugó a 6000 RPM por 10 minutos para separar las partículas insolubles del exceso de pluronic F-127 y después de separar las fases, se usó el sobrenadante según la metodología analítica. En resumen, se escogió para la optimización de la metodología un porcentaje de pluronic F-127 entre 0.5 a 1.0 % (peso/peso), por no necesitar un paso extra de purificación.

En la *Figura 43* se muestran las curvas sigmoides a diferentes cantidades de surfactante pluronic F-127, donde se observó que existen diferencias significativas especialmente en los extremos del $\text{Log } aK^+$, la concentración optima de pluronic F-127 fue 10 Mm, debido a que logró un grado de desprotonación ($1-\alpha$) más alto a menores concentraciones de K^+ .

Tabla 28. Nano-optodos a diferentes cantidades de surfactante pluronic F-127.

Propuesta	1	2	3	4
Cantidad del surfactante (mg)	10	20	30	40
Nano-optodo				

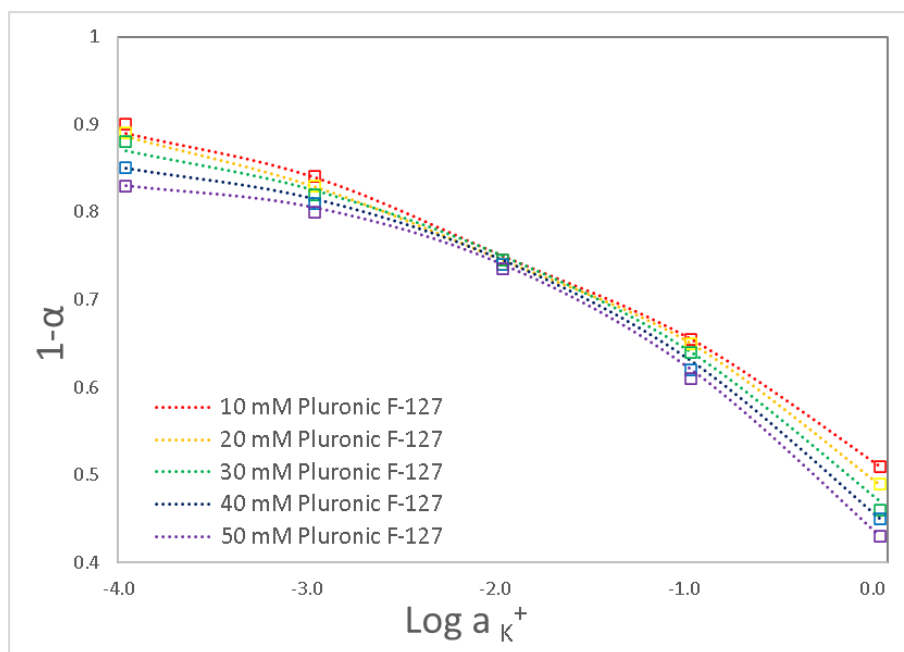


Figura 43. Curvas de calibración del modelo sigmoide para distintas concentraciones del surfactante Pluronic F-127 en la solución problema en contacto con el nano-optodo.

4.5. Validación

Todos los ensayos experimentales realizados durante la validación de esta sección se hicieron para el bulk-optodo y el nano-optodo. Esto debido a que el desempeño de ambos optodos es diferente, en términos de selectividad, sensibilidad, precisión y veracidad, debido probablemente a un diferente mecanismo de cuantificación de iones potasio.

4.5.1. Normalidad de los datos

El análisis estadístico de la normalidad de los datos experimentales necesita un grupo grande de datos. En esta sección se usaron los valores provenientes del análisis de precisión, específicamente de la repetibilidad a varias concentraciones de potasio. Los valores incluyen un amplio rango de concentración de potasio para el bulk-optodo y nano-optodo. Los gráficos de la *Figura 44* son un resumen de la información estadística, incluyendo los valores de $p\text{-value} > 0.05$ de la prueba Anderson-Darling, tanto para el bulk-optodo y nano-optodo en todo el rango de concentraciones de potasio. Como se observa de la *Figura 44*, los resultados del optodo como concentración de iones potasio tienen una distribución normal y, por tanto, se pueden utilizar métodos estadísticos paramétricos para la validación analítica.

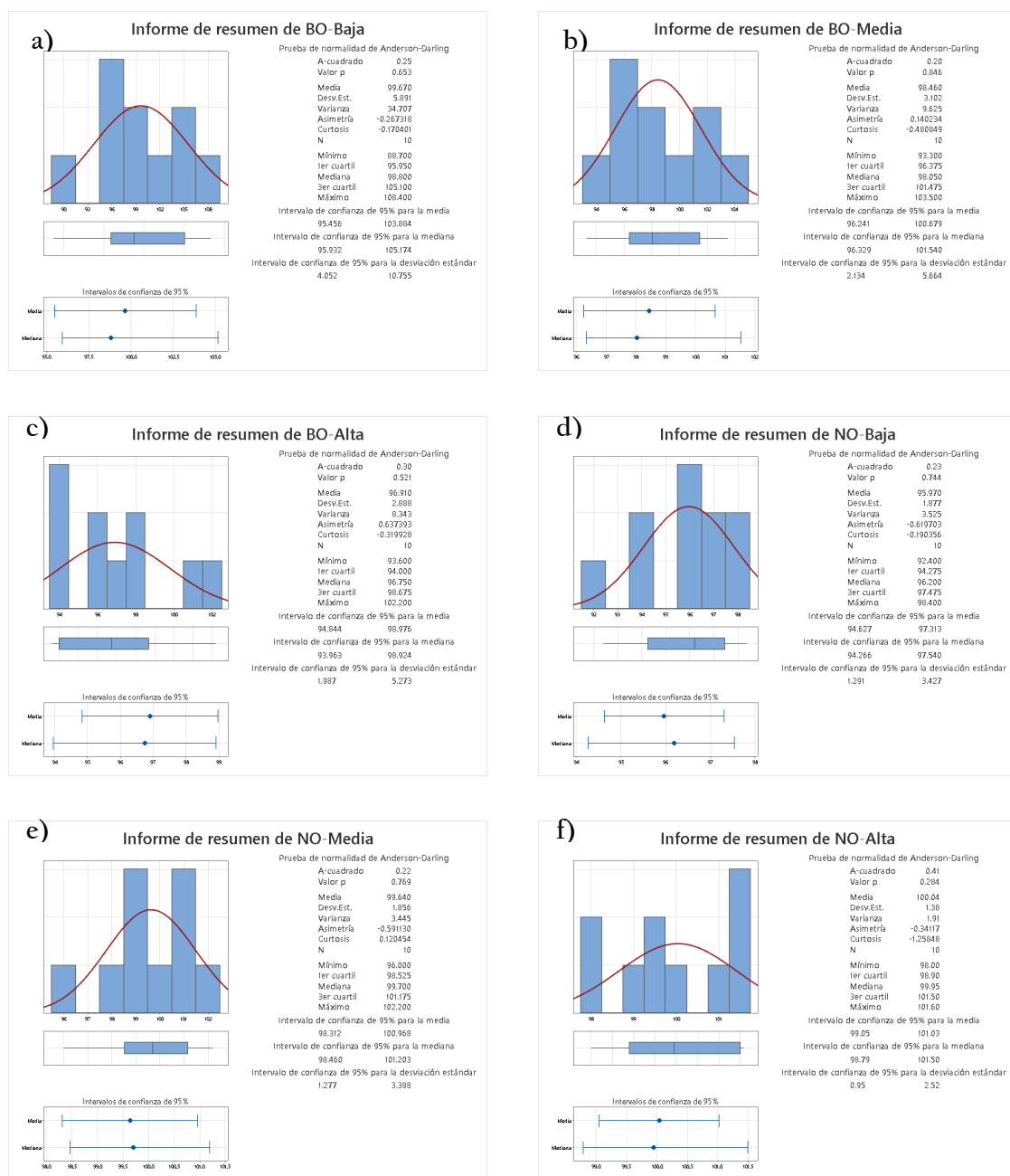


Figura 44. Distribución estadística de los resultados de concentración de potasio obtenidos por el bulk-optodo a 10^{-6} M (a), 10^{-3} M (b), 1.0 M (c) y por el nano-optodo a 10^{-4} M (d), 10^{-2} M (e), 1.0 M (f), incluyendo el histograma y la prueba de normalidad Anderson-Darling.

4.5.2. Selectividad

El análisis de selectividad se realizó según la Tabla 15 (ver pág. 92), donde se evaluó el impacto directo sobre la señal de respuesta del optodo para iones potasio en presencia de otros iones interferentes de metales alcalinos y alcalinotérreos. En la Tabla 16 (ver pág. 93)

se presenta la evaluación de la respuesta del ionóforo valinomicina a formar complejos estables con otros iones interferentes diferentes al ion potasio, por comparación de las curvas sigmoides para cada ion individualmente. Los resultados de la *Figura 45* muestran las curvas sigmoides de los iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). Estas curvas describen el comportamiento del optodo en presencia de estos iones y su interacción en la formación de complejos con el ionóforo valinomicina.

La interpretación de los coeficientes de selectividad fue determinada por el sesgo de las curvas sigmoides a “ $1-\alpha = 0.5$ ”, esta distancia entre las curvas sigmoides fue interpretada como el coeficiente de selectividad del optodo sobre ese ion interferente, donde a valores de sesgo más grande se obtuvieron mejores selectividades o menores interferencias en la cuantificación de iones potasio por parte del optodo. Los valores obtenidos de la *Tabla 29* de coeficiente de selectividad para el bulk-optodo fueron de 1.79 para el ion sodio ($k_{\text{K}^+\text{Na}^+}^{\text{opt}}$), 3.45 para el ion litio ($k_{\text{K}^+\text{Li}^+}^{\text{opt}}$), de 2.09 para el ion calcio ($k_{\text{K}^+\text{Ca}^{2+}}^{\text{opt}}$) y 2.20 para el ion magnesio ($k_{\text{K}^+\text{Mg}^{2+}}^{\text{opt}}$). Los valores de coeficiente de selectividad para el nano-optodo fueron de 3.04 para el ion sodio ($k_{\text{K}^+\text{Na}^+}^{\text{opt}}$), 3.21 para el ion litio ($k_{\text{K}^+\text{Li}^+}^{\text{opt}}$), de 4.01 para el ion calcio ($k_{\text{K}^+\text{Ca}^{2+}}^{\text{opt}}$) y 4.20 para el ion magnesio ($k_{\text{K}^+\text{Mg}^{2+}}^{\text{opt}}$). Los resultados más bajos para el Na^+ en ambos sensores fueron coherentes para la interacción entre el ionóforo valinomicina y iones de carga +1 debido a que el radio iónico del sodio es similar al radio iónico del potasio, por ello, la interacción estérica es similar y por ello, se obtuvo coeficiente de selectividad más bajos. Para iones de carga +2 como el ion calcio o magnesio, estos formaron complejos no tan estables, es decir, no interfieren con la cuantificación de los iones potasio por el ionóforo valinomicina. Esto explica que los coeficientes de selectividad de estos iones de carga +2 sean más altos que los obtenidos en presencia de iones de carga +1, como se muestra en la *Tabla 29* (Bamsey et al., 2012).

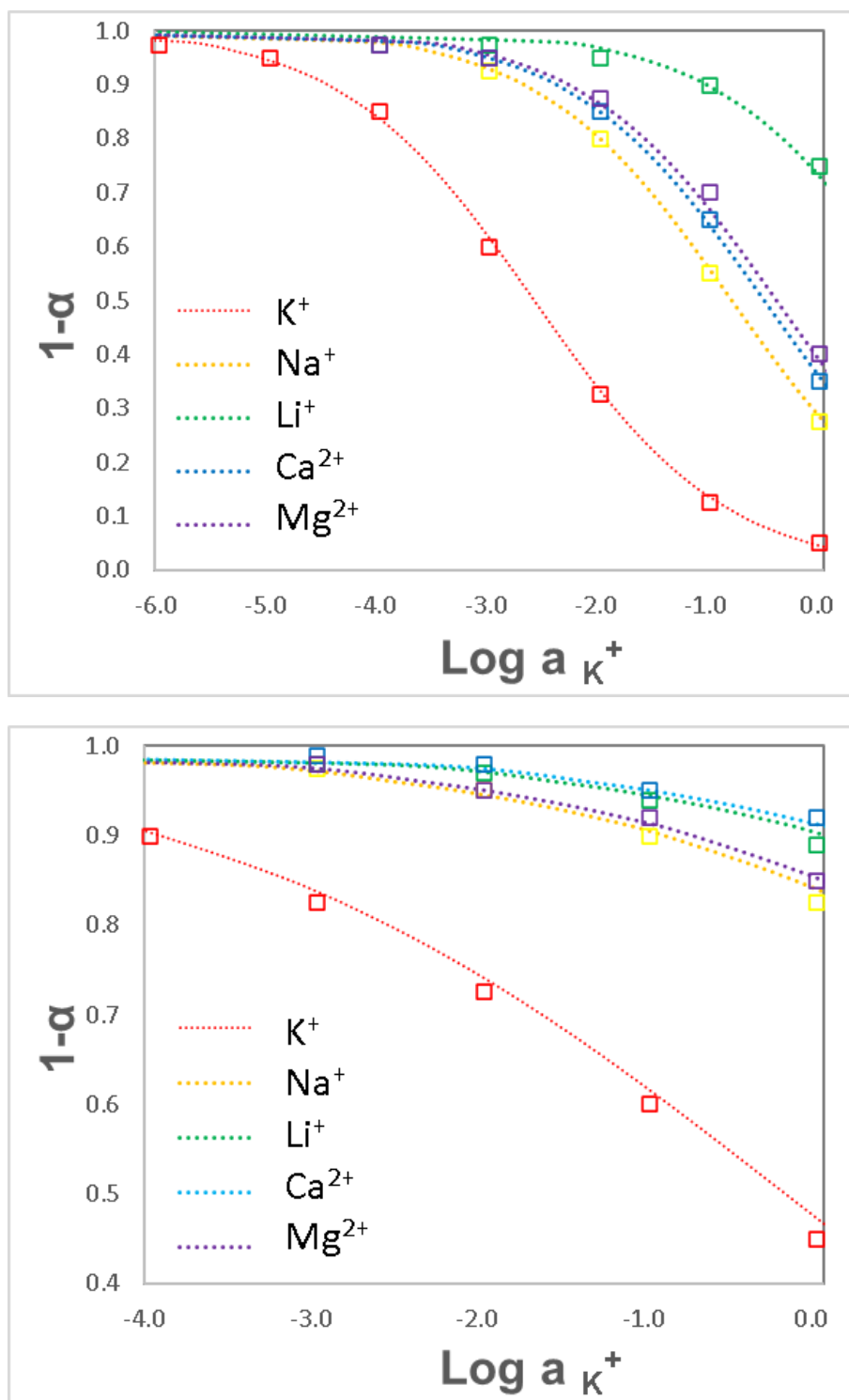


Figura 45. Curvas de respuesta del modelo sigmoide para el ion analito potasio y distintos iones interferentes para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).

Tabla 29. Valores de coeficiente de selectividad del bulk-optodo y nano-optodo para potasio basado en la formación de complejos del ionóforo valinomicina frente a iones interferentes.

Log $K^+ - j^+$				
j = interferente	Na^+	Li^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
Bulk optodo	1.79	3.45	2.09	2.20
Nano optodo	3.04	3.21	4.01	4.20

En el análisis estadístico de “prueba t-student de una muestra” correspondiente a la Tabla 31 se propuso como una hipótesis nula: los coeficientes de selectividad = 1 y como hipótesis alterna: los coeficientes de selectividad > 1, donde se espera que el valor de *p-value* para todos los interferentes de ambos optodos sea menor al nivel de significancia del 95 % (< 0.05), caso contrario se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna. Como se observa de la Tabla 31 el coeficiente *p-value* es menor que 0.05 en todos los casos, por lo que los resultados obtenidos estadísticamente son aceptables. En resumen, para los cuatro principales interferentes parecidos al ion potasio (K^+) como el ion sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}) se determinó un coeficiente de selectividad mayor a 1.0, es decir, el impacto de una concentración de interferente equivalente a la concentración de potasio aporta menos de un 10 % de error a la concentración final de potasio.

Tabla 30. Prueba estadística de t-student de 1 muestra para los coeficientes de selectividad de los interferentes, donde la una hipótesis nula es igual a 1, a un nivel de confianza del 95 %.

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	Límite inferior de la de 95% para μ
Na+ BO	3	1.7900	0.0895	0.0517	1.6391
Na+ NO	3	3.0400	0.1520	0.0878	2.7838
Li+ BO	3	3.4500	0.1725	0.0996	3.1592
Li+ NO	3	3.2100	0.1605	0.0927	2.9394
Ca2+ BO	3	2.0900	0.1045	0.0603	1.9138
Ca2+ NO	3	4.010	0.200	0.116	3.672
Mg2+ BO	3	2.2000	0.1100	0.0635	2.0146
Mg2+ NO	3	4.200	0.210	0.121	3.846

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 1$
Hipótesis alterna $H_1: \mu > 1$

Muestra	Valor T	Valor p
Na+ BO	15.29	0.002
Na+ NO	23.25	0.001
Li+ BO	24.60	0.001
Li+ NO	23.85	0.001
Ca2+ BO	18.07	0.002
Ca2+ NO	26.00	0.001
Mg2+ BO	18.90	0.001
Mg2+ NO	26.39	0.001

Los resultados del porcentaje de recuperación de la concentración de potasio en presencia de los iones interferentes se presentan en la *Tabla 31*. En esta tabla se describió el comportamiento del nano-optodo ante la presencia de tres niveles de potasio (10^{-4} , 10^{-2} y 1.0 M), en los cuales se añadió tres niveles de interferentes (10^{-4} , 10^{-2} y 1.0 M) de iones sodio (Na^+), litio (Li^+), calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). Se estudió la desviación de la señal de respuesta del nano-optodo ante la presencia de interferentes, debido a que existe una competencia en la capacidad de acomplejamiento al ionóforo valinomicina. Como se observa de la *Tabla 31*, los porcentajes de recuperación de la concentración de iones potasio fueron aceptables para el nano-optodo, tomando en cuenta la tolerancia máxima permitida por el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ cuando la concentración del interferente no sea superior de potasio. En los casos de 10^{-4} M de potasio en presencia de 10^{-2} de interferente se obtuvo una recuperación de 115.1 % para sodio y 111.2 % para litio. En el caso de estudio, donde se adiciono los cuatro iones interferentes juntos se produjo un efecto aditivo alcanzando hasta 116.0 % de potasio cuantificado, siendo el exceso por el efecto de error positivo de los interferentes. Este comportamiento se puede explicar por la acumulación de las interferencias individuales de los iones, adicionalmente por el efecto matriz y el aumento de la fuerza iónica debido a la acumulación de aniones como cloruros, nitratos y sulfatos como contraiones de los interferentes (Chiu et al., 2010).

En el caso del nano-optodo, el interferente no afecta el porcentaje de recuperación del analito, es decir, el porcentaje de recuperación de potasio es relativamente igual a cualquier proporción de interferente (100%). Esto se debe a que el nano-optodo está aislado dentro de la fase orgánica del optodo, dentro de la micela y el excedente del interferente se queda fuera de la micela, en la fase acuosa y no interactúa con la fase sensora del nano-optodo.

Tabla 31. Porcentajes de recuperación para tres niveles de concentración de potasio obtenidos por el nano-optodo ante la presencia de tres niveles de concentración de los interferentes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} .

		Na ⁺			Li ⁺			Ca ⁺²			Mg ⁺²			Na ⁺ - Li ⁺ - Ca ⁺² - Mg ⁺²		
		Concentracion de Interferente (M)														
		10 ⁻⁴	10 ⁻²	1.0	10 ⁻⁴	10 ⁻²	1.0	10 ⁻⁴	10 ⁻²	1.0	10 ⁻⁴	10 ⁻²	1.0	10 ⁻⁴	10 ⁻²	1.0
Concentración de potasio (M)	10 ⁻⁴	103.1	115.1	-	102.1	111.2	-	100.6	104.0	-	100.6	103.6	-	116.0	-	-
	10 ⁻²	100.2	101.9	109.2	100.1	101.6	106.2	100.0	100.5	103.5	100.0	100.4	102.8	100.8	111.0	-
	1.0	100.1	100.3	101.0	100.1	100.2	100.7	100.0	100.1	100.3	100.0	100.1	100.3	100.5	101.8	105.7

En el análisis estadístico de “ANOVA de un factor” de la *Tabla 32* se propuso como una hipótesis nula: los porcentajes de recuperación del nano-optodo en presencia de interferentes son iguales y la hipótesis alterna: los porcentajes de recuperación de potasio son diferentes, donde el *p-value* para todos los interferentes de ambos optodos es menor al nivel de significancia del 95 % (< 0.05). Caso contrario se rechaza y se acepta la hipótesis alterna, es decir, al menos una concentración de potasio es diferente al resto, por la presencia de interferentes.

Tabla 32. Prueba de “ANOVA de un factor” para el nano-optodo, donde la hipótesis nula es todos los valores de porcentaje de recuperación de concentración de potasio en presencia de interferentes son iguales, a un nivel de confianza al 95 %.

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

	Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
	Factor	14	877.3	62.66	2.36	0.024
	Error	30	797.9	26.60		
	Total	44	1675.2			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
10 ⁻⁴ K - 10 ⁻⁴ Na ⁺	3	103.10	5.16	(97.02; 109.18)
10 ⁻⁴ K - 10 ⁻⁴ Li ⁺	3	102.10	5.11	(96.02; 108.18)
10 ⁻⁴ K - 10 ⁻⁴ Ca ²⁺	3	100.60	5.03	(94.52; 106.68)
10 ⁻⁴ K - 10 ⁻⁴ Mg ²⁺	3	100.60	5.03	(94.52; 106.68)
10 ⁻⁴ K - 10 ⁻⁴ 4 iones	3	116.00	5.80	(109.92; 122.08)
10 ⁻² K - 10 ⁻² Na ⁺	3	101.89	5.09	(95.81; 107.97)
10 ⁻² K - 10 ⁻² Li ⁺	3	101.56	5.08	(95.48; 107.64)
10 ⁻² K - 10 ⁻² Ca ²⁺	3	100.51	5.03	(94.43; 106.59)
10 ⁻² K - 10 ⁻² Mg ²⁺	3	100.41	5.02	(94.33; 106.49)
10 ⁻² K - 10 ⁻² 4 iones	3	110.97	5.55	(104.89; 117.05)
1.0 K - 1.0 Na ⁺	3	100.99	5.05	(94.91; 107.07)
1.0 K - 1.0 Li ⁺	3	100.66	5.03	(94.58; 106.74)
1.0 K - 1.0 Ca ²⁺	3	100.31	5.02	(94.23; 106.39)
1.0 K - 1.0 Mg ²⁺	3	100.31	5.02	(94.23; 106.39)
1.0 K - 1.0 4 iones	3	105.72	5.29	(99.64; 111.80)

Desv.Est. agrupada = 5.15716

En la *Figura 46* se muestran los valores de porcentaje de recuperación de la concentración de potasio en el nano-optodo en presencia de los interferentes Na⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺. En el caso del nano-optodo, para los interferentes individuales, los intervalos estuvieron dentro del rango 90 % a 110 %, excepto para los casos en los cuales, los cuatro interferentes están juntos, para la concentración de 10⁻⁴, 10⁻² y 1.0 M los valores de porcentaje de recuperación fueron 116.0, 110.9 y 105.7 % respectivamente. En resumen, la presencia de los interferentes juntos, obtuvieron valores de recuperación de potasio alejados del 100 %, debido al aumento de la fuerza iónica en la matriz, que perjudica el

acomplejamiento con la valinomicina.

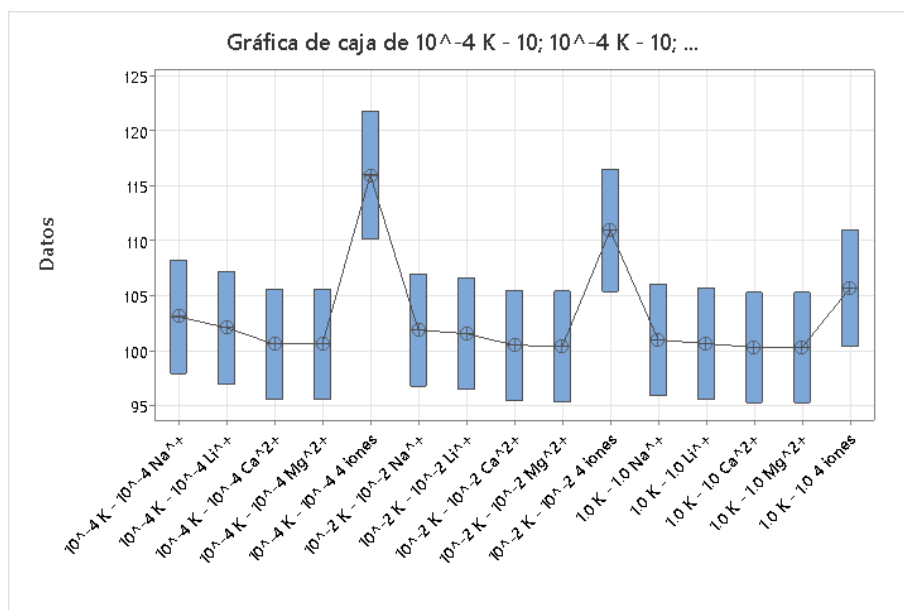


Figura 46. Gráfica de barras de los porcentajes de recuperación de concentración de potasio en presencia de interferentes Na⁺, Li⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, donde la barra representa la desviación estándar relativa (5 %).

4.5.3. Sensibilidad

El cálculo de la sensibilidad del bulk-optodo y del nano-optodo se realizó según la *Tabla 17* (ver pág. 93). Los valores se obtuvieron de una serie de 10 repeticiones de una concentración de potasio correspondiente al límite inferior de concentración de potasio, llamado como blanco fortificado de potasio, que para el bulk-optodo corresponde a 10^{-4} M y para el nano-optodo 10^{-6} M de potasio.

Los resultados obtenidos se efectuaron en el mismo día, para probar la estabilidad de las mediciones y estos se presentan en la *Tabla 33*, obteniendo un valor de desviación estándar $\sigma = 1.05 \times 10^{-7}$ para el bulk-optodo y $\sigma = 1.01 \times 10^{-5}$ para el nano-optodo. A partir de la desviación estándar de la concentración de potasio se calculó el límite de detección de potasio, LD = 0.31 μ M (3.15×10^{-7} M) y el límite de cuantificación, LC = 1.05 μ M (1.05×10^{-6} M) para el bulk-optodo y el límite de detección de potasio, LD = 30.3 μ M (3.03×10^{-5} M) y el límite de cuantificación, LC = 101 μ M (1.01×10^{-4} M) para el nano-optodo según la metodología propuesta.

Tabla 33. Estimación del límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) a partir de la desviación estándar de un blanco fortificado de 10^{-6} M de potasio para el bulk-optodo y de 10^{-4} M de potasio para el nano-optodo.

	Bulk optodo	Nano optodo
Número de mediciones	Blanco fortificado	
1	1.24×10^{-6}	1.02×10^{-4}
2	1.08×10^{-6}	1.00×10^{-4}
3	1.20×10^{-6}	1.14×10^{-4}
4	1.05×10^{-6}	1.20×10^{-4}
5	1.14×10^{-6}	1.09×10^{-4}
6	1.12×10^{-6}	0.90×10^{-4}
7	0.94×10^{-6}	1.15×10^{-4}
8	1.09×10^{-6}	1.20×10^{-4}
9	0.95×10^{-6}	1.00×10^{-4}
10	1.23×10^{-6}	1.00×10^{-4}
Desviación estándar (σ)	1.05×10^{-7}	1.01×10^{-5}
Desviación estándar relativa (RSD)	9.52	9.43
Límite de detección (LD) LD = 3σ	3.15×10^{-7}	3.03×10^{-5}
Límite de cuantificación (LC) LD = 10σ	1.05×10^{-6}	1.01×10^{-4}

4.5.4. Precisión

La repetibilidad y reproducibilidad del optodo se analizó según la *Tabla 18* (ver pág. 94). A partir de la estimación de la desviación estándar relativa (RSD) a varios niveles de concentración de potasio en condiciones de repetibilidad (mediciones realizadas por el mismo

analista) y condiciones de reproducibilidad (mediciones realizadas por diferentes analistas). La desviación estándar en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad del optodo fue verificada por la comparación con el $RSD_{Horwitz}$ a varios niveles de concentración de potasio.

Para el bulk-optodo a una concentración media de 10^{-3} M de potasio (BO-Media) se obtuvo un valor fuera de rango de tolerancia ($RSD_{Horwitz} = 4.0 \%$) y para 1.0 M de potasio en el bulk-optodo (BO-Alta) se obtuvo 7 valores fuera del rango de tolerancia ($RSD_{Horwitz} = 2.0 \%$). Es claro que a mayores concentraciones de potasio se pierde la repetibilidad de mediciones en el bulk-optodo. En el caso del nano-optodo solamente para la concentración alta de 1.0 M de potasio (NO-Alta) se reportó un valor fuera del rango de tolerancia ($RSD_{Horwitz} = 2.0 \%$). Esto no afecta las aplicaciones en suelos pues normalmente las concentraciones de K^+ no sobrepasan 10^{-2} M.

Para la estimación de la repetibilidad se procedió a un análisis intra-ensayo (solo un analista) con diez mediciones seguidas para cada nivel de concentración de 1.0 M, 10^{-3} M y 10^{-6} M de potasio para el bulk-optodo y 1.0 M, 10^{-2} M y 10^{-4} M de potasio para el nano-optodo. Para la estimación de la reproducibilidad se procedió a un análisis inter-ensayo (diferentes analistas) con cinco mediciones seguidas para tres diferentes analistas para las mismas concentraciones de potasio en el análisis de repetibilidad para ambos optodos. Para el bulk-optodo a una concentración alta de 1.0 M de potasio (BO-Alta) se obtuvieron cuatro valores fuera de rango de tolerancia ($RSD_{Horwitz} = 2.0 \%$), donde A1, A2, A3 corresponden a los resultados obtenidos por diferentes analistas. Para las concentraciones de 10^{-3} y 10^{-6} , los resultados obtenidos por el bulk-optodo son aceptables. Sin embargo, para el caso del nano-optodo todos los resultados fueron aceptables.

La estimación del RSD_r (repetibilidad) para el bulk-optodo y nano-optodo se presentan en la *Tabla 34* y los gráficos de control del RSD_r se muestran en la *Figura 47*. La estimación del RSD_R (reproducibilidad) para el bulk-optodo y nano-optodo se muestran en la *Tabla 35* y los gráficos de control del RSD_R se presentan en la *Figura 48*. Los límites de tolerancia teórica del $RSD_{Horwitz}$ se hacen más estrictos al aumentar la concentración del analito. En contraposición, los resultados experimentales mostraron una tendencia para el bulk-optodo a aumentar la variabilidad en la concentración de potasio a una concentración elevada de 1M.

Tabla 34. Análisis de la repetibilidad en las mediciones del optodo a varios niveles de concentración de iones potasio para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).

Concentración de potasio (M)	Mediciones repetidas para el bulk-optodo										Promedio	RSD _r	RSD Horwitz
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10 ⁻⁶	0.96x10 ⁻⁶	1.03x10 ⁻⁶	1.06x10 ⁻⁶	0.99x10 ⁻⁶	0.96x10 ⁻⁶	0.89x10 ⁻⁶	1.08x10 ⁻⁶	1.05x10 ⁻⁶	0.98x10 ⁻⁶	0.96x10 ⁻⁶	1.00x10 ⁻⁶	5.66	16.00
10 ⁻³	1.01x10 ⁻³	0.93x10 ⁻³	1.03x10 ⁻³	0.99x10 ⁻³	0.96x10 ⁻³	0.96x10 ⁻³	0.98x10 ⁻³	1.02x10 ⁻³	0.97x10 ⁻³	0.98x10 ⁻³	0.98x10 ⁻³	2.99	5.66
1.00	1.02	1.01	0.98	0.96	0.94	0.97	0.94	0.94	0.96	0.98	0.97	3.04	2.00

Concentración de potasio (M)	Mediciones repetidas para el nano-optodo										Promedio	RSD _r	RSD Horwitz
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
10 ⁻⁴	0.92x10 ⁻⁴	0.96x10 ⁻⁴	0.96x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴	0.94x10 ⁻⁴	0.94x10 ⁻⁴	0.98x10 ⁻⁴	0.96x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴	0.98x10 ⁻⁴	0.96x10 ⁻⁴	1.91	8.00
10 ⁻²	0.99x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	1.02x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	0.99x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²	0.96x10 ⁻²	0.98x10 ⁻²	0.99x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²	1.82	4.00
1.00	1.01	1.00	1.00	1.02	0.99	0.98	0.98	1.01	1.00	1.01	1.00	1.26	2.00

Tabla 35. Análisis de la reproducibilidad en las mediciones del optodo a varios niveles de concentración de iones potasio para el bulk-optodo (Arriba) y para el nano-optodo (Abajo).

Concentración de potasio (M)	Analista	Mediciones repetidas para el bulk-optodo					Promedio	RSD _R	RSD Horwitz
		1	2	3	4	5			
10 ⁻⁶	A1	1.05x10 ⁻⁶	0.99x10 ⁻⁶	0.98x10 ⁻⁶	0.99x10 ⁻⁶	1.03x10 ⁻⁶	1.01x10 ⁻⁶	7.06	16.00
	A2	1.03x10 ⁻⁶	1.00x10 ⁻⁶	0.98x10 ⁻⁶	0.91x10 ⁻⁶	0.93x10 ⁻⁶	0.97x10 ⁻⁶		
	A3	0.87x10 ⁻⁶	0.86x10 ⁻⁶	0.97x10 ⁻⁶	1.02x10 ⁻⁶	0.97x10 ⁻⁶	0.94x10 ⁻⁶		
10 ⁻³	A1	1.05x10 ⁻⁴	1.03x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	1.02x10 ⁻⁴	1.01x10 ⁻⁴	4.55	5.66
	A2	1.03x10 ⁻⁴	1.02x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	0.95x10 ⁻⁴	1.00x10 ⁻⁴	1.00x10 ⁻⁴		
	A3	0.94x10 ⁻⁴	0.93x10 ⁻⁴	0.94x10 ⁻⁴	1.01x10 ⁻⁴	1.06x10 ⁻⁴	0.98x10 ⁻⁴		
1.00	A1	1.00	1.01	1.00	0.97	1.00	1.00	2.22	2.00
	A2	1.00	1.02	1.04	1.00	1.02	1.02		
	A3	1.02	1.01	1.01	0.99	0.97	1.00		

Concentración de potasio (M)	Analista	Mediciones repetidas para el nano-optodo					Promedio	RSD _R	RSD Horwitz
		1	2	3	4	5			
10 ⁻⁴	A1	1.02x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	0.93x10 ⁻⁴	0.96x10 ⁻⁴	0.94x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴	3.48	8.00
	A2	0.94x10 ⁻⁴	0.96x10 ⁻⁴	1.00x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴		
	A3	0.99x10 ⁻⁴	1.04x10 ⁻⁴	1.02x10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻⁴	0.99x10 ⁻⁴	1.00x10 ⁻⁴		
10 ⁻²	A1	1.01x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²	1.02x10 ⁻²	1.03x10 ⁻²	0.98x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	2.01	4.00
	A2	1.00x10 ⁻²	0.99x10 ⁻²	0.99x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²		
	A3	0.96x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²	1.01x10 ⁻²	1.02x10 ⁻²	1.00x10 ⁻²		
1.00	A1	0.98	1.01	1.01	1.02	0.99	1.00	1.42	2.00
	A2	1.01	1.01	0.99	1.00	1.01	1.00		
	A3	0.99	1.00	0.99	1.02	1.01	1.00		

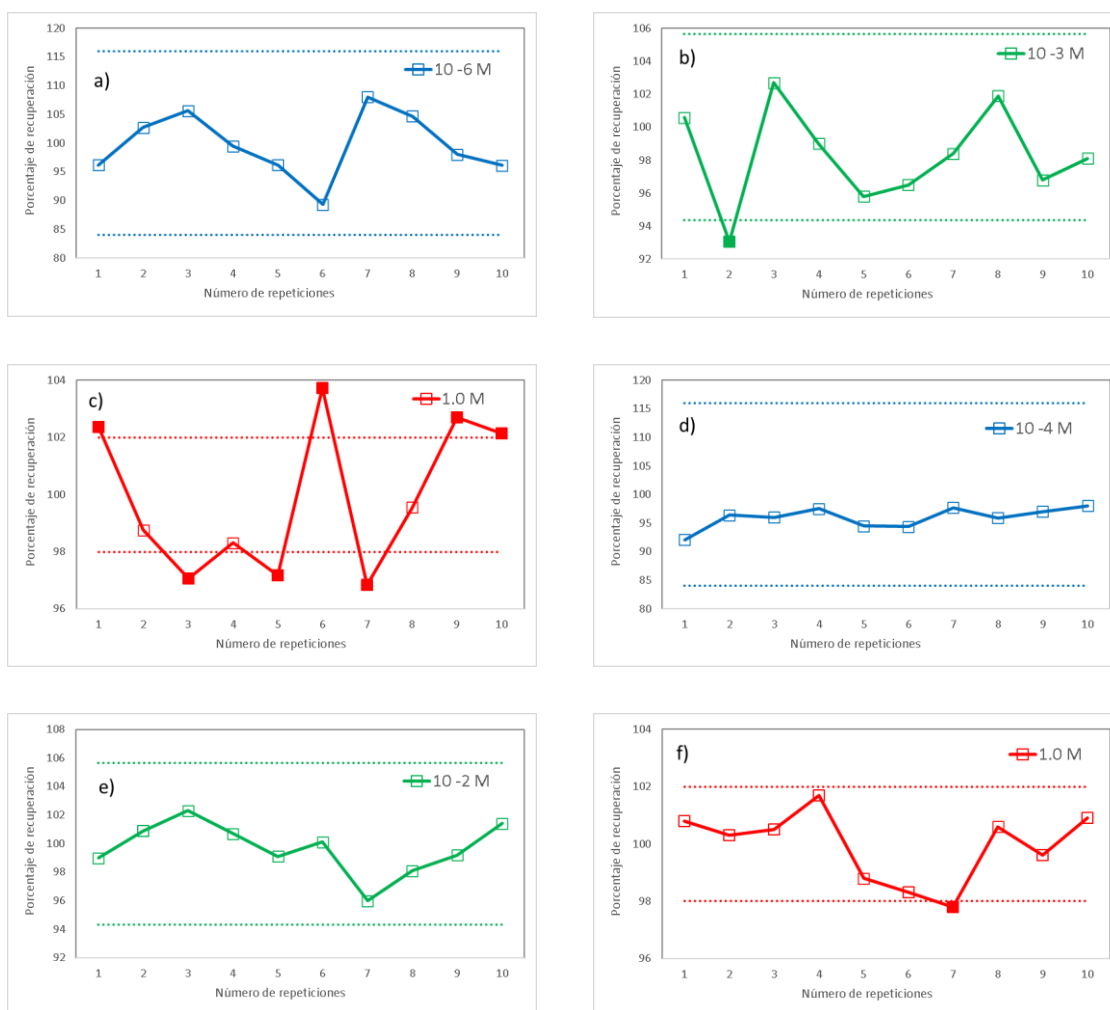


Figura 47. Repetibilidad analítica de las mediciones a tres niveles de concentración de potasio. Repetibilidad del bulk-optodo a 10^{-6} M (a), 10^{-3} M (b) y 1.0 M (c) de potasio. Repetibilidad del nano-optodo a 10^{-4} M (d), 10^{-2} M (e) y 1.0 M (f) de potasio, donde las líneas punteadas horizontales representan los límites superiores e inferiores según el RSD_{Horwitz} para cada nivel de concentración de potasio y los valores de cuadros coloreados se escapan de los límites de tolerancia.

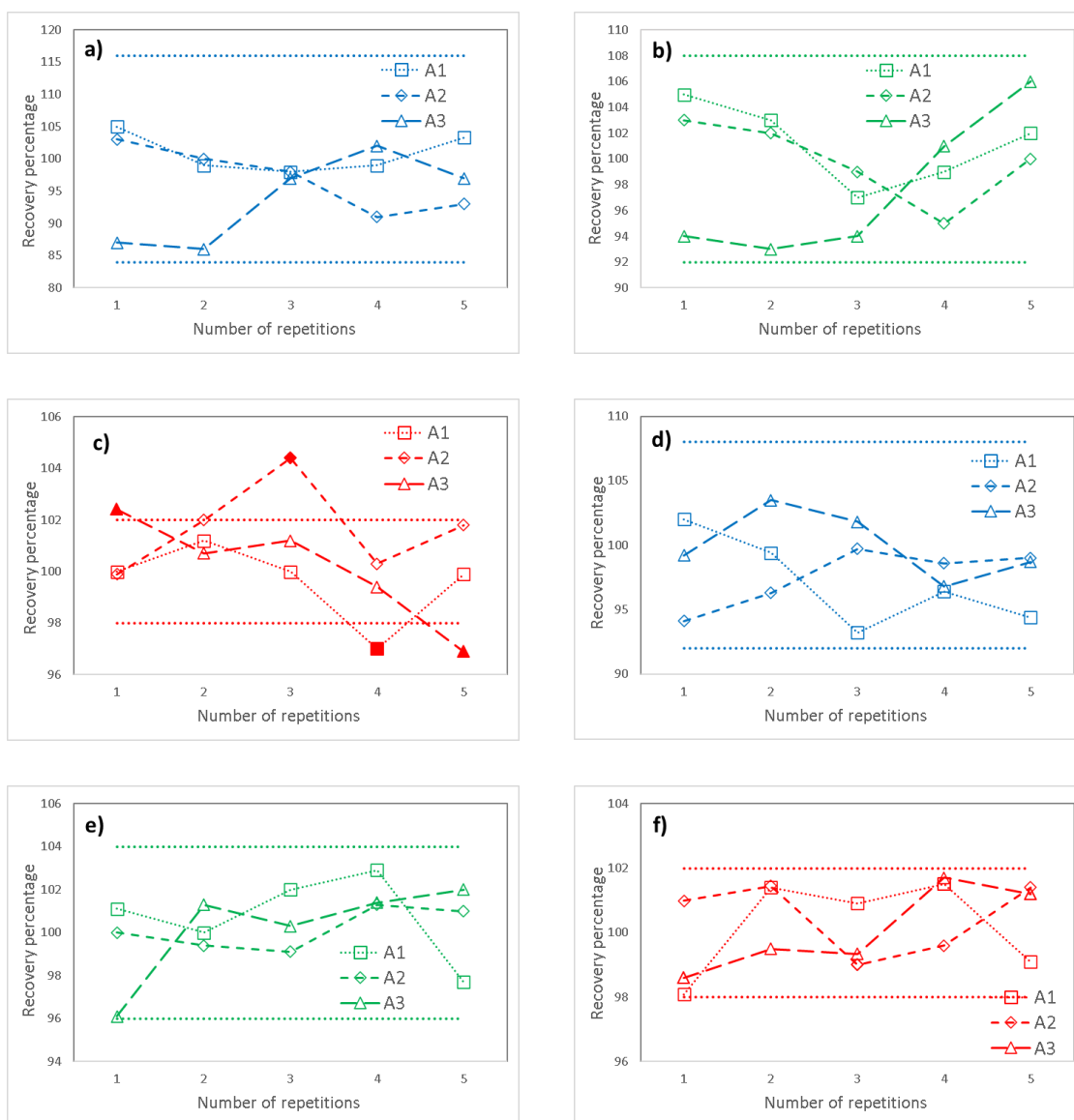


Figura 48. Reproducibilidad analítica de las mediciones a tres niveles de concentración de potasio. Reproducibilidad del bulk-optodo a 10^{-6} M (a), 10^{-3} M (b) y 1.0 M (c) de potasio. Reproducibilidad del nano-optodo a 10^{-4} M (d), 10^{-2} M (e) y 1.0 M (f) de potasio, donde las líneas punteadas representan los límites superiores e inferiores según el $RSD_{Horwitz}$ y los valores de cuadros coloreados se escapan de los límites de tolerancia.

En el análisis estadístico de “ANOVA de un factor” de la *Tabla 36* se propuso una como hipótesis nula: los porcentajes de recuperación de potasio del bulk-optodo y nano-optodo bajo condiciones de repetibilidad son iguales y la hipótesis alterna: los porcentajes de recuperación de potasio no son iguales, donde el *p-value* para los tres niveles de

concentración de potasio fueron menores al nivel de significancia al 95 % (< 0.05). Caso contrario se rechaza, al menos una concentración de potasio es diferente al resto de su grupo en condiciones de repetibilidad.

Tabla 36. Prueba de ANOVA de un factor para el bulk-optodo y nano-optodo, donde la hipótesis nula es todos los valores de porcentaje de recuperación de concentración de potasio en condiciones de repetibilidad son iguales, a un nivel de confianza al 95 %.

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	5	139.5	27.91	2.72	0.029
Error	54	554.0	10.26		
Total	59	693.5			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BO Baja	10	99.67	5.89	(97.64; 101.70)
BO Media	10	98.460	3.102	(96.429; 100.491)
BO Alta	10	96.910	2.888	(94.879; 98.941)
NO Baja	10	95.970	1.877	(93.939; 98.001)
NO Media	10	99.640	1.856	(97.609; 101.671)
NO Alta	10	100.040	1.382	(98.009; 102.071)

Desv.Est. agrupada = 3.20296

La *Figura 49* muestra el gráfico de barras, incluyendo la media aritmética y la dispersión de la recuperación de potasio en condiciones de repetibilidad, considerando el mismo analista, mismo equipo de medición, mismos reactivos y en un tiempo de análisis corto. Los resultados tienen una media entre el 95 % a 105 % para todas las concentraciones.

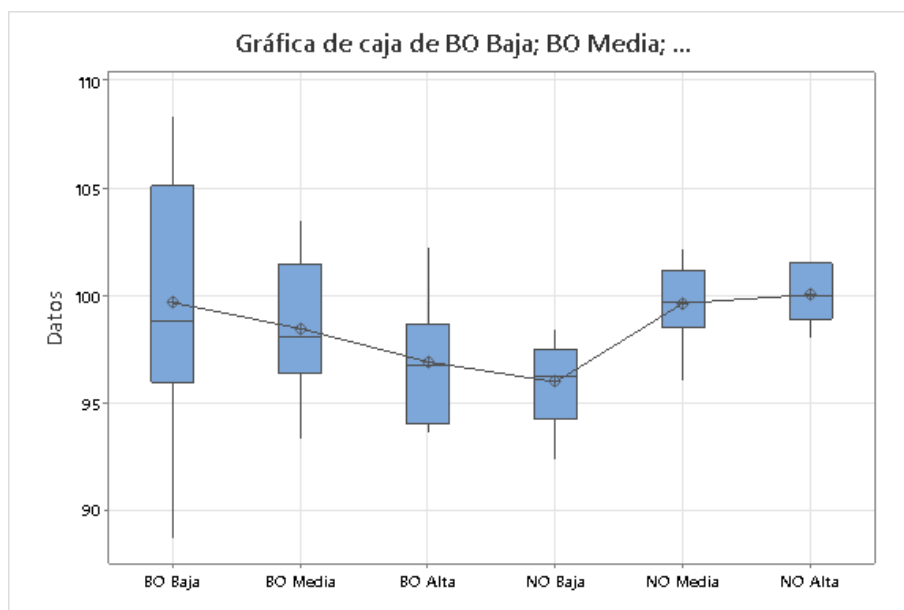


Figura 49. Gráfica de cajas de la variabilidad en condiciones de repetibilidad a tres niveles de concentración de potasio para el bulk-optodo y nano-optodo.

En el análisis estadístico de “ANOVA de un factor” de la *Tabla 37*, que corresponde a los resultados obtenidos por 3 analistas diferentes, Se propuso como una hipótesis nula: los porcentajes de recuperación de potasio del bulk-optodo y nano-optodo bajo condiciones de reproducibilidad son iguales y como hipótesis alterna: los porcentajes de recuperación de potasio no son iguales. Si el *p-value* es menor que 0.05 se acepta el resultado. Caso contrario no se acepta. Para los tres niveles de concentración de potasio en el bulk-optodo y nano-optodo se obtuvieron valores de *p-value* igual a 0.069 y 0.095, respectivamente. Entonces, se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, es decir, que todas las concentraciones de potasio son estadísticamente iguales, bajo condiciones de reproducibilidad.

Tabla 37. Prueba de ANOVA de un factor para el bulk-optodo y nano-optodo, donde la hipótesis nula es todos los valores de porcentaje de recuperación de concentración de potasio en condiciones de reproducibilidad son iguales, a un nivel de confianza al 95 %.

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
Factor	8	256.4	32.06	2.04	0.069
Error	36	566.3	15.73		
Total	44	822.7			

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
Factor	8	75.22	9.403	1.87	0.095
Error	36	180.75	5.021		
Total	44	255.97			

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
BO-Baja-A1	5	100.84	3.13	(97.24; 104.44)
BO-Baja-A2	5	96.84	5.00	(93.24; 100.44)
BO-Baja-A3	5	93.78	6.76	(90.18; 97.38)
BO-Media-A1	5	101.30	3.20	(97.70; 104.90)
BO-Media-A2	5	99.66	3.16	(96.06; 103.26)
BO-Media-A3	5	97.44	5.56	(93.84; 101.04)
BO-Alta-A1	5	99.680	1.674	(96.083; 103.277)
BO-Alta-A2	5	101.600	1.495	(98.003; 105.197)
BO-Alta-A3	5	99.780	2.215	(96.183; 103.377)

Desv.Est. agrupada = 3.96601

Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
NO-Baja-A1	5	96.78	3.89	(94.75; 98.81)
NO-Baja-A2	5	97.64	2.39	(95.61; 99.67)
NO-Baja-A3	5	100.14	2.82	(98.11; 102.17)
NO-Media-A1	5	100.620	1.943	(98.588; 102.652)
NO-Media-A2	5	99.860	0.940	(97.828; 101.892)
NO-Media-A3	5	99.92	2.52	(97.89; 101.95)
NO-Alta-A1	5	100.440	1.491	(98.408; 102.472)
NO-Alta-A2	5	100.420	1.099	(98.388; 102.452)
NO-Alta-A3	5	100.220	1.402	(98.188; 102.252)

Desv.Est. agrupada = 2.24071

La *Figura 50* muestra el gráfico de barras, incluyendo la media aritmética y la dispersión de la recuperación de potasio en condiciones de reproducibilidad de las mediciones, considerando condiciones del diferente analista (A1, A2 y A3), mismo equipo de medición, mismos reactivos y en un tiempo de análisis corto. Los resultados tienen una media entre el 95 % a 105 % para todas las concentraciones del bulk-optodo y nano-optodo, excepto para el bulk-optodo, donde el analista A3 tuvo una media de 0.938 para una concentración baja de potasio de 10^{-6} M (BO-Baja-A3).

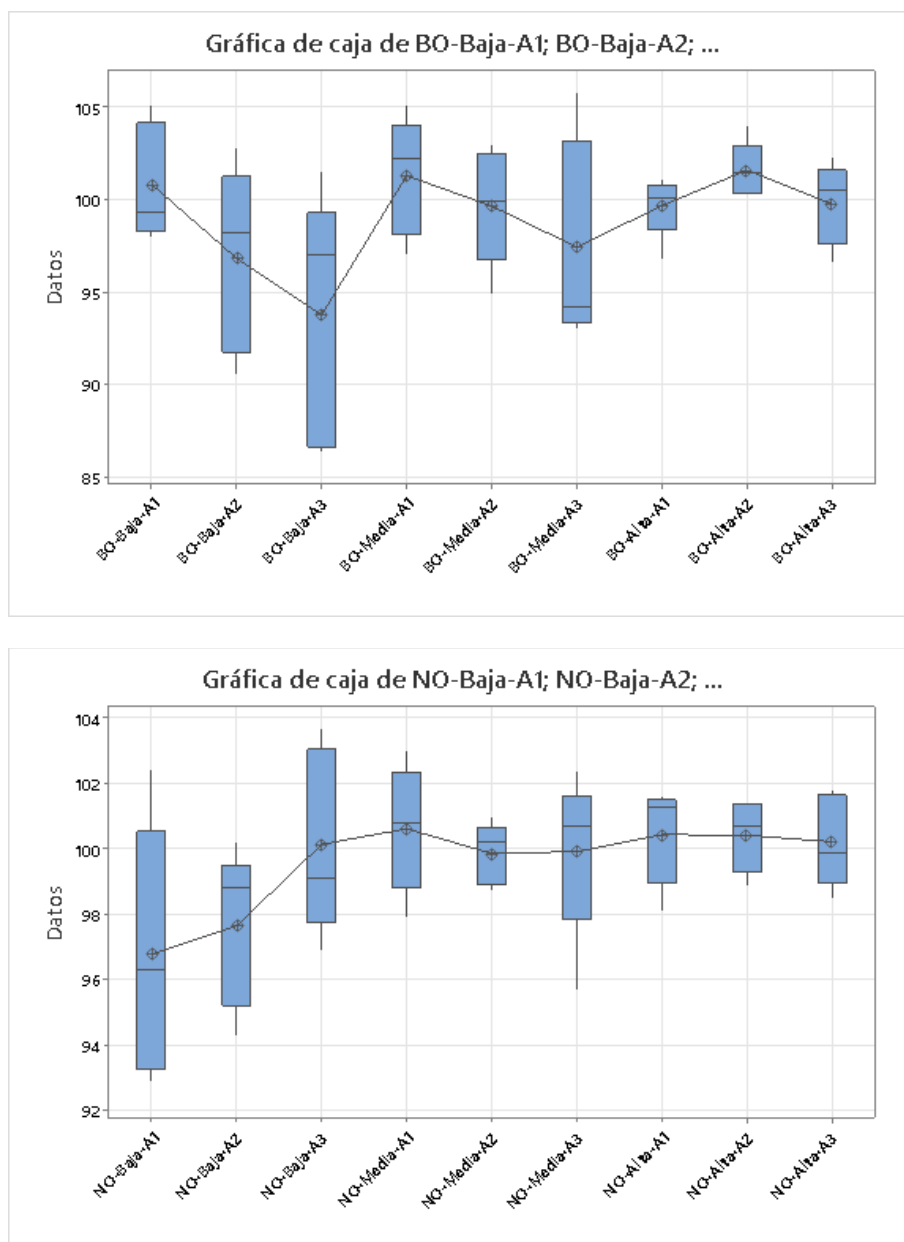


Figura 50. Gráfica de cajas de la variabilidad en condiciones de reproducibilidad a tres niveles de concentración de potasio para tres analistas diferentes para el bulk-optodo (Arriba) y nano-optodo (Abajo).

En los resultados se observa que la variabilidad del bulk-optodo es mayor con respecto al nano-optodo, que se explica por la sensibilidad de la superficie de la membrana del bulk-optodo. Para el bulk-optodo a todos los niveles de concentración, los valores de desviación estándar en condiciones de repetibilidad (RSD_r) fueron menores a los valores teóricos de $RSD_{Horwitz}$, a excepción de 1.0 M de potasio con un valor de desviación estándar

relativa, $RSD_r = 3.04 \%$, siendo superior al $RSD_{Horwitz}$ de 2.00% . Esta excepción en la variabilidad puede explicarse por la solubilidad parcial con el pasar del tiempo del plastificante del bulk-optodo en el medio acuoso de la muestra problema. En el caso del nano-optodo, se presenta una buena precisión, manteniendo los valores de desviación estándar relativa, RSD_r menores a los valores de $RSD_{Horwitz}$ para los tres niveles de concentración de potasio, que se justifica por la ausencia de plastificante, manteniendo así la fase sensora homogénea y protegida dentro de la micela durante todo el proceso de medición. Los resultados de reproducibilidad respaldaron los resultados obtenidos en los ensayos de repetibilidad, siendo la variabilidad del bulk-optodo mayor con respecto al nano-optodo. Además, se observa que la tendencia a una mayor variabilidad aumenta a menores concentraciones de potasio ($<10^{-5} \text{ M}$).

4.5.5. Veracidad

El análisis de la veracidad de la metodología se realizó por comparación de los resultados analíticos de los suelos agrícolas obtenidos por otra técnica instrumental, Absorción Atómica (AA). Se realizó la cuantificación de “Potasio Disponible”, es decir sin digestión ácida por la metodología estándar denominada: “SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 3111 B, 24th Ed.” De título: “Metales por flama de Espectroscopia de Absorción Atómica. Método Flama de Acetileno. Año 2023”, que se realizó por la empresa ANCI DEL PERU S.A.C. En paralelo, se realizaron mediciones con un electrodo combinado de ion selectivo (ISE) para potasio de la marca HANNA® Instruments HI4114. Los resultados se muestran en la *Tabla 38*.

Nota: La metodología de Absorción Atómica para potasio está diseñada para aguas de tipo: Natural, Para uso y consumo humano, Residuales y Salinos. Los extractos de suelos están clasificados como Agua de Proceso y están fuera del alcance original del método estándar.

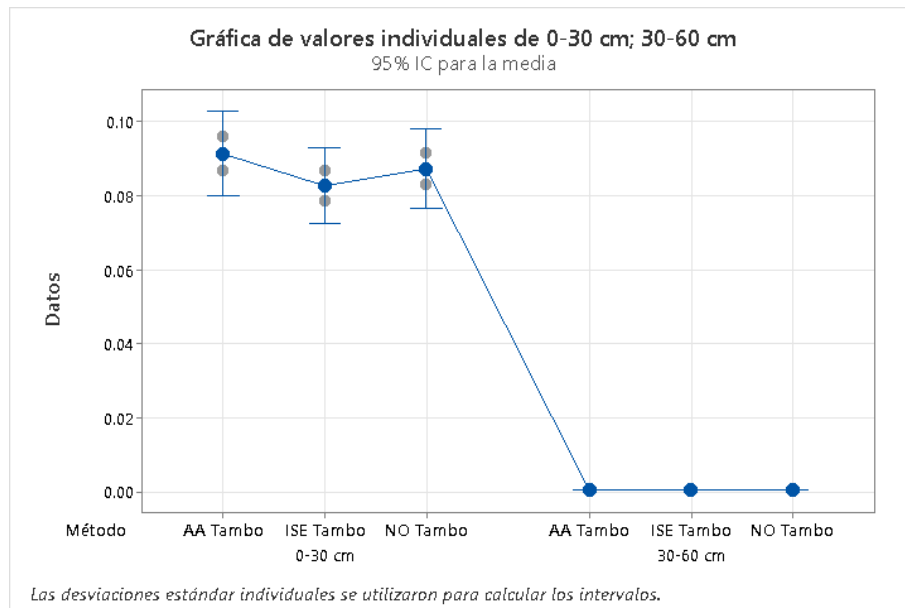
La veracidad fue comprobada por análisis estadístico de las concentraciones de potasio de los suelos agrícolas de las zonas Canta-Lima de las tres metodologías estudiadas, de la Absorción Atómica (AA), del Electrodo selectivo a iones potasio (ISE) y el obtenido por nuestro nano-optodo. En la *Figura 51* se muestra la presencia de una dispersión de las concentraciones de potasio para las metodologías estudiadas para todas las muestras, siendo visualmente las tres metodologías estudiadas equivalentes estadísticamente entre sí. Mientras en la *Tabla 39* se realizó una prueba de ANOVA para comparar las medias de la concentración de potasio de las tres metodologías estudiadas, donde se encontró que un valor

de *p-value* mayor a 0.05 (nivel de significancia del 95 %), para los resultados obtenidos por el electrodo selectivo a iones potasio menores a los valores de referencia, probablemente por la alta variabilidad inherente de dicha técnica analítica. En resumen, los resultados de la concentración de potasio del nano-optodo propuesto fue estadísticamente equivalente a los resultados obtenidos por los métodos de referencia, por ende, la metodología propuesta en este trabajo se puede considerar veraz para el alcance propuesto como muestras acuosas de extracto de suelos agrícolas en un rango de trabajo de potasio entre 10^{-4} – 1.0 M.

Tabla 38. Estudio de veracidad de la metodología de referencia del nano-optodo, Absorción Atómica (AA) y Electrodo selectivo a iones potasio (ISE).

Metodología	Muestras							
	Fundo El Tambo				Fundo Tunapis			
	0-30 cm		30-60 cm		0-30 cm		30-60 cm	
	Concentración de potasio (M)							
Nano-optodo (este trabajo)	0.0872	8.72E-02	0.0006	5.68E-04	0.0027	2.68E-03	0.0001	6.84E-05
Absorción Atómica	0.0912	9.12E-02	0.0005	5.33E-04	0.0028	2.79E-03	0.0001	6.79E-05
Electrodo selectivo	0.0826	8.26E-02	0.0006	5.98E-04	0.0024	2.45E-03	0.0001	6.29E-05

a)



b)

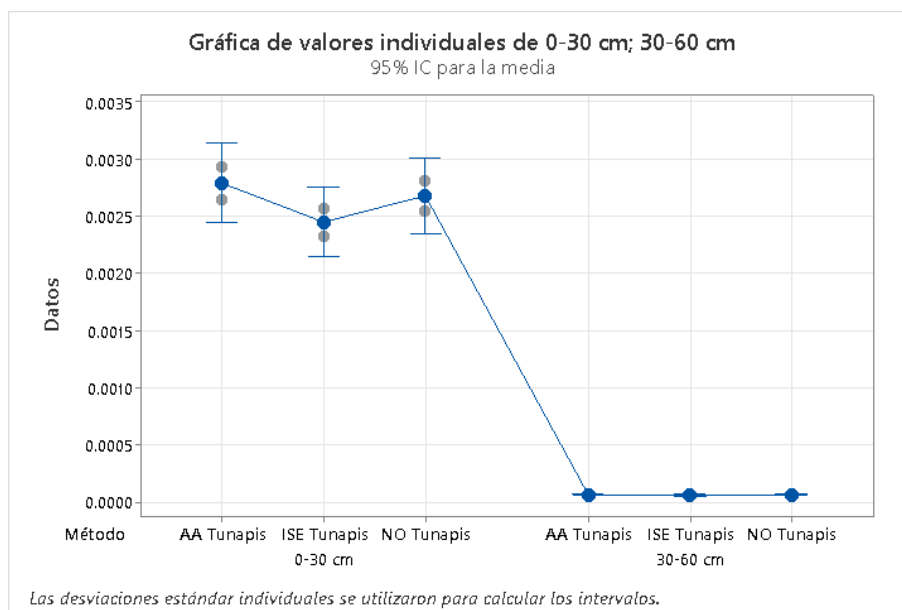


Figura 51. Gráfica de valores individuales para los métodos de Nano-optodo (NO), Absorción Atómica (AA) y Electrodo selectivo a iones (ISE) para a) Fundo El Tambo y b) Fundo Tunapis de la zona agrícola de Canta-Lima.

Tabla 39. Estadística descriptiva y prueba de ANOVA de un factor para Fundo el Tambo a) 0-30 cm, b) 30-60 cm. Fundo Tunapis c) 0-30 cm y d) 30-60 cm.

a)

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
AA Tambo 0-30cm	3	0.09123	0.00456	0.00263	(0.07990; 0.10257)
NO Tambo 0-30cm	3	0.08722	0.00436	0.00252	(0.07639; 0.09806)
ISE Tambo 0-30cm	3	0.08260	0.00413	0.00238	(0.07234; 0.09286)

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 0.09123$

Hipótesis alterna $H_1: \mu \neq 0.09123$

Muestra	Valor T	Valor p
AA Tambo 0-30cm	0.00	0.999
NO Tambo 0-30cm	-1.59	0.252
ISE Tambo 0-30cm	-3.62	0.069

b)

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
AA Tambo 30-60cm	3	0.000533	0.000027	0.000015	(0.000466; 0.000599)
NO Tambo 30-60cm	3	0.000568	0.000028	0.000016	(0.000497; 0.000638)
ISE Tambo 30-60cm	3	0.000598	0.000030	0.000017	(0.000524; 0.000673)

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 0.0005326$

Hipótesis alterna $H_1: \mu \neq 0.0005326$

Muestra	Valor T	Valor p
AA Tambo 30-60cm	-0.00	0.998
NO Tambo 30-60cm	2.14	0.165
ISE Tambo 30-60cm	3.81	0.063

c)

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
AA Tunapis 0-30cm	3	0.002786	0.000139	0.000080	(0.002440; 0.003132)
NO Tunapis 0-30cm	3	0.002676	0.000134	0.000077	(0.002344; 0.003009)
ISE Tunapis 0-30cm	3	0.002446	0.000122	0.000071	(0.002142; 0.002750)

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 0.002786$

Hipótesis alterna $H_1: \mu \neq 0.002786$

Muestra	Valor T	Valor p
AA Tunapis 0-30cm	0.00	0.999
NO Tunapis 0-30cm	-1.42	0.292
ISE Tunapis 0-30cm	-4.81	0.041

d)

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
AA Tunapis 30-60cm	3	0.000068	0.000003	0.000002	(0.000059; 0.000076)
NO Tunapis 30-60cm	3	0.000068	0.000003	0.000002	(0.000060; 0.000077)
ISE Tunapis 30-60cm	3	0.000063	0.000003	0.000002	(0.000055; 0.000071)

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 0.00006793$

Hipótesis alterna $H_1: \mu \neq 0.00006793$

Muestra	Valor T	Valor p
AA Tunapis 30-60cm	-0.00	0.999
NO Tunapis 30-60cm	0.24	0.832
ISE Tunapis 30-60cm	-2.79	0.108

4.5.6. Tiempo de respuesta

El análisis de la estabilidad de la señal analítica del optodo se realizó según la Tabla 20 (ver pág. 96) para tres niveles de concentración de potasio para el bulk-optodo y nano-optodo. Las fases sensoras de ambos optodos fueron mantenidas en la misma solución por todo el tiempo, aislados de la luz ambiental y a temperatura constante, para evitar los errores

sistemáticos provenientes de factores externos.

Los resultados son presentados en la *Figura 52*, donde se describe a detalle la variabilidad a cada nivel de concentración. En el caso del bulk-optodo, para niveles de concentración baja de 10^{-6} M y concentración media de 10^{-3} M se obtuvo una variabilidad experimental dentro de los niveles de tolerancia estimados. Para una concentración alta, de 1.0 M de potasio, se observó un aumento de la señal analítica a través del tiempo, debido a una pérdida en la retención de iones potasio por el ionóforo valinomicina del optodo a través del tiempo. La desviación en el comportamiento puede deberse a una pérdida de la fase sensora del optodo por un proceso de solubilización parcial del plastificante en el medio acuoso de la muestra problema.

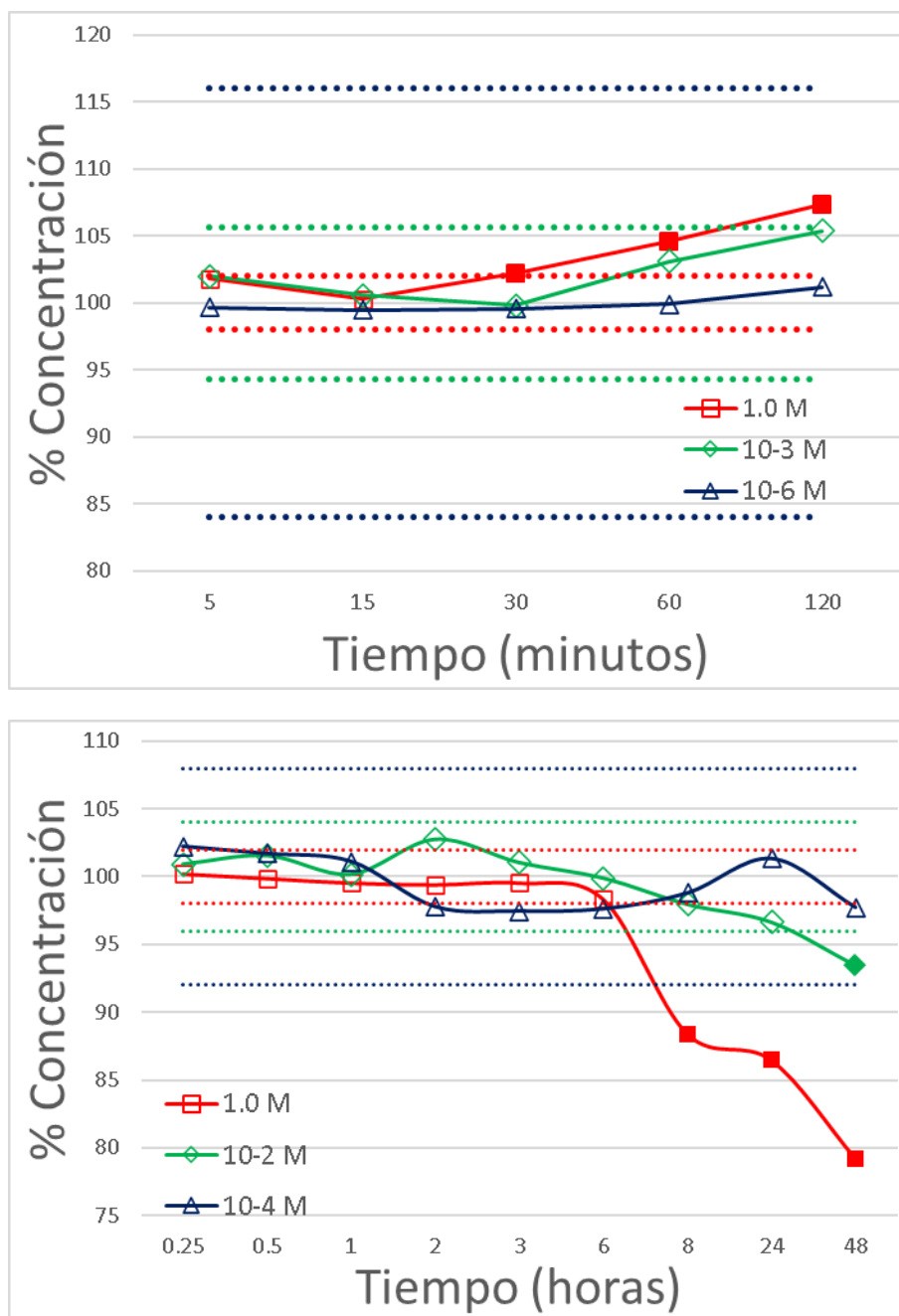


Figura 52. Variabilidad de las concentraciones de potasio en el transcurso del tiempo a tres niveles de concentración para el bulk-optodo de 1.0 M, 10^{-3} M y 10^{-6} M de potasio (Arriba) y para el nano-optodo de 1.0 M, 10^{-2} M y 10^{-4} M de potasio (Abajo), donde las líneas punteadas representan los límites superiores e inferiores según el $RSD_{Horwitz}$.

Según se planteó inicialmente, el análisis de la estabilidad de la señal analítica del nano-optodo alcanzo tiempos más amplios. Los resultados mostraron que las concentraciones de potasio tienden a disminuir con el tiempo, comportamiento opuesto a los

bulk-optodos. Para una concentración de 10^{-4} M de potasio la señal es estable por hasta 48 horas, para una concentración de 10^{-2} M de potasio la señal es estable por hasta 24 horas y para una concentración de 1.0 M de potasio la señal es estable por 6 horas.

Una explicación del tiempo de vida limitado del optodo, es debido a la disminución a la constante de formación entre el ionóforo valinomicina y el ion potasio, por la degradación del cromoionóforo ETH 5294 por la interacción con la luz ambiental. Este cromoionóforo es fotosensible, lo que provoca la disminución del color de la fase sensora, es decir, la disminución de la señal analítica con el paso del tiempo.

En la *Figura 53* se observó la variabilidad del porcentaje de recuperación a través del tiempo a un nivel de confianza del 95 %. Para el bulk-optodo la estabilidad alcanzó hasta las 2 horas para una concentración baja de potasio (10^{-6} M) y para una concentración media (10^{-3} M) y alta de potasio (1.0 M) la estabilidad alcanzo solo 1 hora con una tendencia a aumentar la concentración de potasio después de ese tiempo. La explicación es por la baja lipofilicidad de componentes de la fase sensora del bulk-optodo como el plastificante DOS, el PVC y la valinomicina, entonces en condiciones en la cual, la membrana del bulk-optodo está sumergido en la solución de potasio durante todo el tiempo de prueba, esta se va perdiendo progresivamente y por ende la concentración de potasio va aumentando con respecto a la cantidad de fase sensora insoluble. Para el nano-optodo se obtuvo una mejor estabilidad en el intervalo de confianza del 95 %, siendo para concentraciones bajas de potasio (10^{-4} M) estable en todo el intervalo de medición, hasta 48 horas, para una concentración media de potasio (10^{-2} M) la concentración no se modificó dentro de las 24 horas y para una concentración alta de potasio (1.0 M) solo fue estable por 6 horas, siendo la explicación por la salida de iones potasio dentro de la micela, debido al descenso de la constante de formación entre el ionóforo valinomicina y los iones potasio.

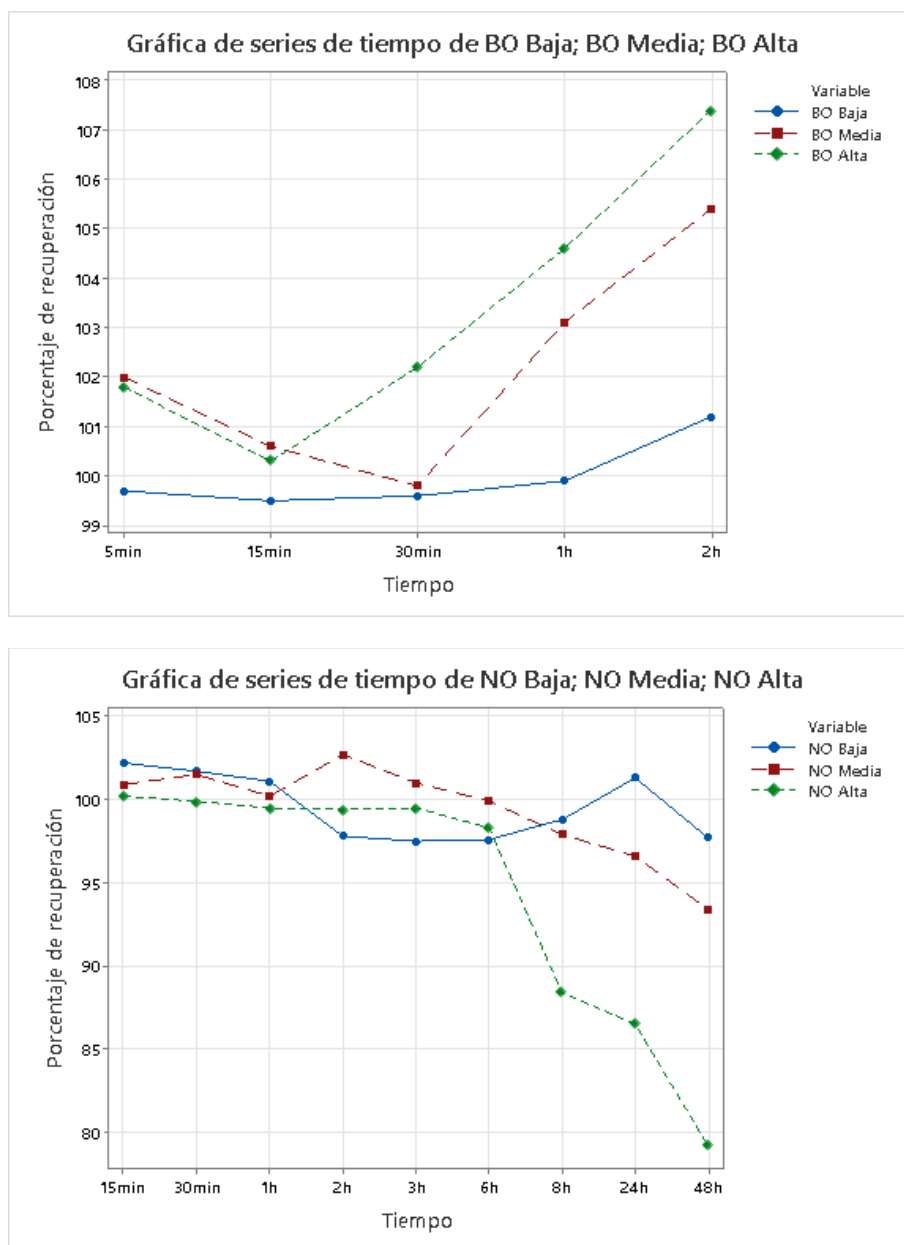


Figura 53. Gráfica de secuencia en el tiempo para la estabilidad del porcentaje de recuperación de la concentración de potasio a varios niveles de concentración para el bulk-optodo (arriba) y nano-optodo (abajo).

4.6. Uso del Raspberry-pi en la cuantificación de potasio

El desarrollo de los métodos colorimétricos, dentro de la química analítica, ha cobrado relativa importancia en la última década, gracias al avance en la tecnología optoelectrónica, tanto en la miniaturización de equipo de captura de imágenes y el aumento en la resolución de las imágenes obtenidas. En este trabajo se desarrolló un dispositivo de

captura de imágenes para el análisis de iones potasio, donde la señal colorimétrica analizada es el cambio de color de la fase sensora del optodo proporcional a la concentración de iones potasio en solución.

El proceso de detección de color se realizó en el espacio de color RGB y el tratamiento de las imágenes fue realizado por un ordenador de placa simple (SBC) *Raspberry Pi 4 B* (Raspberry Pi Foundation, Cambridge, England, United Kingdom) con una cámara digital de 5 MP a unos 6 cm de distancia en forma perpendicular de la zona de ubicación de la muestra y una fuente de luz LED SMD 5050 de 7.5 watts de potencia y 600 (585) lúmenes de intensidad de luz para el color blanco, ubicados alrededor de la muestra en forma de cuadrado a unos 8 cm de distancia de la cámara digital.

El ordenador Raspberry Pi utilizó un algoritmo para la detección del color RGB en el lenguaje de programación *Python*. El procesador selecciona un cuadrado de 50 píxeles de lado y hace un promedio de las señales de color RGB, estos valores de los colores RGB son usados para la determinación de “ α ” en lugar de usar los valores de absorbancia del espectrómetro UV-Vis.

La *Figura 54* muestra los colores individuales RGB, tanto experimentales y corregidos, obtenidos de los nano-optodo por la cámara digital conectada al dispositivo Raspberry-pi. A partir de las curvas de correlación de los colores RGB con la concentración de potasio, se observó que los valores de colores RGB corregidos tienden a incrementarse con respecto a los colores RGB experimentales, especialmente a elevadas concentraciones de potasio y, por tanto, también tener mejores pendientes según la *Figura 55*. Esto puede explicarse por la elevada variabilidad que presenta el color blanco de valores de (255,255,255) en el espacio de color RGB a factores externos como la iluminación y la facilidad de contaminación de color blanco.

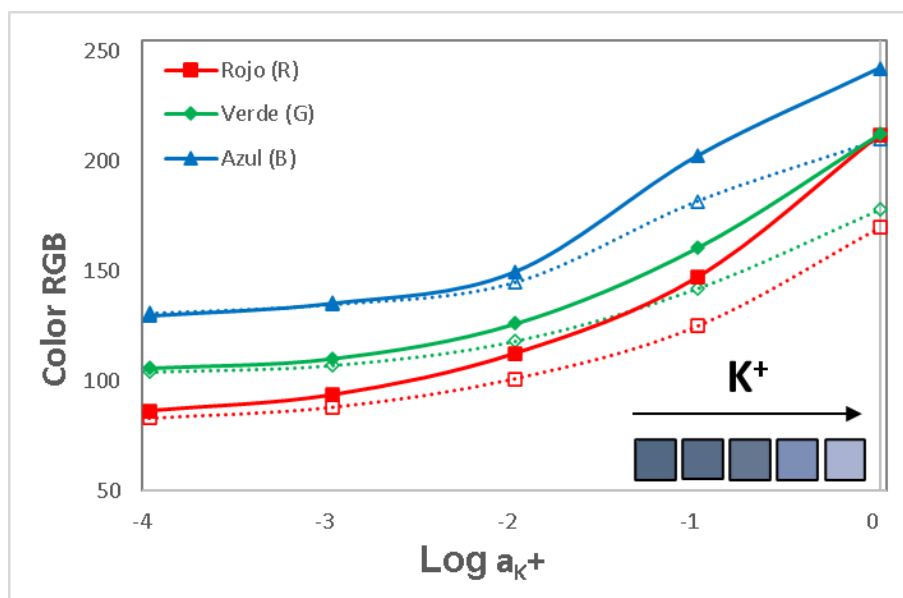


Figura 54. Curva de color RGB individual según la concentración de potasio como logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{K^+}$), donde los resultados en líneas punteadas son los colores RGB experimentales y las líneas continuas son los colores RGB corregidos.

Durante las primeras experiencias con el dispositivo de captura de imágenes se obtuvo poca reproducibilidad en la adquisición de datos de los colores RGB, siendo en estos dispositivos miniaturizados bastante complicado mantener controlados parámetros como el autofocus de la cámara o la intensidad en la luminosidad de los LEDs. Por consiguiente, se realizó una calibración de color, usando dos estándares de color, uno de color negro equivalente a (0,0,0) en el espacio de color RGB y otro de color blanco de (255,255,255) en el espacio RGB. Los colores RGB después de la corrección de la ecuación 17 (ver pág. 100), son llamados color corregido.

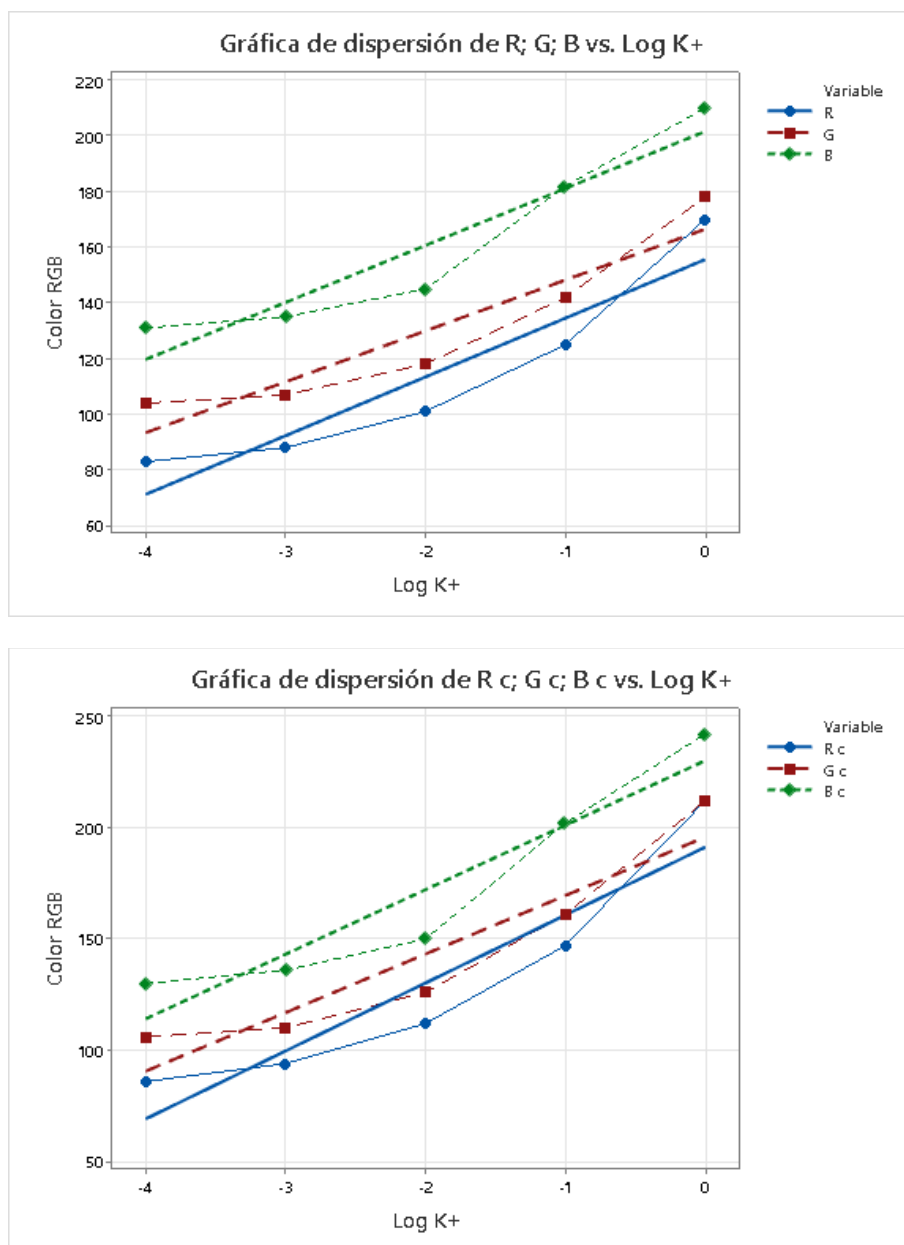


Figura 55. Gráfica de dispersión de entre el logaritmo de la concentración de iones potasio Log aK^+ (Eje X) y la señal de color individual RGB (Eje Y), para los colores individuales experimentales (Arriba) y los colores corregidos (Abajo).

La relación entre las señales colorimétricas individuales del sistema RGB y las concentraciones de potasio no fueron lineales, por ende, se planeó la conversión matemática para usar el valor “ α ”, para comparar las señales con la metodología clásica del espectrómetro UV-Vis. En la conversión al modelo de calibración sigmoide y lineal se empleó una señal relativa (no absoluta), esta variable fue definida en la *ecuación 16* (ver

pág. 61) y es calculada por un ratio o proporciones entre dos tipos de señales, luego, este tipo de medición se vuelve robusta y no dependiente de la calidad y resolución de la cámara digital, ni tampoco de la iluminación externa durante la detección del color por el optodo.

La Figura 56, muestra la correlación entre cada color RGB individual con la concentración de potasio. En el modelo de calibración sigmoide, la función “ $1-\alpha$ ” tiene un comportamiento diferente a los valores obtenidos de la metodología clásicas UV-Vis, donde el color rojo (R) tiene mayor similitud a los valores del UV-Vis que el color verde (G) y azul (B). Cuando se analizó la correlación entre la concentración de potasio como logaritmo de la actividad ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$) con la variable “ $1-\alpha$ ” de cada color RGB individual del nano-optodo, no se logró una correlación lineal y se obtuvo un valor de coeficiente de determinación (r^2) de 0.8797 para el color rojo (R), de 0.8820 para el color verde (G) y de 0.8993 para el color azul (B).

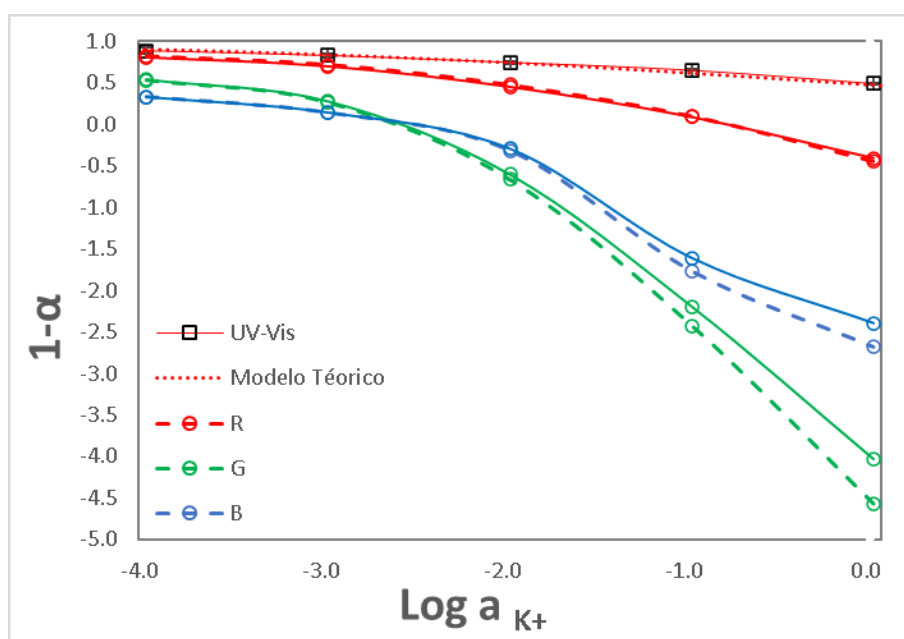


Figura 56. Curva de calibración sigmoide del nano-optodo a partir del logaritmo de la actividad del ion potasio ($\text{Log } a_{\text{K}^+}$) y de una función de “ $1-\alpha$ ”, donde las barras representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales del UV-Vis, los resultados en líneas punteadas son los colores RGB experimentales y las líneas continuas son los colores RGB corregidos.

Cuando se utilizó la conversión matemática de la ecuación 17 (ver pág. 100), en la cual se usó el color rojo (R) y verde (G) en una función logarítmica de dos variables para la

obtención del valor “ α ”. Los resultados de la curva de calibración de los colores combinados rojo (R) y verde (G) del espacio de color RGB son cercanos a los resultados de la metodología clásica del UV-Vis, tanto para los modelos de calibración sigmoide de señal “ $1-\alpha$ ” y calibración lineal de señal “ $\text{Log}(\alpha/1-\alpha)$ ” como se observa en la *Figura 57*. También se observa una desviación a los resultados para elevadas concentraciones de 10^{-1} M y 1.0 M de potasio, esto se debió a la variabilidad de color obtenido por la metodología de captura de imágenes del Raspberry-pi.

Tabla 40 se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de calibración lineal con base en los colores RGB experimentales (RGB), RGB corregidos (RGB_C) y UV-Vis, se obtuvo un *p-value* < 0.05 para ambos modelos de calibración, con los cual se rechaza la hipótesis nula: los coeficientes de la ecuación (pendiente e interseco) son iguales a cero. Por ende, se comprueba que el modelo de calibración es válido, dado que el valor de la pendiente e interseco son estadísticamente diferentes del valor de cero. Los valores de r^2 para el modelo sigmoide y lineal fueron 99.94 %, 99.80 % y 100.00 % respetivamente, siendo superiores al nivel de confianza del 95 %, entonces el modelo más representativo del comportamiento del optodo es modelo de calibración lineal.

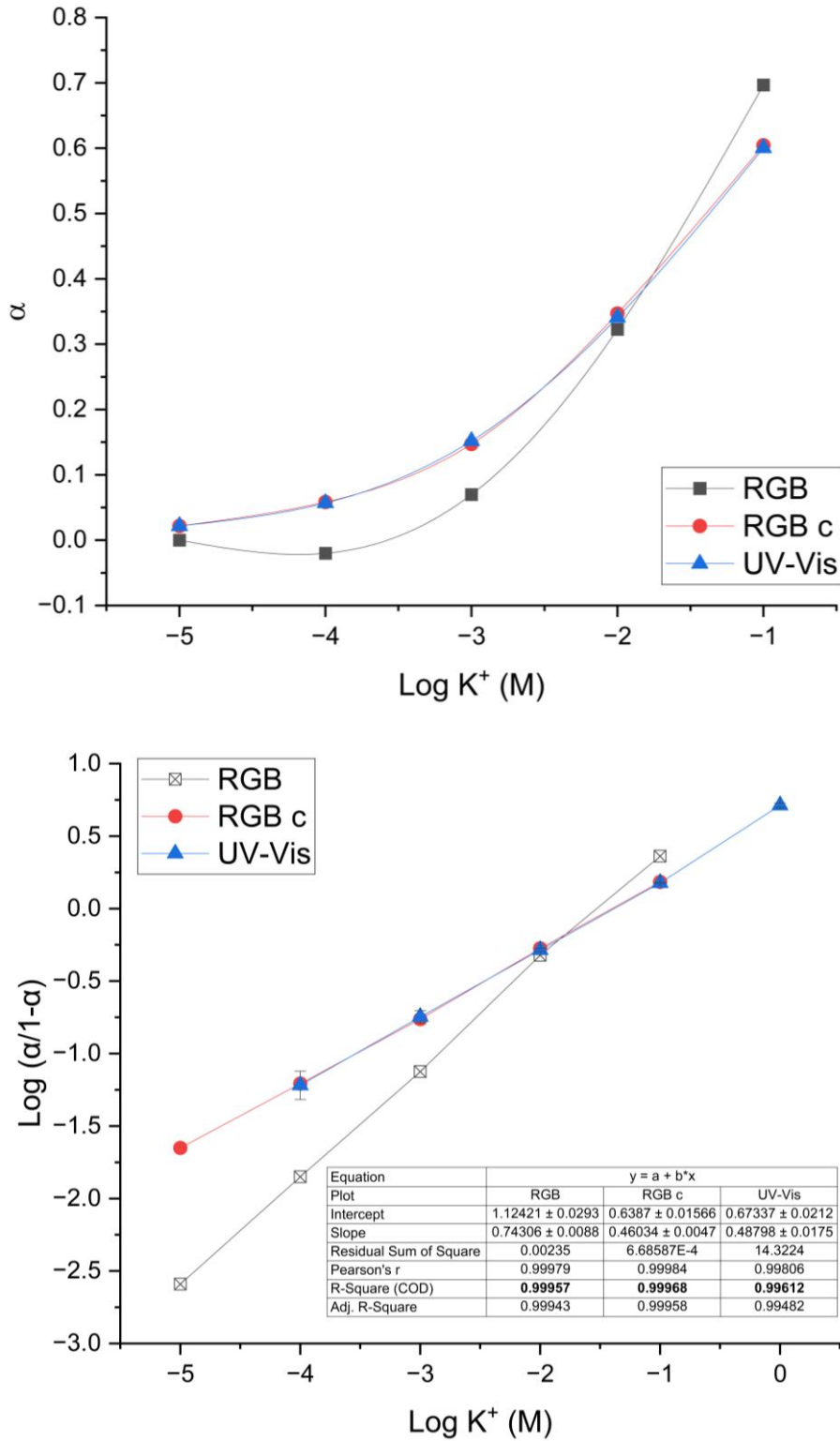


Figura 57. Curva de calibración sigmoide (arriba) y lineal (abajo) del nano-optodo a partir de los colores RGB experimentales y corregidos, donde las barras verticales representan el $\text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ de los datos experimentales del UV-Vis y los resultados en líneas punteadas son los colores RGB experimentales y las líneas continuas son los colores RGB corregidos.

Tabla 40. Análisis de regresión del modelo de calibración lineal para el nano-optodo a partir de los colores RGB experimentales (RGB), RGB corregidos (RGB_c) y UV-Vis.

Análisis de regresión: Log K⁺ vs. RGB

La ecuación de regresión es
Log K⁺ = - 1.514 + 1.345 RGB

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)
0.0376619	99.96%	99.94%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	9.9957	9.99574	7047.11	0.000
Error	3	0.0043	0.00142		
Total	4	10.0000			

Análisis de regresión: Log K⁺ vs. RGB_c

La ecuación de regresión es
Log K⁺ = - 1.375 + 2.221 RGB_c

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)
0.0713332	99.85%	99.80%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	9.9847	9.98473	1962.24	0.000
Error	3	0.0153	0.00509		
Total	4	10.0000			

Análisis de regresión: Log K⁺ vs. UV-Vis

La ecuación de regresión es
Log K⁺ = - 1.384 + 2.151 UV-Vis

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)
0.0083367	100.00%	100.00%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Regresión	1	4.99986	4.99986	71939.67	0.000
Error	2	0.00014	0.00007		
Total	3	5.00000			

La *Figura 58* muestra el análisis de regresión lineal del nano-optodo para la concentración de potasio como Log aK⁺ (Eje X) y una función de α como “1- α ” del modelo de calibración sigmoide y “Log ($\alpha/1-\alpha$)” del modelo de calibración lineal (Eje Y) calculado a partir de los colores RGB experimentales con un dispositivo portátil de captura de imágenes. Los resultados mostraron que todos los puntos de calibración de potasio están dentro del límite de confianza al 95 % para ambos modelos de calibración. Además, el

análisis de normalidad de los residuales, es decir, sesgo entre la concentración de potasio real y teórica, es pequeño y está aleatoriamente distribuida en la gráfica de probabilidad de normalidad con valores por arriba y debajo de la línea de tendencia.

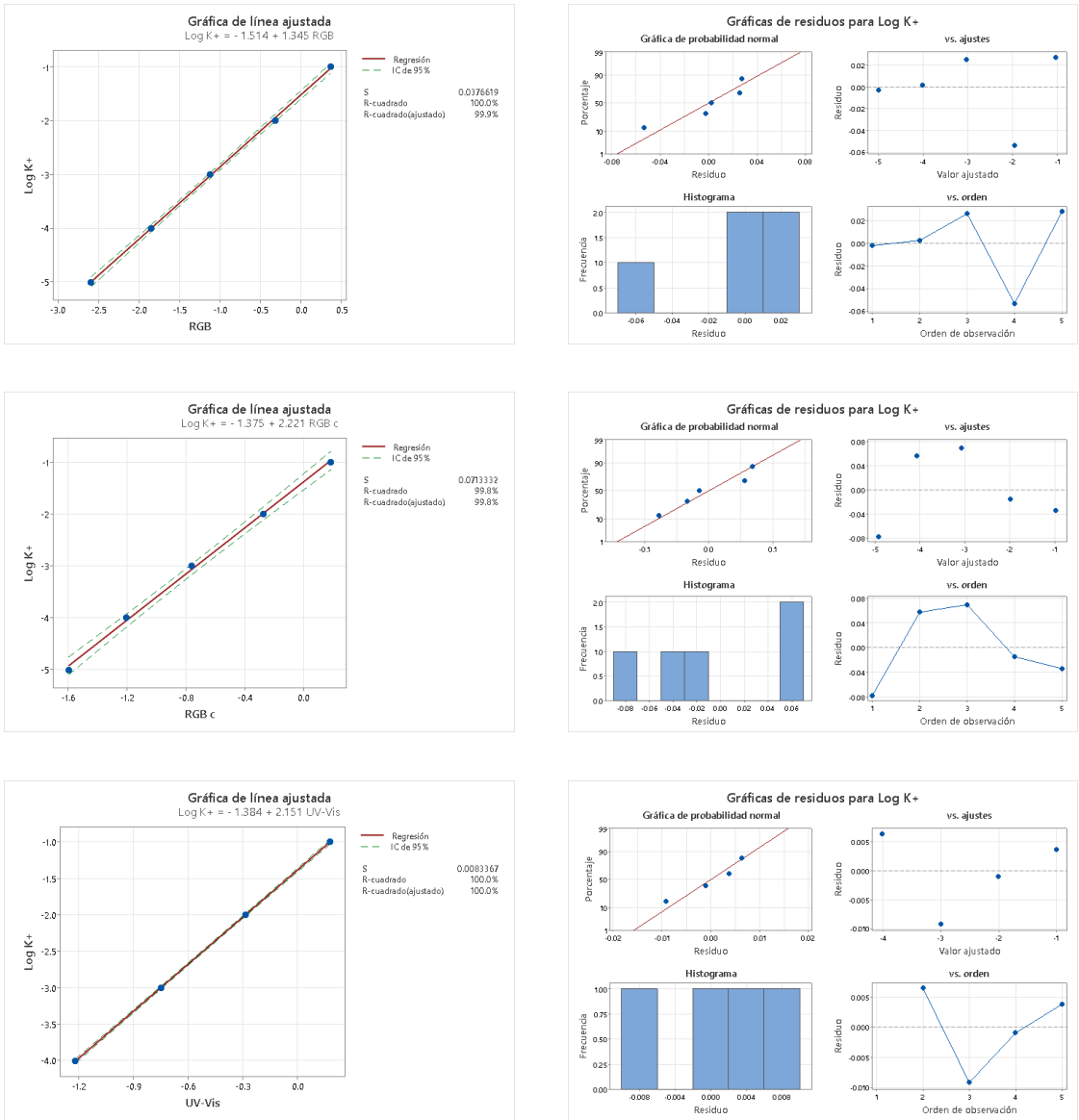


Figura 58. Gráfica lineal ajustada para la calibración lineal para el nano-optodo a partir de los colores RGB experimentales, RGB_c y UV-Vis, incluyendo el análisis de normalidad de los residuales.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para el modelo de calibración sigmoide y lineal con base en los colores RGB corregidos, se obtuvo un *p-value* < 0.05 para ambos

modelos de calibración, con los cual se rechaza la hipótesis nula: los coeficientes de la ecuación (pendiente e interseco) son iguales a cero. Por tanto, se comprueba que el modelo de calibración es válido, dado que el valor de la pendiente e interseco son estadísticamente diferentes del valor de cero. Los valores de r^2 para el modelo sigmoide y lineal fueron mayores al nivel de confianza del 95 %, entonces el modelo más representativo del comportamiento del optodo es modelo de calibración lineal.

El análisis de regresión lineal del nano-optodo para la concentración de potasio como $\text{Log } aK^+$ (Eje X) y una función de α como “ $1-\alpha$ ” del modelo de calibración sigmoide y “ $\text{Log } (\alpha/1-\alpha)$ ” del modelo de calibración lineal (Eje Y) calculado a partir de los colores RGB corregidos con un dispositivo portátil de captura de imágenes. Los resultados mostraron que todos los puntos de calibración de potasio están dentro del límite de confianza al 95 % para ambos modelos de calibración. Además, el análisis de normalidad de los residuales, es decir, sesgo entre la concentración de potasio real y teórica, es pequeño y está aleatoriamente distribuida en la gráfica de probabilidad de normalidad con valores por arriba y debajo de la línea de tendencia.

4.6.1. Efecto de la luz

Durante la optimización del dispositivo de medición colorimétrica portátil, se observó que controlar la iluminación ambiental en condiciones poco controladas como zonas externas de campo era complicado, por ende, se estudió el impacto directo de la iluminación sobre la señal de color RGB obtenido desde la captura de imágenes del nano-optodos según se muestra en la Figura 59.

El estudio se realizó con luces LED SMD5050 como fuente de iluminación de varios colores según la Tabla 21. Características técnicas de las luces LED SMD-5050. Tabla 21 (*ver pág. 101*), los datos de color RGB fueron corregidos por los colores estándar blanco y negro, valores 0,0,0 y 255,255,255 respectivamente. Los valores de colores crudos y corregidos para la curva de calibración en el rango de potasio entre $10^{-5} - 10^{-1}$ M son mostrados en la Tabla 41 y Tabla 42.

Tabla 41. Valores de color RGB experimentales del nano-optodo para potasio entre 10^{-4} – 1.0 M, expuesto a diferentes fuentes de luz con los a) LED RGB, b) LED RG, c) LED G, d) LED B, e) LED R y f) LED RB.

a)

BLANCO				BLANCO			NEGRO		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B
BUFFER	49	130	255	102	184	255	12	40	124
K 10-5M	49	127	255	104	185	255	10	39	125
K 10-4M	49	131	254	103	187	255	9	37	122
K 10-3M	48	124	253	102	188	255	11	39	124
K 10-2M	52	122	252	103	187	255	11	39	123
K 10-1M	58	118	251	106	185	255	11	39	122
K 1.0M	68	109	250	105	188	255	11	39	122
NaOH	64	116	254	102	188	255	11	40	125

b)

AMARILLO				BLANCO			NEGRO		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B
BUFFER	47	129	135	111	194	161	14	44	25
K 10-5M	47	128	135	111	194	162	13	40	21
K 10-4M	49	130	142	110	192	164	13	41	21
K 10-3M	46	120	133	109	193	164	13	41	22
K 10-2M	52	122	134	111	195	162	14	42	22
K 10-1M	59	111	130	113	192	164	15	40	23
K 1.0M	71	103	124	113	196	165	14	44	23
NaOH	64	107	125	109	194	164	14	42	23

c)

VERDE				BLANCO			NEGRO		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B
BUFFER	1	147	155	32	205	186	0	51	36
K 10-5M	1	141	156	32	206	186	0	48	31
K 10-4M	1	135	154	32	208	189	0	52	34
K 10-3M	2	140	155	38	204	187	0	46	32
K 10-2M	3	130	149	34	208	189	0	48	32
K 10-1M	7	124	150	36	207	190	0	51	34
K 1.0M	24	114	140	35	207	188	0	52	35
NaOH	18	117	144	33	206	188	0	50	34

d)

AZUL				BLANCO			NEGRO		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B
BUFFER	50	132	255	79	170	255	2	35	203
K 10-5M	51	132	255	79	170	255	3	33	199
K 10-4M	50	133	255	78	172	255	2	36	205
K 10-3M	50	129	255	79	172	255	2	33	203
K 10-2M	53	128	255	78	170	255	3	33	203
K 10-1M	56	123	255	81	172	255	2	34	204
K 1.0M	62	117	255	79	172	255	2	35	206
NaOH	59	120	255	81	175	255	3	35	205

e)

ROJO				BLANCO			NEGRO		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B
BUFFER	109	72	163	177	113	167	32	5	15
K 10-5M	111	71	163	177	111	167	33	4	15
K 10-4M	109	71	162	176	115	170	32	4	12
K 10-3M	110	68	162	173	112	163	35	5	17
K 10-2M	114	62	158	180	113	167	35	5	15
K 10-1M	128	56	163	178	114	169	32	5	15
K 1.0M	138	51	159	176	111	165	35	5	15
NaOH	134	54	160	182	117	171	33	5	15

f)

MAGENTA				BLANCO			NEGRO		
	R	G	B	R	G	B	R	G	B
BUFFER	76	114	255	134	160	255	21	30	178
K 10-5M	75	113	255	136	163	255	19	28	176
K 10-4M	79	117	255	135	161	255	20	28	177
K 10-3M	82	119	255	136	163	255	21	28	178
K 10-2M	84	116	255	134	161	255	21	29	179
K 10-1M	86	107	255	136	160	255	21	29	179
K 1.0M	99	104	255	134	161	255	21	30	179
NaOH	92	106	255	135	161	255	21	30	184

Tabla 42. Valores de color RGB corregidos del nano-optodo para potasio entre $10^{-4} - 1.0$ M, expuesto a diferentes fuentes de luz con los a) LED RGB, b) LED RG, c) LED G, d) LED B, e) LED R y f) LED RB.

a)

BLANCO C	R	G	B	BLANCO			NEGRO		
				R	G	B	R	G	B
BUFFER	105	159	255	255	255	255	0	0	0
K 10-5M	108	162	255	255	255	255	0	0	0
K 10-4M	109	160	253	255	255	255	0	0	0
K 10-3M	104	145	251	255	255	255	0	0	0
K 10-2M	114	143	249	255	255	255	0	0	0
K 10-1M	126	138	247	255	255	255	0	0	0
K 1.0M	155	120	245	255	255	255	0	0	0
NaOH	149	131	253	255	255	255	0	0	0

b)

AMARILLO C	R	G	B	BLANCO			NEGRO		
				R	G	B	R	G	B
BUFFER	87	145	206	255	255	255	0	0	0
K 10-5M	89	145	205	255	255	255	0	0	0
K 10-4M	94	150	216	255	255	255	0	0	0
K 10-3M	88	133	200	255	255	255	0	0	0
K 10-2M	101	134	204	255	255	255	0	0	0
K 10-1M	114	119	194	255	255	255	0	0	0
K 1.0M	147	99	182	255	255	255	0	0	0
NaOH	134	109	185	255	255	255	0	0	0

c)

VERDE C	R	G	B	BLANCO			NEGRO		
				R	G	B	R	G	B
BUFFER	8	159	202	255	255	255	0	0	0
K 10-5M	8	150	206	255	255	255	0	0	0
K 10-4M	8	136	197	255	255	255	0	0	0
K 10-3M	13	152	202	255	255	255	0	0	0
K 10-2M	23	131	190	255	255	255	0	0	0
K 10-1M	50	119	190	255	255	255	0	0	0
K 1.0M	175	102	175	255	255	255	0	0	0
NaOH	139	110	182	255	255	255	0	0	0

d)

AZUL C	R	G	B	BLANCO			NEGRO		
				R	G	B	R	G	B
BUFFER	159	183	255	255	255	255	0	0	0
K 10-5M	161	184	255	255	255	255	0	0	0
K 10-4M	161	182	255	255	255	255	0	0	0
K 10-3M	159	176	255	255	255	255	0	0	0
K 10-2M	170	177	255	255	255	255	0	0	0
K 10-1M	174	164	255	255	255	255	0	0	0
K 1.0M	199	153	255	255	255	255	0	0	0
NaOH	183	155	255	255	255	255	0	0	0

e)

ROJO C	R	G	B	BLANCO			NEGRO		
				R	G	B	R	G	B
BUFFER	135	158	248	255	255	255	0	0	0
K 10-5M	138	160	248	255	255	255	0	0	0
K 10-4M	136	154	242	255	255	255	0	0	0
K 10-3M	139	150	253	255	255	255	0	0	0
K 10-2M	139	135	240	255	255	255	0	0	0
K 10-1M	168	119	245	255	255	255	0	0	0
K 1.0M	186	111	245	255	255	255	0	0	0
NaOH	173	112	237	255	255	255	0	0	0

f)

MAGENTA C	R	G	B	BLANCO			NEGRO		
				R	G	B	R	G	B
BUFFER	124	165	255	255	255	255	0	0	0
K 10-5M	122	161	255	255	255	255	0	0	0
K 10-4M	131	171	255	255	255	255	0	0	0
K 10-3M	135	172	255	255	255	255	0	0	0
K 10-2M	142	168	255	255	255	255	0	0	0
K 10-1M	144	152	255	255	255	255	0	0	0
K 1.0M	176	144	255	255	255	255	0	0	0
NaOH	159	148	255	255	255	255	0	0	0

Se muestran los colores obtenidos en la *Tabla 43* directamente del dispositivo de captura de imágenes *Raspberry Pi*, con una cámara digital de 5 MP. La corrección de colores es indistinguible a simple vista para las concentraciones de potasio, aunque si es notorio para

los estándares de color blanco y negro. La corrección de color fue útil en condiciones que no se puedan controlar por completo la luz ambiental proveniente de las luces LED o de fuentes externas, debido a que la corrección de color de los estándares blanco y negro es crucial en ambientes poco iluminados.

Tabla 43. Valores de color RGB no corregidos (NC) y corregidos (C) del nano-optodo a diferentes niveles de concentración de potasio, incluyendo también condiciones del optodo protonado (buffer TRIS 20 mM) y desprotonado (NaOH 10 mM), también se muestran los estándares de color blanco y negro.

	Buffer	Concentración (M)					NaOH	Blanco Prom.	Negro Prom.
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}			
Blanco NC									
	49,130,255	49,130,255	49,131,254	48,124,253	52,122,252	58,118,251	64,116,254	103,187,255	11,39,123
Blanco C									
	105,159,255	106,159,255	109,160,253	104,145,251	114,143,249	126,138,247	149,131,253	255,255,255	0,0,0
Rojo NC									
	109,72,163	111,71,163	109,71,162	110,68,162	114,62,158	128,56,163	134,54,160	177,113,167	33,5,15
Rojo C									
	135,158,248	138,160,248	136,154,242	139,150,253	139,135,240	168,119,245	173,112,237	255,255,255	0,0,0
Verde NC									
	1,147,155	1,141,156	1,135,154	2,140,155	3,130,149	7,124,150	18,117,144	34,206,188	0,50,34
Verde C									
	8,159,202	8,150,206	8,136,197	13,152,202	23,131,190	50,119,190	139,110,182	255,255,255	0,0,0
Azul NC									
	50,132,255	51,132,255	50,133,255	50,129,255	53,128,255	56,123,255	59,120,255	79,172,255	2,34,204
Azul C									
	159,183,255	161,184,255	161,182,255	159,176,255	170,177,255	174,164,255	183,155,255	255,255,255	0,0,0
Amarillo NC									
	47,129,135	47,128,135	49,130,142	46,120,133	52,122,134	59,111,130	64,107,125	111,193,163	13,42,22
Amarillo C									
	87,145,206	89,145,205	94,150,216	88,133,200	101,134,204	114,119,194	134,109,185	255,255,255	0,0,0
Magenta NC									
	76,114,255	75,113,255	79,117,255	82,119,255	84,116,255	86,107,255	92,106,255	135,161,255	21,29,179
Magenta C									
	124,165,255	122,161,255	131,171,255	135,172,255	142,168,255	144,152,255	159,148,255	255,255,255	0,0,0

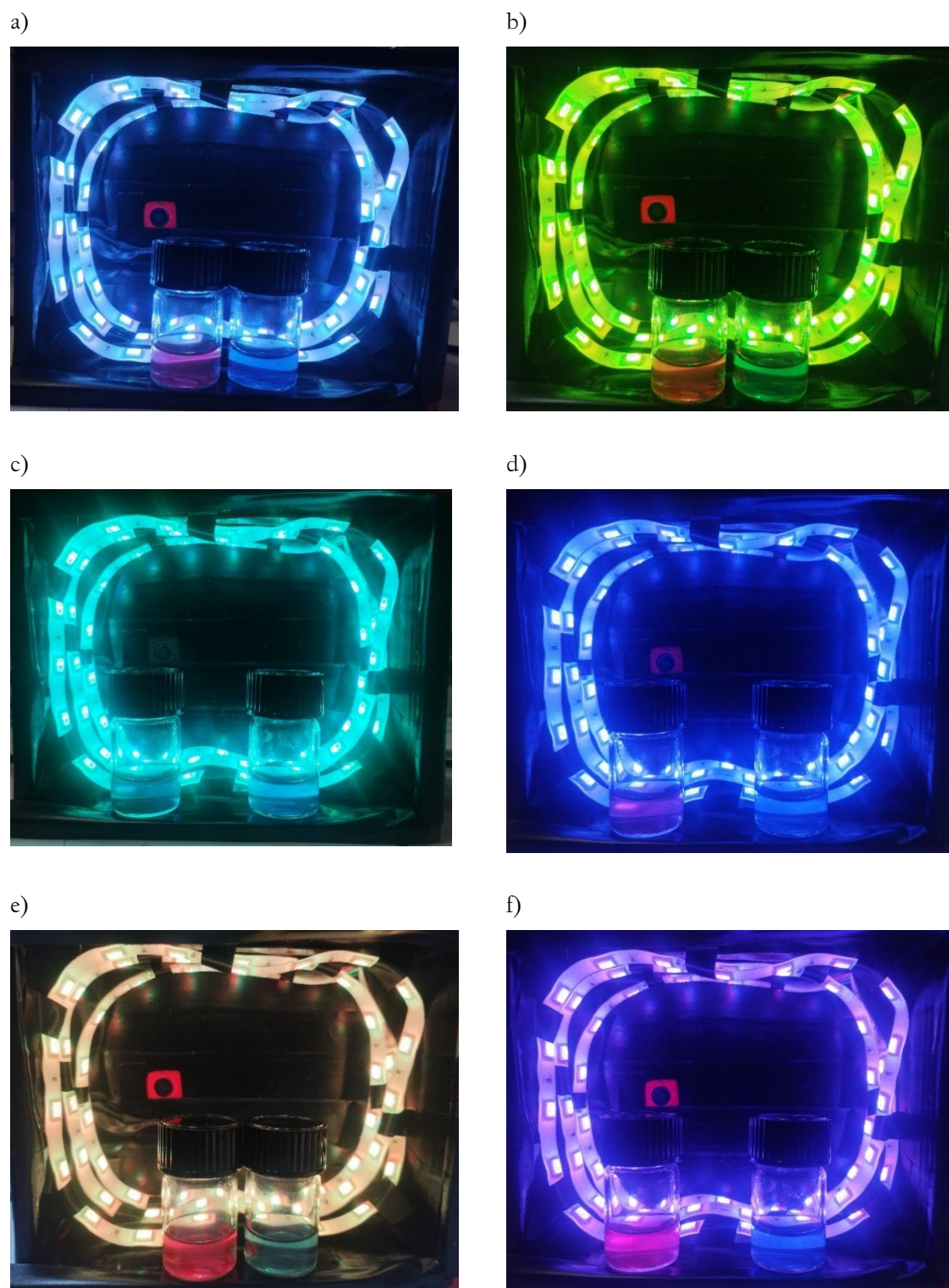


Figura 59. Efecto de la iluminación sobre los nano-optodos en NaOH 10 mM (vial izquierdo) y buffer TRIS 20 mM (vial derecho) en una tira de luz a) LED RGB, b) LED RG, c) LED G, d) LED B, e) LED R y f) LED RB.

Las curvas de calibración lineal del nano-optodo- K^+ se presentan en la Figura 60, donde el cálculo de la variable α se utilizaron las señales de color rojo y verde (R-G) y realizada según la *ecuación 15* (ver *pág. 60*) y los valores fueron comparados con los datos de la curva de calibración de los datos UV-Vis de la *Figura 38* (ver *pág. 126*).

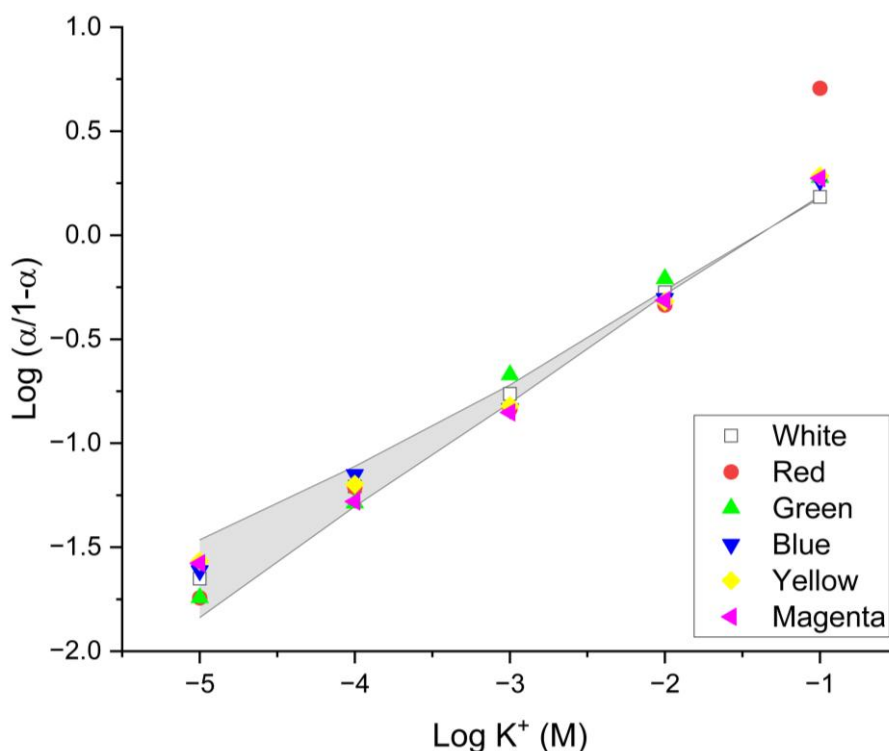


Figura 60. Curvas de calibración del nano-optodo expuestas bajo diferentes fuentes de luz LED.

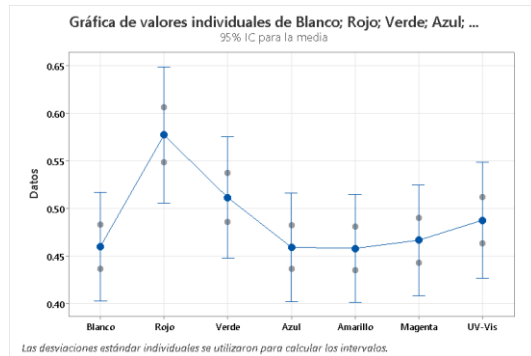
A partir de los datos presentados se observa que los datos no corregidos de los colores RGB son altamente dependientes del tipo de iluminación. Los valores de color rojo (R) bajo la luz blanca (3 luces LED RGB), los valores de color rojo aumentaron de forma directamente proporcional al aumento de concentración de potasio, en cambio la respuesta al color rojo bajo luz verde (LED G) fue inversamente proporcional. Para el cálculo de “ α ” no se usó los datos de color azul, entonces no se estudió su variabilidad a fondo, se menciona que la señal de color azul se saturó en presencia de las luces azul y magenta (LED B – LED RB).

Analizando las curvas de calibración para los diferentes tipos de iluminación, se observó que el comportamiento del nano-optodo, en términos de pendiente (m) e intercepto (b) no varía significativamente con respecto a valores de referencia del UV-Vis ($m = 0.4880$, $b = 0.6734$) en presencia de iluminación de color blanco ($m = 0.4603$, $b = 0.6387$), amarilla ($m = 0.4585$, $b = 0.6520$) y azul ($m = 0.4596$, $b = 0.6509$). Para la iluminación en color verde ($m = 0.5118$, $b = 0.8087$), la pendiente disminuyó para bajas concentraciones de potasio (10^{-3} - 10^{-5} M). En el caso de iluminación de color magenta ($m = 0.4670$, $b = 0.6515$) y rojo ($m = 0.5774$, $b = 1.0479$) se mostró un sesgo a elevadas concentraciones (10^{-1} M K^+). Por otro lado, el coeficiente de correlación (R^2) mostró buena linealidad ($R^2 > 0.975$) para todos los tipos de luces, excepto para la luz roja ($R^2 = 0.9452$), donde el punto de calibración de potasio de 10^{-1} M se escapan de la línea de tendencia lineal.

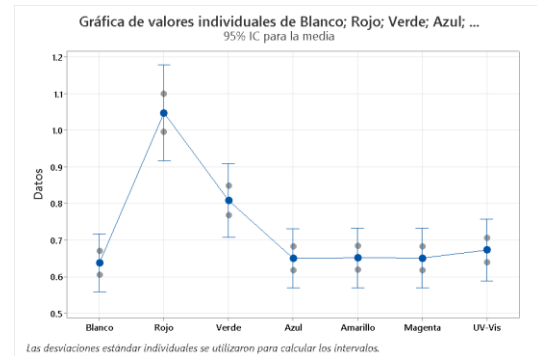
Se realizó una prueba estadística para comparar la dispersión de las pendientes e intercepto, a través de una prueba de t-student de una cola, tomando como valor de referencia a los resultados del UV-Vis. Los valores mostrados en la *Tabla 44* nos indican que la pendiente (*Tabla 45 a*) se mantiene dentro de los intervalos de confianza (95 %) para todos los tipos de iluminación excepto para la luz de color rojo. En el caso del intercepto (*Tabla 45 b*) fueron las luces rojo y verde, las cuales se alejaron del valor de referencia UV-Vis. Los resultados de la prueba de ANOVA nos mostraron valores de $p\text{-value} > 0.05$, es decir que no existe diferencia significativa entre los valores experimentales y los valores de referencia, para la pendiente (*Tabla 45 c*) para todos los colores, excepto el rojo y para el intercepto (*Tabla 45 d*) en los colores rojo y verde alejándose de la referencia del UV-Vis.

Tabla 44. Prueba estadística de t-student de 1 muestra para la a) pendientes de la curva de calibración, para b) intercepto de la curva de calibración, donde la hipótesis nula es igual a los valores de referencia del UV-Vis, a un nivel de confianza del 95 %. Estadística descriptiva y prueba de ANOVA de un factor para c) pendientes de la curva de calibración, para d) intercepto de la curva de calibración.

a)



b)



c)

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
Blanco	3	0.4603	0.0230	0.0133	(0.4032; 0.5175)
Rojo	3	0.5775	0.0289	0.0167	(0.5057; 0.6492)
Verde	3	0.5119	0.0256	0.0148	(0.4483; 0.5754)
Azul	3	0.4596	0.0230	0.0133	(0.4025; 0.5167)
Amarillo	3	0.4585	0.0229	0.0132	(0.4015; 0.5154)
Magenta	3	0.4670	0.0234	0.0135	(0.4090; 0.5250)
UV-Vis	3	0.4880	0.0244	0.0141	(0.4274; 0.5486)

μ : media de población de Blanco; Rojo; Verde; Azul; Amarillo; Magenta; UV-Vis

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 0.488$

Hipótesis alterna $H_1: \mu \neq 0.488$

Muestra	Valor T	Valor p
Blanco m	-2.08	0.173
Rojo m	5.37	0.033
Verde m	1.61	0.248
Azul m	-2.14	0.166
Amarillo m	-2.23	0.155
Magenta m	-1.56	0.260
UV-Vis m	0.00	1.000

d)

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para μ
Blanco	3	0.6387	0.0319	0.0184	(0.5594; 0.7180)
Rojo	3	1.0479	0.0524	0.0302	(0.9177; 1.1780)
Verde	3	0.8087	0.0404	0.0233	(0.7083; 0.9092)
Azul	3	0.6509	0.0325	0.0188	(0.5700; 0.7317)
Amarillo	3	0.6520	0.0326	0.0188	(0.5710; 0.7329)
Magenta	3	0.6515	0.0326	0.0188	(0.5706; 0.7325)
UV-Vis	3	0.6734	0.0337	0.0194	(0.5898; 0.7570)

μ : media de población de Blanco; Rojo; Verde; Azul; Amarillo; Magenta; UV-Vis

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \mu = 0.6734$

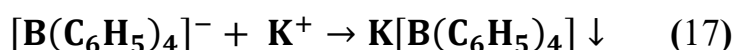
Hipótesis alterna $H_1: \mu \neq 0.6734$

Muestra	Valor T	Valor p
Blanco b	-1.88	0.201
Rojo b	12.38	0.006
Verde b	5.80	0.029
Azul b	-1.20	0.353
Amarillo b	-1.14	0.373
Magenta b	-1.16	0.365
UV-Vis b	0.00	1.000

Entonces se comprobó que, si bien la iluminación es directamente dependiente durante la medición del color, el uso de estándares de corrección de color, como la *ecuación 17* (ver *pág. 100*) y el uso de una ecuación radiométrica que depende de al menos dos variables (color rojo y verde) como *ecuación 15* (ver *pág. 60*), se logró una metodología de medición del color, independiente de la iluminación, siendo para tonalidad de color rojo lineal entre ($10^{-5} - 10^{-2}$ M) de potasio y poco precisa para concentraciones más elevadas.

4.6.2. Reversibilidad analítica del nano-optodo

La reversibilidad del nano-optodo se logró mediante extracción y precipitación de iones K^+ dentro de las micelas. Se ha estudiado la formación de complejos más estables que la valinomicina- K^+ , donde el ion tetrafenilborato (TP_4B^-) mostró una alta afinidad por los iones potasio (K^+), incluso en presencia de otros aniones como el cloruro (Cl^-) (Dasgupta et al., 2021), formando un sólido blanco insoluble, debido a que la escasa solubilidad de KTP_4B en medios acuosos ($1,8 \times 10^{-4}$ g/L) también contribuye a la precipitación de K^+ (Kirgintsev & Kozitskii, 1968), como se muestra en la *ecuación 17*. La alta selectividad de TP_4B^- El ion se explica por su estructura química de tipo “cage π ” (Hoffmann & Weiss, 1974). Este ion mostró la capacidad de extraer iones K^+ incluso en matrices complejas que contienen arcilla y materia orgánica, que están presentes en suelos agrícolas (Ferrando et al., 2020).



Este proceso conduce a la liberación de valinomicina, que desencadena la protonación del cromoióforo I dentro de la fase del sensor orgánico, manteniendo así la electroneutralidad del sensor. De este modo, el sensor óptico puede volver a realizar una medición analítica, es decir, se consigue la reversibilidad del nanooptodo. Usando $NaTP_4B$ como agente precipitante de K^+ , se encontró que la cantidad requerida de iones TP_4B^- es proporcional al K^+ dentro de la micela. Dado que el rango de concentración de K^+ se expresa en logaritmo, la cantidad de $NaTP_4B$ también tiene un comportamiento exponencial al aumentar la concentración de K^+ . La Figura 61 muestra la cantidad de $NaTP_4B$ necesaria para precipitar KTP_4B , la extracción del precipitado se completó con un proceso de centrifugación, luego el sobrenadante se considera como el nano-optodo libre de K^+ (color azul) y listo para su reutilización.

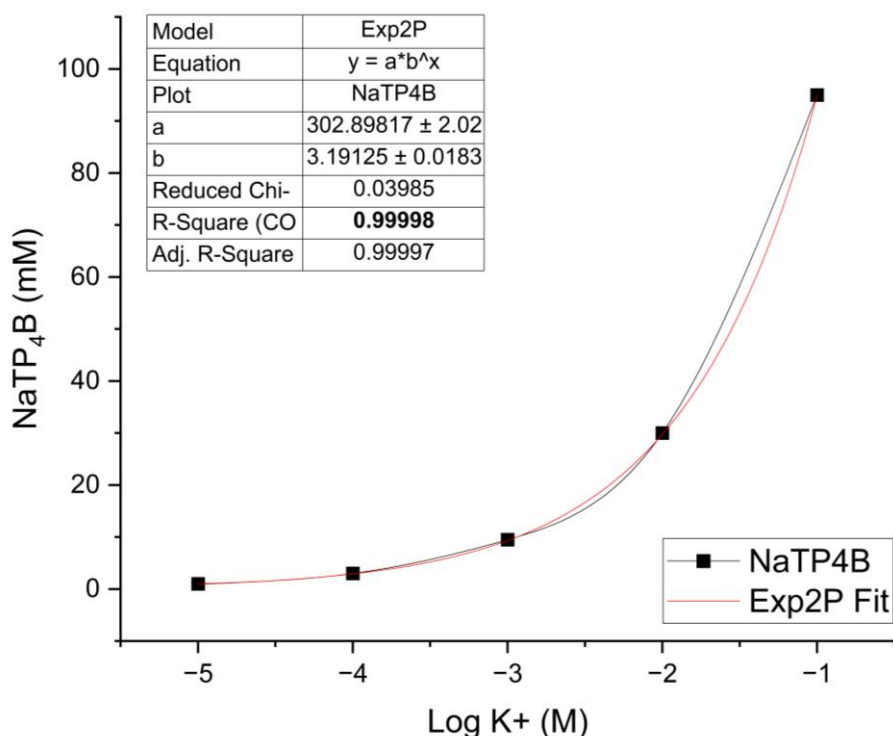


Figura 61. Correlación entre NaTP₄B (mM) y Log K⁺ (M) requerida para la reversibilidad del nano-optodo para K⁺.

Para comprobar la reversibilidad analítica, se midieron las absorbancias mediante espectroscopía UV-Vis antes del proceso de reversibilidad (1er ciclo) para una curva de calibración en un rango de K⁺ (10⁻⁴ - 1,0 M). Luego se agregó NaTP₄B según la cantidad de K⁺ y se precipitó mediante micro centrifugación, luego del proceso de reversibilidad se agregó nuevamente K⁺ según el rango de calibración (2do ciclo). En la Tabla 45 se muestran los valores de absorbancia a 667 nm, correspondientes al pico del estado desprotonado del cromoforo I, así como una función de " α ", utilizada para la calibración lineal a K⁺ del nano-optodo. También se compararon las curvas de calibración del nano-optodo después del 1er y 2do ciclo de uso, los ajustes de calibración lineal se muestran en la Figura 62, donde las barras verticales representan las tolerancias máximas esperadas según el RSD Horwitz. Luego se demostró que el comportamiento analítico del nano-optodo se puede revertir utilizando un agente precipitante como NaTP₄B, sin pérdida de capacidad analítica, obteniendo un dispositivo útil para la reutilización de reactivos químicos y minimizando la contaminación colateral.

Tabla 45. Valores de absorbancia y α para el 1er y 2do ciclo de uso del nano-optodo -K⁺.

		Buffer TRIS pH	Log K ⁺ (M)					NaOH 20 mM
			-4	-3	-2	-1	0	
A_{677 nm}	1er ciclo	0.169	0.164	0.156	0.141	0.119	0.100	0.087
	2do ciclo	0.202	0.196	0.188	0.168	0.143	0.121	0.105
α	1er ciclo	0.00	0.06	0.16	0.34	0.61	0.84	1.00
	2do ciclo	0.00	0.06	0.15	0.35	0.61	0.83	1.00
Log ($\alpha/1-\alpha$)	1er ciclo	-	-1.19	-0.72	-0.29	0.19	0.72	-
	2do ciclo	-	-1.18	-0.75	-0.27	0.19	0.70	-

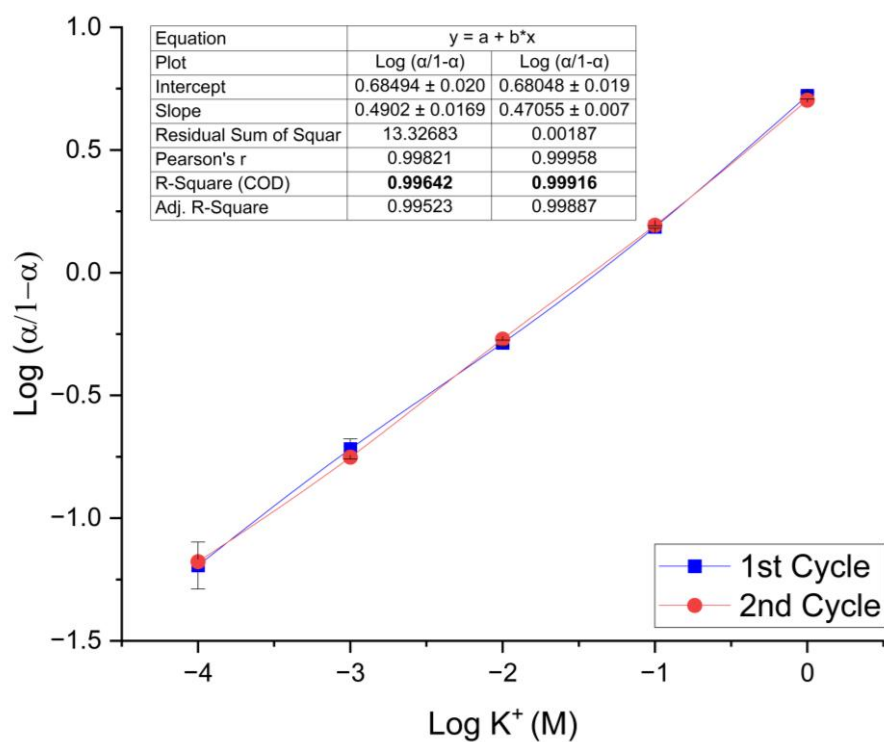


Figura 62. Curvas de calibración del nano-optodo K⁺ para un 1er y 2do ciclo de uso.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se prepararon con éxito un bulk-optodo y nano-optodo. La composición óptima del bulk-optodo y nano-optodo se estableció en 2.43 μM para el ionóforo valinomicina, 2.42 μM para el intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio y 2.40 μM para el cromoionóforo I (ETH 5294). El bulk-optodo necesitó un soporte polimérico (PVC-DOS) compuesto de 80 mg de polímero PVC y 160 mg de plastificante DOS. El nano-optodo no necesitó de un soporte y su síntesis se realizó mediante la miniaturización del bulk-optodo con un proceso de sonicación de ultrasonido hasta completa solubilidad de los componentes activos del bulk-optodo con 20 mg del surfactante Pluronic F-127.

Para ambos optodos se realizó la caracterización del perfil de absorción de la luz en el rango del espectro visible entre 400 - 800 nm mediante UV-VIS. Los resultados revelaron un cambio en la máxima longitud de onda desde 667 nm para concentraciones bajas de potasio, correspondiente al color azul de la fase sensora del optodo y su desplazamiento hasta 529 nm para concentraciones altas de potasio, correspondiente al color rojo de la fase sensora del optodo. Este descenso en el pico máximo de absorbancia es conocido como efecto hipsocrómico y es característico para el cromoionóforo I. El nano-optodo se caracterizó por las técnicas SEM y DLS. La caracterización SEM de los nano-optodos confirmó una relación entre el tamaño y la cantidad de surfactante pluronic F-127 utilizando en la síntesis. Para una cantidad de 0.5 % peso/volumen se obtuvieron tamaños promedio de micelas huecas de 87.0 nm y cuando se adicionó 20 μL de cocktail del optodo se obtuvo un aumento en el tamaño promedio de 412.4 nm. También se analizó una cantidad de 1.0 % peso/volumen, donde se obtuvieron tamaños promedio de micelas huecas de 82.2 nm y cuando se adicionó 20 μL de cocktail del optodo se obtuvo un aumento en el tamaño promedio de 181.7 nm. A partir de los datos se concluyó que el nano-optodo creció cuando se adicionó los compuestos orgánicos del optodo, esto se explica por la capacidad de carga de las micelas del nano-optodos, lo que provoca que las micelas se hinchen y crezcan en tamaño, cuando contienen a los componentes orgánicos activos del optodo. Así mismo se comprobó la presencia de micelas en solución, por la comprobación del efecto Tyndall en las soluciones que contenían al nano-optodo.

El bulk-optodo y nano-optodo presentados en este informe se sometieron a un proceso de optimización de las variables relacionadas con el desempeño analítico del optodo como la proporción de los componentes activos ionóforo, intercambiador de iones y

cromoionóforo. Adicionalmente, para el bulk-optodo se determinó la proporción ideal del polímero PVC y del plastificante DOS, en el caso del nano-optodo se optimizó la variable de la concentración del surfactante Pluronic F-127 que se relacionó directamente con el tamaño nanométrico de las micelas del nano-optodo.

Durante la optimización de la composición del optodo selectivo a iones potasio (ISO) se concluyó en un requisito en la proporción de los componentes activos del optodo para obtener una membrana homogénea y mantener la electroneutralidad dentro de la fase sensora del optodo. La proporción de los componentes activos del optodo como la concentración del ionóforo valinomicina (C_I), del intercambiador de iones tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio (C_S) y del cromoióforo ETH 5294 (C_C) debe cumplir el siguiente requisito $C_I \geq C_S \geq C_C$ para un correcto desempeño analítico del optodo. Los resultados de la optimización mostraron que cuando las concentraciones de los tres componentes activos son iguales, es decir $C_I = C_S = C_C$, se obtuvieron los mejores valores de la señal de respuesta de los sensores en términos de sensibilidad, selectividad. La calibración lineal del bulk-optodo alcanzó un amplio rango de concentraciones de potasio desde 10^{-6} M hasta 1.0 M con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9945 y la calibración lineal del nano-optodo obtuvo un rango de concentraciones de potasio desde 10^{-4} M hasta 1.0 M con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9953.

La optimización de los optodos concluyó que la proporción ideal del soporte del bulk-optodo es de 80 mg de polímero PVC y 160 mg de material plastificante DOS pues esta proporción logró una buena fijación sobre el soporte de vidrio. La optimización de la síntesis y estabilidad del nano-optodo, se relacionó con la cantidad apropiada del surfactante Pluronic F-127, debido a la estabilidad obtenida mediante la miniaturización de los bulk-optodos durante la síntesis de los nano-optodos. La cantidad óptima de Pluronic F-127 estimada se halló en 20 mg (1.0 % peso/volumen), obteniendo una solución coloidal coloreada transparente, indicativo de la completa solubilidad del surfactante, pero con formación de micelas, cuya presencia se confirmó por la opacidad obtenida con una luz laser (efecto Tyndall).

Durante el proceso de validación del bulk-optodo y nano-optodo, se evaluó la selectividad frente a otros iones interferentes de metales alcalinos (Na^+ , Li^+) y alcalinotérreos (Ca^{2+} , Mg^{2+}), similares al ion potasio. Los valores de coeficiente de selectividad de los interferentes fueron mayores al mínimo requerido de 1.0, equivalente a una interferencia del

10 % de la concentración de potasio, para valores de coeficiente de selectividad mayores, el porcentaje de interferencia es menor. Los valores obtenidos con el bulk-optodo fueron de 1.79 para el ion sodio ($k_{K^+Na^+}^{opt}$), de 3,45 para el ion litio ($k_{K^+Li^+}^{opt}$), de 2,09 para el ion calcio ($k_{K^+Ca^{2+}}^{opt}$) y 2.20 para el ion magnesio ($k_{K^+Mg^{2+}}^{opt}$), en caso de los nano-optodos fueron de 3.04 para el ion sodio ($k_{K^+Na^+}^{opt}$), de 3,21 para el ion litio ($k_{K^+Li^+}^{opt}$), de 4.01 para el ion calcio ($k_{K^+Ca^{2+}}^{opt}$) y 4.20 para el ion magnesio ($k_{K^+Mg^{2+}}^{opt}$). Estos resultados mostraron un coeficiente de selectividad mayor a 1.0 para todos los iones interferentes y una secuencia decreciente de los coeficientes de selectividad: $Na^+ < Li^+ < Ca^{2+} < Mg^{2+}$, lo que indica una buena selectividad del ionóforo valinomicina para los iones K^+ .

Se realizó una prueba de la adición simultánea de interferentes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} a una concentración estándar de potasio para evaluar su impacto y variabilidad. En el caso de nano-optodo se usó tres niveles de concentración de potasio, siendo 10^{-4} , 10^{-2} y 1.0 M a los que se les agregó la misma concentración de interferentes (Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}), uno cada vez. Los porcentajes de recuperación de potasio se mantuvieron en valores cercanos al 100 %. En el caso de la introducción de los 4 interferentes combinados (Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}) en concentraciones de 10^{-4} , 10^{-2} y 1.0 M, se observó un sesgo significativo de la señal de respuesta, obteniendo porcentajes de recuperación de 116.0 %, 111.0 % y 105.7 %, respectivamente.

El análisis de sensibilidad del bulk-optodo y nano-optodo para iones potasio permitió calcular los límites de detección para los optodos estimados en: $LD_{BO} = 0.31 \mu M$ ($3.15 \times 10^{-7} M$) y $LD_{NO} = 30.3 \mu M$ ($3.03 \times 10^{-5} M$) y los límites de cuantificación para los optodos estimados en: $LC_{BO} = 1.05 \mu M$ ($1.05 \times 10^{-6} M$) y $LC_{NO} = 0.10 mM$ ($1.01 \times 10^{-4} M$), siendo los resultados coherentes con la sensibilidad esperada según el rango de trabajo de la curva de calibración para ambos optodos.

Así también el análisis de precisión confirmó que la variabilidad del bulk-optodo es más alta que la variabilidad del nano-optodo tanto para condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Cuando se analizó el valor de desviación estándar relativa (RSD) como grado de variabilidad, se analizó los resultados bajo condiciones de repetibilidad, mantenido estables factores como analista, equipo de medición y condiciones externas y en condiciones de reproducibilidad, variando solo al analista y manteniendo constante lo demás factores.

Los valores de RSD de repetibilidad (RSD_r) del bulk-optodo se mantuvieron a

menores valores del $RSD_{Horwitz}$, excepto para una concentración de potasio alta (1.0 M), donde el $RSD_r = 3.04 \%$ fue mayor al $RSD_{Horwitz} = 2.00 \%$. Los valores de RSD de repetibilidad del nano-optodo fueron menores al $RSD_{Horwitz}$ en todo el rango de concentraciones de potasio. Los valores de RSD de reproducibilidad fueron similares a los obtenidos por los valores de RSD de repetibilidad, en el cual los valores RSD de reproducibilidad (RSD_R) del bulk-optodo se mantuvieron a menores valores del $RSD_{Horwitz}$, excepto para una concentración de potasio alta (1.0 M), donde el $RSD_R = 2.22 \%$ fue mayor al $RSD_{Horwitz} = 2.00 \%$. Los valores de RSD de reproducibilidad del nano-optodo fueron menores al $RSD_{Horwitz}$ en todo el rango de concentraciones de potasio. Entonces la respuesta del nano-optodo fue menos variable que la del bulk-optodo, debido a que el proceso de miniaturización del bulk-optodo y el aislamiento de la fase orgánica dentro de la micela proporciona una mejor estabilidad química al nano-optodo sobre el bulk-optodo, siendo en el bulk-optodo donde la fase sensora está expuesta al exterior y en contacto directo con la muestra acuosa. En conclusión, la estabilidad estructural del nano-optodo se confirmó en una menor variabilidad de la concentración de potasio bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

La veracidad fue evaluada por comparación de los resultados de concentración de potasio de 4 muestras de suelos agrícola de la zona de Canta-Lima, provenientes de dos Fundos El Tambo y Tunapis en dos horizontes de 0-30 cm y 30-60 cm de profundidad. Los resultados de la concentración de potasio reportada por el nano-optodo RGB fueron las siguientes: de El Tambo 0-30 cm = $8.72 \times 10^{-2}M$, Tambo 30-60 cm = $5.68 \times 10^{-4}M$, Tunapis 0-30 cm = $2.68 \times 10^{-3}M$ y Tunapis 30-60 cm = $6.84 \times 10^{-5}M$. Estos resultados fueron comparados con las metodologías de referencias: Absorción Atómica (AA) y Electrodo selectivo a iones (ISE). Los resultados fueron analizados estadísticamente con una prueba de ANOVA para comparar las medias de la concentración de potasio de las tres metodologías estudiadas, donde se encontró que el valor de *p-value* fue mayor a 0.05 (nivel de significancia del 95 %), significando que los resultados son estadísticamente equivalentes, por ende, la metodología aquí desarrollada con ayuda del nano-optodo para cuantificar iones K^+ se considera como veraz para el alcance propuesto como muestras acuosas de extracto de suelos agrícolas en un rango de trabajo de potasio entre 10^{-4} y 1.0 M.

El análisis de estabilidad de la señal analítica del optodo en el tiempo se realizó para tres niveles de concentración de potasio, una concentración alta (1.0 M), mediana (10^{-3} M)

y baja (10^{-6} M) para el bulk-optodo y niveles de concentración de potasio alta (1.0 M), mediana (10^{-2} M) y baja (10^{-4} M) para el nano-optodo. La estabilidad de la concentración de potasio fue realizada por un tiempo total de 2 horas para el bulk-optodo, para una concentración de potasio baja (10^{-6} M) no hubo una variabilidad significativa en todo el tiempo de estudio y para las concentraciones de potasio mediana (10^{-3} M) y alta (1.0 M) hubo una tendencia a aumentar con el tiempo, siendo estable solo por 1 hora después del contacto del bulk-optodo con la muestra. Para el nano-optodo la estabilidad fue analizada por un mayor tiempo, de hasta 48 horas, para la concentración de potasio baja (10^{-4} M) fue estable en todo el tiempo, la concentración de potasio media (10^{-2} M) fue estable solo por 24 horas y la concentración de potasio alta (1.0 M) fue estable solo por 6 horas.

La diferencia de estabilidad entre el bulk-optodo y nano-optodo se puede explicar por las diferencias estructurales entre los optodos. Para el bulk-optodo el uso de un soporte de baja lipofilicidad como el plastificante DOS, produce una pérdida progresiva de la fase sensora por el contacto con el medio acuoso, mientras el nano-optodo está recubierto y protegido del medio acuoso por el parte hidrofóbica del polímero tribloque Pluronic F-127 de la micela, entonces la pérdida de estabilidad del nano-optodo es por el descenso de la constante de formación entre el ionóforo valinomicina y los iones potasio, ó sea la liberación de iones potasio al medio acuoso y la pérdida del equilibrio entre la parte interna de la micela y la muestra acuosa.

El dispositivo colorimétrico desarrollado en este trabajo tiene un desempeño analítico comparable con el método clásico de espectroscopia UV-VIS. Para la determinación de potasio basado en la determinación del color de la fase sensora del nano-optodo, se desarrolló un algoritmo novedoso para analizar el color, mediante el uso de la corrección de los extremos de color en el espacio RGB, siendo dos estándares de color, uno de color negro equivalente a (0,0,0) en el espacio de color RGB y otro de color blanco de (255,255,255) en el espacio RGB. Los resultados del dispositivo colorimétrico basado en la corrección del color RGB mostraron que se puede aplicar en la determinación de iones potasio usando como metodología analítica al nano-optodo.

La combinación entre la metodología optimizada del nano-optodo con dispositivos de detección de color y procesamiento de señal con características portátiles como la computadora tipo Raspberry Pi fueron capaces de formar un dispositivo integral capaz de reducir el tiempo y el costo total de análisis, minimizando los tiempos de transporte al

laboratorio y costos relacionados con la conservación de la muestra. Esto permitió un análisis “*in-situ*” preciso y veraz que es útil en la determinación de potasio en suelos agrícolas.

El dispositivo de medición probó poca dependencia al control estricto de la iluminación externa, se comprobó las diferencias estadísticas entre las pendientes e interceptos de los distintos tipos de iluminación y los valores de referencia del UV-Vis, obteniendo valores semejantes de concentraciones de potasio en todo el rango de trabajo: (10^{-4} – 1.0 M) para condiciones de iluminación blanca, amarilla, azul y magenta. Para la luz verde solo fue lineal entre (10^{-2} – 1.0 M) de potasio y poco precisa para iluminaciones de color rojo.

En resumen, se puede concluir que la propuesta del bulk-optodo (BO) y nano-optodo (NO) selectivo a iones potasio (ISO) basado en la formación de un complejo reversible entre el ionóforo valinomicina y iones potasio fue la correcta. La señal colorimétrica obtenida con ayuda de Raspberry PI permitió un cambio de color de la fase sensora del optodo desde un color azul a un color rojo proporcional al aumento en la concentración de potasio. La técnica del nano-óptodo para cuantificar iones K^+ propuesta en este trabajo es reproducible, repetible, veraz y estable, además de validada estadísticamente que la hace aplicable como un sensor de fácil aplicación, portátil y barato para cuantificar iones K^+ en zonas agrícolas de difícil acceso.

Finalmente, este proyecto propone la publicación de dos artículos científicos para publicarse en revistas de impacto en los siguientes temas:

- 1. Comparative analysis of a bulk optode based on a valinomycin ionophore and a nano-optode in micelles with Pluronic F-127 for the quantification of potassium in aqueous solutions.**
- 2. Design of a portable RGB colorimetric detection device using *Raspberry pi* on nano-optodes based on chromionophore I in a reversible method of quantification of potassium in agricultural soil samples from the Canta-Lima area.**

CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agricultural soil health and conservation working group. (2018). Ontario's Agricultural Soil Health and Conservation Strategy. In *New Horizons*. New Horizons.
- Ahuja, P., Peshkova, M. A., Hemphill, B. D., & Gratzl, M. (2014). Minimizing color interference from biological samples in optode-based measurements. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 204, 319–325. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.07.113>
- Akamatsu, M., Komatsu, H., Matsuda, A., Mori, T., Nakanishi, W., Sakai, H., Hill, J. P., & Ariga, K. (2017). Visual detection of Cesium ions in domestic water supply or seawater using a nano-optode. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 90(6), 678–683. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20170046>
- Albizu, G., Bordagaray, A., Dávila, S., Garcia-Arrona, R., Ostra, M., & Vidal, M. (2020). Analytical control of nickel coating baths by digital image analysis. *Microchemical Journal*, 154, 104600. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104600>
- Apichai, S., Wang, L., Grudpan, K., & Bakker, E. (2020). Renewable magnetic ion-selective colorimetric microsensors based on surface modified polystyrene beads. *Analytica Chimica Acta*, 1094, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.10.011>
- Aqeel-Ur-Rehman, Abbasi, A. Z., Islam, N., & Shaikh, Z. A. (2014). A review of wireless sensors and networks' applications in agriculture. *Computer Standards and Interfaces*, 36(2), 263–270. <https://doi.org/10.1016/j.csi.2011.03.004>
- Bakker, E., Bühlmann, P., & Pretsch, E. (1997). Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics. *Chemical Reviews*, 97(8), 3083–3132. <https://doi.org/10.1021/cr940394a>
- Bamsey, M., Berinstain, A., & Dixon, M. (2012). Development of a potassium-selective optode for hydroponic nutrient solution monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 737, 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.024>
- Baranowska-Korczyc, A., Maksymiuk, K., & Michalska, A. (2019). Electrospun nanofiber supported optodes: Scaling down the receptor layer thickness to nanometers-towards 2D optodes. *Analyst*, 144(15), 4667–4676. <https://doi.org/10.1039/c9an00756c>
- Beer. (1852). Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten.

- Annalen Der Physik Und Chemie*, 162(5), 78–88.
<https://doi.org/10.1002/andp.18521620505>
- Benedetti, L. P. dos S., dos Santos, V. B., Silva, T. A., Filho, E. B., Martins, V. L., & Fatibello-Filho, O. (2015). A digital image-based method employing a spot-test for quantification of ethanol in drinks. *Analytical Methods*, 7(10), 4138–4144.
<https://doi.org/10.1039/C5AY00529A>
- Benton Jones, J. (2016). A practical guide for the soilless grower. In *Hydroponics* (Second Edi, Vol. 53, Issue 9). CRC Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bermúdez Garcia, J. E. (2014). *Investigación científica en el Perú: factor crítico de éxito para el desarrollo del país* (pp. 1–17). IBSS Consulting S. A. C.
- Bobacka, J., Ivaska, A., & Lewenstam, A. (1999). Plasticizer-free all-solid-state potassium-selective electrode based on poly(3-octylthiophene) and valinomycin. *Analytica Chimica Acta*, 385(1–3), 195–202. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00667-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00667-9)
- Buckenmaier, S. M. C., McCalley, D. V., & Euerby, M. R. (2003). Determination of pKa values of organic bases in aqueous acetonitrile solutions using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1004(1–2), 71–79. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00717-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00717-9)
- Bühlmann, P., Pretsch, E., & Bakker, E. (1998). Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 2. Ionophores for potentiometric and optical sensors. *Chemical Reviews*, 98(4), 1593–1687. <https://doi.org/10.1021/cr970113+>
- Bui, D. A., & Hauser, P. C. (2015). Analytical devices based on light-emitting diodes – a review of the state-of-the-art. *Analytica Chimica Acta*, 853, 46–58.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.09.044>
- Candía Puma, M. A. (2016). *Diseño, construcción y evaluación de un optodo para la determinación de Plomo (II) y Mercurio (II) en solución* [Tesis de maestría]. Universidad Católica de Santa María.
- Cantrell, K., Erenas, M. M., de Orbe-Payá, I., & Capitán-Vallvey, L. F. (2010). Use of the Hue Parameter of the Hue, Saturation, Value Color Space As a Quantitative Analytical Parameter for Bitonal Optical Sensors. *Analytical Chemistry*, 82(2), 531–542.
<https://doi.org/10.1021/ac901753c>

- Capitán-Vallvey, L. F., Fernández Ramos, M. D., & Al-Natsheh, M. (2003). A disposable single-use optical sensor for potassium determination based on neutral ionophore. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 88(2), 217–222. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(02\)00327-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(02)00327-1)
- Capitán-Vallvey, L. F., Fernández Ramos, M. D., & Alvarez de Cienfuegos-Gálvez, P. (2002). Optical test strip for calcium determination based on a neutral ionophore. *Analytica Chimica Acta*, 451(2), 231–241. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01420-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01420-9)
- Casado Terrones, S. (2007). *Desarrollo de sensores ópticos y métodos separativos como herramientas actuales en química analítica. Comparación metodológica* [Tesis Doctoral]. Universidad de Granada.
- Chailapakul, O., Ngamukot, P., Yoosamran, A., Siangproh, W., & Wangfuengkanagul, N. (2006). Recent Electrochemical and Optical Sensors in Flow-Based Analysis. *Sensors*, 6, 1383–1410. <http://www.mdpi.org/sensors>
- Charlton, S. C., Fleming, R. L., & Zipp, A. (1982). Solid-Phase Colorimetric Determination of Potassium. *Clinical Chemistry*, 28(9), 1857–1861. <https://doi.org/10.1021/i560143a010>
- Chen, G., Fang, C., Chai, H. H., Zhou, Y., Yun Li, W., & Yu, L. (2019). Improved analytical performance of smartphone-based colorimetric analysis by using a power-free imaging box. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 281, 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.019>
- Chen, W., Xiong, Y., Wang, W., Wu, T., Li, L., Kang, Q., & Du, Y. (2019). Assembly of a UV-LED induced fluorescence system for rapid determination of amiloride in pharmaceutical tablet and human serum. *Talanta*, 203, 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.010>
- Chiu, M. L., Lawi, W., Snyder, S. T., Wong, P. K., Liao, J. C., & Gau, V. (2010). Matrix Effects—A Challenge Toward Automation of Molecular Analysis. *Journal of the Association for Laboratory Automation*, 15(3), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jala.2010.02.001>
- Christodouleas, D. C., Nemiroski, A., Kumar, A. A., & Whitesides, G. M. (2015). Broadly Available Imaging Devices Enable High-Quality Low-Cost Photometry. *Analytical*

- Chemistry*, 87(18), 9170–9178. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01612>
- Comité conjunto para las guías en metrología. (2012). Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). *International Organization for Standardization Geneva ISBN, 3ª Edición*(VIM), 104. [https://doi.org/10.1016/0263-2241\(85\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0263-2241(85)90006-5)
- Crane, F. E. (1956). Identification of Amines as Tetraphenylborates. *Analytical Chemistry*, 28(11), 1794–1797. <https://doi.org/10.1021/ac60119a052>
- DASGUPTA, P., BELLAMY, H., LIU, H., LOPEZ, J., LOREE, E., MORRIS, K., PETERSEN, K., & MIR, K. (1993). Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors. *Talanta*, 40(1), 53–74. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(93\)80142-E](https://doi.org/10.1016/0039-9140(93)80142-E)
- Dasgupta, S., Sengupta, S., Saha, S., Saha, N., Bhattacharyya, K., & Dey, P. (2021). Predicting the response of soil potassium to broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) in a Gangetic Inceptisol of West Bengal, India through suitable chemical extractants. *Journal of Plant Nutrition*, 44(7), 931–945. <https://doi.org/10.1080/01904167.2020.1867580>
- De Orbe-Payá, I., Erenas, M. M., & Capitán-Vallvey, L. F. (2007). Potassium disposable optical sensor based on transfectance and cromaticity measurements. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 127(2), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2007.05.016>
- Dekina, D. I., Kalinichev, A. V., Pokhvishcheva, N. V., Peshkova, M. A., & Mikhelson, K. N. (2018). Effects of quantitative composition of the sensing phase in the response of ionophore-based optical sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 277(May), 535–543. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.09.018>
- Dinten, O., Spichiger, U. E., Chaniotakis, N., Gehrig, P., Rusterholz, B., Morf, W. E., & Simon, W. (1991). Lifetime of Neutral-Carrier-Based Liquid Membranes in Aqueous Samples and Blood and the Lipophilicity of Membrane Components. In *Anal. Chem* (Vol. 63).
- Du, X., Wang, R., Zhai, J., Li, X., & Xie, X. (2020). Ionophore-Based Ion-Selective Nanosensors from Brush Block Copolymer Nanodots. *ACS Applied Nano Materials*, 3(1), 782–788. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b02286>

- Du, X., Wang, R., Zhai, J., & Xie, X. (2022). Surface PEGylation of ionophore-based microspheres enables determination of serum sodium and potassium ion concentration under flow cytometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04301-2>
- Du, X., & Xie, X. (2017). Non-Equilibrium Diffusion Controlled Ion-Selective Optical Sensor for Blood Potassium Determination. *ACS Sensors*, 2(10), 1410–1414. <https://doi.org/10.1021/acssensors.7b00614>
- Du, X., Yang, L., Hu, W., Wang, R., Zhai, J., & Xie, X. (2018). A Plasticizer-Free Miniaturized Optical Ion Sensing Platform with Ionophores and Silicon-Based Particles. *Anal. Chem*, 90, 5. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00360>
- Du, X., Zhu, C., & Xie, X. (2017). Thermochromic ion-exchange micelles containing H⁺ chromoionophores. *Langmuir*, 33(23), 5910–5914. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b01221>
- Dybal, J., Ehala, S., Kašička, V., & Makrlík, E. (2008). Theoretical and experimental study of the complexation of valinomycin with ammonium cation. *Biopolymers*, 89(12), 1055–1060. <https://doi.org/10.1002/bip.21034>
- Dybal, J., Makrlík, E., & Vaňura, P. (2009). Extraction and ab initio calculation studies on the complexation of Ca²⁺ with valinomycin. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 279(2), 553–559. <https://doi.org/10.1007/s10967-008-7344-y>
- Dybal, J., Makrlík, E., & Vaňura, P. (2010). Extraction and DFT study on the complexation of Mg²⁺ with valinomycin. *Monatshefte Fur Chemie*, 141(1), 15–18. <https://doi.org/10.1007/s00706-009-0217-4>
- Ehala, S., Dybal, J., Makrlík, E., & Kašička, V. (2009). Capillary affinity electrophoresis and ab initio calculation studies of valinomycin complexation with Na⁺ ion. *Journal of Separation Science*, 32(4), 597–604. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800555>
- Ehgartner, J., Wiltse, H., Borisov, S. M., & Mayr, T. (2014). Low cost referenced luminescent imaging of oxygen and pH with a 2-CCD colour near infrared camera. *The Analyst*, 139(19), 4924–4933. <https://doi.org/10.1039/C4AN00783B>
- Elsabaa, N., Ahmed, M. E., Younes, N. A., & Shehata, M. (2022). Effect of Led Spectrum on Potato Growth in Vitro. *Journal of Plant Production*, 13(6), 273–279.

<https://doi.org/10.21608/jpp.2022.145818.1133>

Encyclopaedia Britannica Inc. (2021). Tyndall effect. In *Encyclopaedia Britannica*.

Erenas, M. M., De Orbe-Payá, I., & Capitan-Vallvey, L. F. (2016). Surface Modified Thread-Based Microfluidic Analytical Device for Selective Potassium Analysis. *Analytical Chemistry*, 88(10), 5331–5337. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00633>

ERENAS RODRÍGUEZ, M. M. (2011). *LA COORDENADA TONAL H EN CIENCIAS ANALÍTICAS. APLICACIÓN A SENSORES QUÍMICOS* [TESIS DOCTORAL]. UNIVERSIDAD DE GRANADA.

Escobedo, P., Erenas, M. M., Martínez-Olmos, A., Carvajal, M. A., Gonzalez-Chocano, S., Capitán-Vallvey, L. F., & Palma, A. J. (2019). General-purpose passive wireless point-of-care platform based on smartphone. *Biosensors and Bioelectronics*, 141, 111360. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111360>

Escobedo, P., Ramos-Lorente, C. E., Ejaz, A., Erenas, M. M., Martínez-Olmos, A., Carvajal, M. A., García-Núñez, C., de Orbe-Payá, I., Capitán-Vallvey, L. F., & Palma, A. J. (2023). QRsens: Dual-purpose quick response code with built-in colorimetric sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 376, 133001. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.133001>

Eurolab España Eurachem. (2016). *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas* (Eurachem, Ed.; Segunda Ed). Eurolab España.

Fernandes, G. M., Silva, W. R., Barreto, D. N., Lamarca, R. S., Lima Gomes, P. C. F., Flávio da S Petrucci, J., & Batista, A. D. (2020). Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1135, pp. 187–203). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.07.030>

Ferrando, M. G., Barbazán, M. M., García, F. O., & Mallarino, A. P. (2020). Comparison of the ammonium acetate, Mehlich 3, and sodium tetraphenylboron as extractants to evaluate crop available potassium. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(8), 997–1005. <https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1744625>

Firooz, A. R., Ensafi, A. A., Kazemifard, N., & Sharghi, H. (2012). A highly sensitive and

- selective bulk optode based on benzimidazol derivative as an ionophore and ETH5294 for the determination of ultra trace amount of silver ions. *Talanta*, 101, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.018>
- Garcia, R. A., Vanelli, C. P., Pereira Junior, O. dos S., & Corrêa, J. O. do A. (2018). Comparative analysis for strength serum sodium and potassium in three different methods: Flame photometry, ion-selective electrode (ISE) and colorimetric enzymatic. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(9), 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcla.22594>
- Gerold, C. T., Bakker, E., & Henry, C. S. (2018). Selective Distance-Based K⁺ Quantification on Paper-Based Microfluidics. *Anal. Chem*, 90, 33. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00559>
- Giachi, S. (2016). *Nuevas formas de relación entre ciencia e industria: los centros de investigación colaborativa en el sistema español de I+D* [Tesis Doctoral, Universidad de Málaga]. <http://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/14135%0Ahttp://hdl.handle.net/10630/14135>
- Gibb, I. (1987). Evaluation and assessment of new disposable strip for determination of plasma potassium concentration. *Journal of Clinical Pathology*, 40(3), 298–301. <https://doi.org/10.1136/jcp.40.3.298>
- Gieling, T. H., Corver, F. J. M., Janssen, H. J. J., Van Straten, G., Van Ooteghem, R. J. C., & Van Dijk, G. J. (2005). Hydrión-line, towards a closed system for water and nutrients: Feedback control of water and nutrients in the drain. *Acta Horticulturae*, 691, 259–266. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.691.30>
- Golcs, Á., Dargó, G., Balogh, G. T., Huszthy, P., & Tóth, T. (2021). Development of a microplate-format direct optode sensor for ultra-high-throughput environmental and wastewater monitoring of Pb²⁺. *Analytica Chimica Acta*, 1167, 338586. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338586>
- Grimaudo, M. A., Pescina, S., Padula, C., Santi, P., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C., & Nicoli, S. (2018). Poloxamer 407/TPGS Mixed Micelles as Promising Carriers for Cyclosporine Ocular Delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 15(2), 571–584. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00939>
- Gsangaya, K. R., Hajjaj, · S S H, Sultan, · M T H, & Hua, L. S. (2020). Portable, wireless, and effective internet of things-based sensors for precision agriculture. *International*

- Journal of Environmental Science and Technology*, 17(3), 3901–3916.
<https://doi.org/10.1007/s13762-020-02737-6>
- Hatcher, D. W., Symons, S. J., & Manivannan, U. (2004). Developments in the use of image analysis for the assessment of oriental noodle appearance and colour. *Journal of Food Engineering*, 61(1), 109–117. [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00192-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00192-4)
- Helfer, G. A., Tischer, B., Filoda, P. F., Parckert, A. B., dos Santos, R. B., Vinciguerra, L. L., Ferrão, M. F., Barin, J. S., & da Costa, A. Ben. (2018). A New Tool for Interpretation of Thermal Stability of Raw Milk by Means of the Alizarol Test Using a PLS Model on a Mobile Device. *Food Analytical Methods*, 11(7), 2022–2028. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1190-5>
- Hirayama, E., Sugiyama, T., Hisamoto, H., & Suzuki, K. (2000). Visual and Colorimetric Lithium Ion Sensing Based on Digital Color Analysis. *Analytical Chemistry*, 72(3), 465–474. <https://doi.org/10.1021/ac990588w>
- Hoffmann, K., & Weiss, E. (1974). Über metall-alkyl- und -aryl-verbindungen: XVI. Die kristallstrukturen von kaliumtetraphenylborat, $K[B(C_6H_5)_4]$ und tetramethylammonium-tetraphenylborat, $[N(CH_3)_4][B(C_6H_5)_4]$. *Journal of Organometallic Chemistry*, 67(2), 221–228. [https://doi.org/10.1016/S0022-328X\(00\)82348-7](https://doi.org/10.1016/S0022-328X(00)82348-7)
- Horwitz, W., & Albert, R. (2006). The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL*, 89(4). <https://academic.oup.com/jaoac/article/89/4/1095/5657708>
- Hugh Fan, Z. (2013). Chemical Sensors and Microfluidics. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 04(01), 1–2. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000e117>
- Instituto Nacional de Calidad. (2020). *Métodos de ensayos acreditados por la dirección de acreditación de INACAL*. <https://aplicaciones.inacal.gob.pe/crtacre/>
- Ivanov, I. (2020). Scientific achievements of modern society. Abstracts of the 9th International scientific and practical conference. *Cognum Publishing House, SP-1176/I*(April 2020), 162.
- Jain, R., Thakur, A., Kaur, P., Kim, K.-H., & Devi, P. (2020). Advances in imaging-assisted sensing techniques for heavy metals in water: Trends, challenges, and opportunities.

- TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 123, 115758.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115758>
- Janata, J., Josowicz, M., Vanýsek, P., & DeVaney, D. M. (1998). Chemical Sensors. *Analytical Chemistry*, 70(12), 179–208. <https://doi.org/10.1021/a1980010w>
- Jawad, H. M., Shallal, I. H., & Hassoni, M. H. (2019). Experimental and theoretical study of (PVC) nanoparticles prepared by laser ablation in ethanol. *AIP Conference Proceedings*, 2123(020101). <https://doi.org/10.1063/1.5117028>
- Kalinichev, A. V., Pokhvishcheva, N. V., & Peshkova, M. A. (2019). Novel color standards for digital color analysis of optochemical sensor arrays. *Talanta*, 197, 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.063>
- Kalinowska, A., Wicik, M., Matusiak, P., & Ciosek-Skibińska, P. (2021). Chemosensory Optode Array Based on Pluronic-Stabilized Microspheres for Differential Sensing. *Chemosensors*, 10(1), 2. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10010002>
- Kanchi, S., Sabela, M. I., Mdluli, P. S., Inamuddin, & Bisetty, K. (2018). Smartphone based bioanalytical and diagnosis applications: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 102, 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.021>
- Kassal, P., Sigurnjak, M., & Steinberg, I. M. (2019). Paper-based ion-selective optodes for continuous sensing: Reversible potassium ion monitoring. *Talanta*, 193, 51–55. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.031>
- Keçili, R., Ghorbani-Bidkorbeh, F., Altıntaş, A., & Hussain, C. M. (2021). Future of smartphone-based analysis. In *Smartphone-Based Detection Devices* (pp. 417–430). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823696-3.00007-6>
- Kirgintsev, A. N., & Kozitskii, V. P. (1968). Solubility of tetraphenylborates of the alkali metals and ammonium in acetone-water mixtures at 25°. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science*, 17(6), 1116–1118. <https://doi.org/10.1007/BF01106247>
- Kisiel, A., Maksymiuk, K., & Michalska, A. (2018). Capsules as ion-selective optodes – Maximizing sensitivity of ion-selective optodes. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 273(July), 1730–1734. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.07.054>
- Konefał, A., Piątek, P., Paterczyk, B., Maksymiuk, K., & Michalska, A. (2023). Ionophore

- based optical sensors using hydrophilic polymer matrix – Ratiometric, pH independent ion-selective optodes. *Talanta*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124038>
- Konstantin N., M. (2013). *Ion-Selective Electrodes* (Springer, Ed.; Primera Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36886-8>
- Koutras, M. V., Bersimis, S., & Maravelakis, P. E. (2007). Statistical Process Control using Shewhart Control Charts with Supplementary Runs Rules. *Methodology and Computing in Applied Probability*, 9(2), 207–224. <https://doi.org/10.1007/s11009-007-9016-8>
- Kudrevatykh, A. A., Neznaeva, D. A., Martyanov, T. P., & Klimenko, L. S. (2019). Effect of substituents on cation-receptor properties of crown-containing 1-hydroxyanthraquinone imines. *Russian Chemical Bulletin*, 68(3), 623–627. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2465-8>
- Kuo, C. H., Chen, J. H., Liou, B. K., & Lee, C. K. (2016). Utilization of acetate buffer to improve bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus*. *Food Hydrocolloids*, 53, 98–103. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2014.12.034>
- Lapresta Fernández. (2007). Sistemas de medida alternativos en sensores ópticos de un solo uso [Tesis Doctoral]. In *Universidad de Granada*. Universidad de Granada.
- Lapresta-Fernández, A., & Capitán-Vallvey, L. F. (2008). Scanometric potassium determination with ionophore-based disposable sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 134(2), 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.06.016>
- Lapresta-Fernández, A., & Capitán-Vallvey, L. F. (2011). Multi-ion detection by one-shot optical sensors using a colour digital photographic camera. *Analyst*, 136(19), 3917–3926. <https://doi.org/10.1039/c1an15204a>
- Lee, C. H., Folz, J., Zhang, W., Jo, J., Tan, J. W. Y., Wang, X., & Kopelman, R. (2017). Ion-Selective Nanosensor for Photoacoustic and Fluorescence Imaging of Potassium. *Anal. Chem*, 89, 7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00930>
- Lee, D., & Thomas, J. D. R. (1994). 4'-Picrylamino-5'-Nitrobenzo-18-Crown-6 As a Sensing Reagent in Potassium Ion-Selective Electrode Membranes. *Talanta*, 41(6), 901–907. [https://doi.org/10.1016/0039-9140\(94\)E0043-Q](https://doi.org/10.1016/0039-9140(94)E0043-Q)
- Lei, Q., Peng, B., Sun, L., Luo, J., Chen, Y., Kontogeorgis, G. M., & Liang, X. (2020).

- Predicting activity coefficients with the Debye–Hückel theory using concentration dependent static permittivity. *AIChE Journal*, 66(11). <https://doi.org/10.1002/aic.16651>
- Li, H., Mao, X., Han, Y., & Luo, Y. (2013). Wavelength dependence of colorimetric properties of lighting sources based on multi-color LEDs. *Optics Express*, 21(3), 3775. <https://doi.org/10.1364/OE.21.003775>
- Li, H., Zhu, Y., Islam, M. S., Rahman, M. A., Walsh, K. B., & Koley, G. (2017). Graphene field effect transistors for highly sensitive and selective detection of K⁺ ions. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 253, 759–765. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.06.129>
- Li, S. S. (2006). Semiconductor Physical Electronics. In Springer (Ed.), *Semiconductor Physical Electronics* (Second Edi). <https://doi.org/10.1007/0-387-37766-2>
- Lookadoo, D. B., Schonhorn, J. E., Harpaldas, H., Uherek, C. M., Schatz, P., Lindgren, A., Depa, M., & Kumar, A. A. (2021). Paper-Based Optode Devices (PODs) for Selective Quantification of Potassium in Biological Fluids. *Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00794>
- Luiz, V. H. M., Saraiva, L. M., Martins, Â. P., Pezza, L., & Pezza, H. R. (2015). Rapid Determination of Lead in Progressive Hair Dye Lotion by Spot Test/Diffuse Reflectance Spectroscopy with a Paper Platform. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20150200>
- MacKinnon, R. (2003). Potassium channels. *FEBS Letters*, 555(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01104-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01104-9)
- Magnusson, B. (2014). *The fitness for purpose of analytical methods : A laboratory guide to method validation and related topics (2nd ed. 2014)*. Eurachem. <https://www.eurachem.org/index.php/publications/guides/mv>
- Marschner, H. (1995). Functions of Mineral Nutrients. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 313–404. <https://doi.org/10.1016/b978-012473542-2/50011-0>
- Martinez, V., & Henary, M. (2016). Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. *Chemistry - A European Journal*, 22(39), 13764–13782. <https://doi.org/10.1002/chem.201601570>
- Masawat, P., Harfield, A., Srihirun, N., & Namwong, A. (2017). Green Determination of

- Total Iron in Water by Digital Image Colorimetry. *Analytical Letters*, 50(1), 173–185. <https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1174869>
- McCracken, K. E., & Yoon, J.-Y. (2016). Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review. *Analytical Methods*, 8(36), 6591–6601. <https://doi.org/10.1039/C6AY01575A>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., & Meena, R. S. (2016). Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture. *Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture*, 1–331. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2776-2>
- Mei, Q., Jing, H., Li, Y., Yisibashaer, W., Chen, J., Nan Li, B., & Zhang, Y. (2016). Smartphone based visual and quantitative assays on upconversional paper sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 75, 427–432. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.08.054>
- Merl, T., Rasmussen, M. R., Koch, L. R., Søndergaard, J. V., Bust, F. F., & Koren, K. (2022). Measuring soil pH at in situ like conditions using optical pH sensors (pH-optodes). *Soil Biology and Biochemistry*, 175, 108862. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2022.108862>
- Ministerio del Ambiente -Perú. (2014). *Guía para el muestreo de suelos*.
- Mistlberger, G., Crespo, G. A., & Bakker, E. (2014). Ionophore-Based Optical Sensors. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 7(1), 483–512. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071213-020307>
- Mohammed, A., & Abdullah, A. (n.d.). *SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM): A REVIEW*.
- Morf, W. E., Seiler, K., Lehmann, B., Behringer, C., Hartman, K., & Simon, W. (1989). Carriers for chemical sensors: Design features of optical sensors (optodes) based on selective chromoionophores. *Pure and Applied Chemistry*, 61(9), 1613–1618. <https://doi.org/10.1351/pac198961091613>
- Morf, W. E., Seiler, Kurt., Rusterholz, Bruno., & Simon, Wilhelm. (1990). Design of a novel calcium-selective optode membrane based on neutral ionophores. *Analytical Chemistry*, 62(7), 738–742. <https://doi.org/10.1021/ac00206a018>
- Mortari, B., Khan, S., Wong, A., Fireman Dutra, R. A., & Taboada Sotomayor, M. D. P. (2020). Next generation of optodes coupling plastic antibody with optical fibers for

- selective quantification of Acid Green 16. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 305, 127553. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.127553>
- Müller, A. (1863). Studien am Complementär - Colorimeter. *Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 2(1), 143–156. <https://doi.org/10.1007/BF01430188>
- Müller, Alex. (1853). Neues Colorimeter. *Journal Für Praktische Chemie*, 60(1), 474–476. <https://doi.org/10.1002/prac.18530600192>
- Nagorny, S., Marco Ferrante, Laubenstein, M., Nisi, S., & Ueki, T. (2020). Characterization of vanadium of biological origin for possible applications in physics experiments. *Journal of Environmental Radioactivity*, 225, 106426. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2020.106426>
- Nair, P. R., & Alam, M. A. (2006). Performance limits of nanobiosensors. *Applied Physics Letters*, 88(23), 11–14. <https://doi.org/10.1063/1.2211310>
- Norma Técnica Peruana. (2017). ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración. In *Instituto Nacional de Calidad* (p. 38 p). INACAL.
- Ortuño, J. A., Expósito, R., Martínez, F., Sánchez-Pedreño, C., García, M. S., & Albero, M. I. (2006). Linear and nonlinear approaches to study transient signals of a flow-through bulk optode. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 115(2), 584–588. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.10.022>
- Parsaee, Z., Karachi, N., & Razavi, R. (2018). Ultrasound assisted fabrication of a novel optode base on a triazine based Schiff base immobilized on TEOS for copper detection. *Ultrasonics Sonochemistry*, 47, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.04.007>
- Paulauskas, R., Striūgas, N., Sadeckas, M., Sommersacher, P., Retschitzegger, S., & Kienzl, N. (2020). Online determination of potassium and sodium release behaviour during single particle biomass combustion by FES and ICP-MS. *Science of the Total Environment*, 746. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141162>
- Pechenkina, I. A., & Mikhelson, K. N. (2015). Materials for the ionophore-based membranes for ion-selective electrodes: Problems and achievements (review paper). *Russian Journal of Electrochemistry*, 51(2), 93–102. <https://doi.org/10.1134/S1023193515020111>

- Pérez-López, E., & Esquivel-Arias, R. (2018). Adecuación de metodologías para análisis de sodio y potasio por espectroscopía de absorción atómica, en sales de rehidratación oral. *Revista Tecnología En Marcha*, 31(2), 40. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i2.3623>
- Pessoa, K. D., Suarez, W. T., dos Reis, M. F., de Oliveira Krambeck Franco, M., Moreira, R. P. L., & dos Santos, V. B. (2017). A digital image method of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.072>
- Phichi, M., Imyim, A., Tuntulani, T., & Aeungmaitrepirom, W. (2020). Paper-based cation-selective optode sensor containing benzothiazole calix[4]arene for dual colorimetric Ag⁺ and Hg²⁺ detection. *Analytica Chimica Acta*, xxxx, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.01.005>
- Pierre Meier, A. E. M., & Michele Dartiguenave, Y. D. (1976). Anion Cryptates: Highly Stable and Selective Macrotricyclic Anion Inclusion Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 6403–6405.
- Pratap-Singh, A., Guo, Y., Lara Ochoa, S., Fathordoobady, F., & Singh, A. (123 C.E.). Optimal ultrasonication process time remains constant for a specific nanoemulsion size reduction system. *Scientific Reports* |, 11, 9241. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87642-9>
- Raghad Mouhamad, A. A. and M. I. (2016). Behavior of Potassium in Soil: A mini review. *Chemistry International* , 2(1), 47–58. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4830.7041>
- Rahimi, M., Mahani, M., & Hassani, Z. (2019). Carbon quantum dots fluorescence quenching for potassium optode construction. *Luminescence*, 34(4), 402–406. <https://doi.org/10.1002/bio.3634>
- Reda, A., El-Safty, S. A., Selim, M. M., & Shenashen, M. A. (2021). Optical glucose biosensor built-in disposable strips and wearable electronic devices. *Biosensors and Bioelectronics*, 185, 113237. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2021.113237>
- Regan, F. (2018). Sensors Overview. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (3rd ed., Issue October). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14540-8>

- Reis, M. C. (2021). Ion activity models: the Debye-Hückel equation and its extensions. *ChemTexts*, 7, 9. <https://doi.org/10.1007/s40828-020-00130-x>
- Rios, A., Escarpa, A., & Simonet, B. (2009). *Miniaturization of Analytical Systems*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470748091>
- Rittersdorf, W., Guethlein, W., Thym, D., & Vogel, P. (1993). *Method for the determination of an ion with increased sensitivity, use of substances which are suitable for this and a correspondin gagent* (Patent 5,215,924).
- Robinson, K. J., Soda, Y., & Bakker, E. (2022). Recent improvements to the selectivity of extraction-based optical ion sensors. *Chemical Communications*, 58(27), 4279–4287. <https://doi.org/10.1039/D1CC06636F>
- Robinson, K., Mao, C., & Bakker, E. (2021). Surfactants for Optode Emulsion Stabilization without Sacrificing Selectivity or Binding Constants. *Analytical Chemistry*, 93(48), 15941–15948. <https://doi.org/doi:10.1021/acs.analchem.1c03232>
- Rodriguez, S. M. (2014). *Estudio de metodos para la estimacion del tiempo de vida de luminiscencia en fases sensoras opticas: Desarrollo, implementacion y evaluacion de un banco de pruebas de laboratorio para la caracterizacion de fases sensoras opticas de diverso tipo* [Tesis Doctoral]. Universidad de Granada.
- Rose, M. C., & Henkens, R. W. (1974). Stability of sodium and potassium complexes of valinomycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 372(2), 426–435. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(74\)90204-9](https://doi.org/10.1016/0304-4165(74)90204-9)
- Ruckh, T. T., Skipwith, C. G., Chang, W., Senko, A. W., Bulovic, V., Anikeeva, P. O., & Clark, H. A. (2016). Ion-Switchable Quantum Dot Förster Resonance Energy Transfer Rates in Ratiometric Potassium Sensors. *ACS Nano*, 10(4), 4020–4030. <https://doi.org/10.1021/acs.nano.5b05396>
- Rüdorff, W., & Zannier, H. (1952). Eine mabanalytische Methode zur Bestimmung des Kaliums iiber das Kaliumtetraphenylborat. *Fresenius' Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 137(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/BF00452418>
- Ruedas-Rama, M. J., & Hall, E. A. H. (2006). K⁺-selective nanospheres: Maximising response range and minimising response time. *Analyst*, 131(12), 1282–1291. <https://doi.org/10.1039/b608901a>

- Sahu, A., Kasoju, N., Goswami, P., & Bora, U. (2011). Encapsulation of curcumin in Pluronic block copolymer micelles for drug delivery applications. *Journal of Biomaterials Applications*, 25(6), 619–639. <https://doi.org/10.1177/0885328209357110>
- Saiz, E., Banicevic, I., Espinoza Torres, S., Bertata, S., Picasso, G., O'Brien, M., & Radu, A. (2023). Portable, low-cost, Raspberry Pi-based optical sensor (PiSENS): continuous monitoring of atmospheric nitrogen dioxide. *Analytical Methods*, 15(4), 482–491. <https://doi.org/10.1039/D2AY01433E>
- Saranchina, N. V., Slizhov, Y. G., Vodova, Y. M., Murzakasymova, N. S., Ilyina, A. M., Gavrilenko, N. A., & Gavrilenko, M. A. (2021). Smartphone-based colorimetric determination of fluoride anions using polymethacrylate optode. *Talanta*, 226, 122103. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122103>
- Scientific Horiba LAQUA. (n.d.). *Medidores de bolsillos de calidad de agua*. HORIBA; Instrumentación Científica y Tecnológica S.A. de C.V. http://www.instrumentacioncientifica.com.mx/images/PDFS/CatalogoHORIBA__LAQUAtwin_serie_11.pdf
- Scott, A. D., & Reed, M. G. (1962). Chemical Extraction of Potassium from Soils and Micaceous Minerals With Solutions Containing Sodium Tetraphenylboron: III. Illite. *Soil Science Society of America Journal*, 26(1), 45–48. <https://doi.org/10.2136/sssaj1962.03615995002600010012x>
- Seiler, K., & Simon, W. (1992). Principles and mechanisms of ion-selective optodes. *Sensors and Actuators: B. Chemical*, 6(1–3), 295–298. [https://doi.org/10.1016/0925-4005\(92\)80073-7](https://doi.org/10.1016/0925-4005(92)80073-7)
- Seiler, K., Wang, K., Bakker, E., Morf, W. E., Spichiger, U. E., Simon, W., Lindner, E., & Pungor, E. (1991). Characterization of Sodium-Selective Optode Membranes Based on Neutral Ionophores and Assay of Sodium in Plasma. *Clinical Chemistry*, 36(8), 1350–1355. <https://doi.org/10.2116/analsci.6.715>
- Seoane, T., Martín, J. L. R., Martín-Sánchez, E., Lurueña-Segovia, S., & Alonso Moreno, F. J. (2007). Capítulo 7: Estadística: Estadística Descriptiva y Estadística Inferencial. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 33(9), 466–471. [https://doi.org/10.1016/S1138-3593\(07\)73945-X](https://doi.org/10.1016/S1138-3593(07)73945-X)

- Shibata, H., Henares, T. G., Yamada, K., Suzuki, K., & Citterio, D. (2018). Implementation of a plasticized PVC-based cation-selective optode system into a paper-based analytical device for colorimetric sodium detection †. *Analyst*, 143, 678. <https://doi.org/10.1039/c7an01952a>
- Shibata, H., Hiruta, Y., & Citterio, D. (2019). Fully inkjet-printed distance-based paper microfluidic devices for colorimetric calcium determination using ion-selective optodes †. *Cite This: Analyst*, 144, 1178. <https://doi.org/10.1039/c8an02146e>
- Shortreed, M. R., Dourado, S., & Kopelman, R. (1997). Development of a fluorescent optical potassium-selective ion sensor with ratiometric response for intracellular applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 38(1–3), 8–12. [https://doi.org/10.1016/S0925-4005\(97\)80166-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4005(97)80166-9)
- Soares, S., Nunes, L. C., Melchert, W. R., & Rocha, F. R. P. (2020). Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends. *Microchemical Journal*, 152, 104273. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104273>
- Soda, Y., & Bakker, E. (2021). Colorimetric ratiometry with ion optodes for spatially resolved concentration analysis. *Analytica Chimica Acta*, 1154. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338225>
- Soda, Y., Citterio, D., & Bakker, E. (2019). Equipment-Free Detection of K⁺ on Microfluidic Paper-Based Analytical Devices Based on Exhaustive Replacement with Ionic Dye in Ion-selective Capillary Sensors. *ACS Sensors*, 4(3), 670–677. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b01521>
- Soda, Y., Shibata, H., Yamada, K., Suzuki, K., & Citterio, D. (2018). Selective Detection of K⁺ by Ion-Selective Optode Nanoparticles on Cellulosic Filter Paper Substrates. *ACS Applied Nano Materials*, 1(4), 1792–1800. <https://doi.org/10.1021/acsanm.8b00222>
- Stelmach, E., Kłucińska, K., Maksymiuk, K., & Michalska, A. (2019). Rational design of nanoptodes architecture – Towards multifunctional sensors. *Talanta*, 196(October 2018), 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.047>
- Stern, M. K. (2003). Environmentally Sound Agricultural Chemistry: From Process Technology To Biotechnology. In *The Environment: Challenges for the Chemical Sciences in the 21st Century*. National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10803>

- Stevens, J. D., Murray, D., Diepeveen, D., & Toohey, D. (2023). Development and Testing of an IoT Spectroscopic Nutrient Monitoring System for Use in Micro Indoor Smart Hydroponics. *Horticulturae*, 9(2), 185. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9020185>
- Stich, M. I. J., Borisov, S. M., Henne, U., & Schäferling, M. (2009). Read-out of multiple optical chemical sensors by means of digital color cameras. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139(1), 204–207. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2008.12.036>
- Stock, J. T. (1994). The Duboscq Colorimeter and Its Inventor. *Journal of Chemical Education*, 71(11), 967. <https://doi.org/10.1021/ed071p967>
- Strömberg, N., Engelbrektsson, J., & Delin, S. (2009). A high throughput optical system for imaging optodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 140(2), 418–425. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.05.011>
- Su, Z. F., Ran, X. Q., Leitch, J. J., Schwan, A. L., Faragher, R., & Lipkowski, J. (2019). How Valinomycin Ionophores Enter and Transport K⁺ across Model Lipid Bilayer Membranes. *Langmuir*, 35(51), 16935–16943. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03064>
- Tenjimbayashi, M., Komatsu, H., Akamatsu, M., Nakanishi, W., Suzuki, K., Hill, J. P., Shiratori, S., & Ariga, K. (2016). Determination of blood potassium using a fouling-resistant PVDF-HFP-based optode. *RSC Advances*, 6(17), 14261–14265. <https://doi.org/10.1039/c5ra26514b>
- Tiuftiakov, N. Yu., Kalinichev, A. V., Pokhvishcheva, N. V., & Peshkova, M. A. (2021). Digital color analysis for colorimetric signal processing: Towards an analytically justified choice of acquisition technique and color space. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 344, 130274. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130274>
- Ul-Hamid, A. (2018). Introduction. In *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy* (pp. 1–14). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98482-7_1
- Van Loco, J., Elskens, M., Croux, C., & Beernaert, H. (2002). Linearity of calibration curves: Use and misuse of the correlation coefficient. *Accreditation and Quality Assurance*, 7(7), 281–285. <https://doi.org/10.1007/s00769-002-0487-6>
- Vélez Martínez, J. A. (2015). *SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS*

DE PLATA EMPLEANDOCOPOLÍMEROS DE BLOQUE (F127 Y P103) [Tesis para obtener el título de INGENIERO QUÍMICO]. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.

- Wang, L., & Bakker, E. (2019). A tunable detection range of ion-selective nano-optodes by controlling solvatochromic dye transducer lipophilicity. *Chemical Communications*, 55(83), 12539–12542. <https://doi.org/10.1039/c9cc06729a>
- Wang, L., Sadler, S., Cao, T., Xie, X., Moser, J., Filseck, V., & Bakker, E. (2019). Simplified Fabrication for Ion-Selective Optical Emulsion Sensor with Hydrophobic Solvatochromic Dye Transducer: A Cautionary Tale Made available through a Creative Commons CC-BY-NC-ND License. *Anal. Chem*, 91, 33. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b01145>
- Wang, L., Xie, X., Zhai, J., & Bakker, E. (2016). Reversible pH-independent optical potassium sensor with lipophilic solvatochromic dye transducer on surface modified microporous nylon † ChemComm COMMUNICATION. 14254 | *Chem. Commun*, 52, 14254. <https://doi.org/10.1039/c6cc07841a>
- Wang, R., Du, X., Wu, Y., Zhai, J., & Xie, X. (2018). Graphene Quantum Dots Integrated in Ionophore-Based Fluorescent Nanosensors for Na⁺ and K⁺. *ACS Sensors*, 3(11), 2408–2414. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00918>
- Wang, X., Zhou, Y., Decker, V., Meyerhoff, M., Sun, M., & Cui, Y. (2020). Plasticizer-free and pH-independent ion-selective optode films based on a solvatochromic dye. *Analytical Methods*, 12(20), 2547–2550. <https://doi.org/10.1039/d0ay00439a>
- Xie, X., & Bakker, E. (2017). Ion selective optodes: From the bulk to the nanoscale. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(14), 3899–3910. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8413-4>
- Xie, X., Mistlberger, G., & Bakker, E. (2013). Ultrasmall fluorescent ion-exchanging nanospheres containing selective ionophores. *Analytical Chemistry*, 85(20), 9932–9938. <https://doi.org/10.1021/ac402564m>
- Xie, X., Zhai, J., & Bakker, E. (2014). PH independent nano-optode sensors based on exhaustive ion-selective nanospheres. *Analytical Chemistry*, 86(6), 2853–2856. <https://doi.org/10.1021/ac403996s>

- Xie, X., Zhai, J., Jarolímová, Z., & Bakker, E. (2016). Determination of pKa Values of Hydrophobic Colorimetric pH Sensitive Probes in Nanospheres. *Analytical Chemistry*, 88(6), 3015–3018. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b04671>
- Xing, Y., Zhu, Q., Zhou, X., & Qi, P. (2020). A dual-functional smartphone-based sensor for colorimetric and chemiluminescent detection: A case study for fluoride concentration mapping. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 319, 128254. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128254>
- Yadav, P., Yadav, L., Laddha, H., Agarwal, M., & Gupta, R. (2022). Upsurgence of smartphone as an economical, portable, and consumer-friendly analytical device/interface platform for digital sensing of hazardous environmental ions. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 36, e00177. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00177>
- Yang, C., Qin, Y., Jiang, D., & Chen, H. Y. (2016). Continuous Fluorescence Imaging of Intracellular Calcium by Use of Ion-Selective Nanospheres with Adjustable Spectra. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(31), 19892–19898. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05406>
- Ye, N., Wygladacz, K., & Bakker, E. (2007). Absorbance characterization of microsphere-based ion-selective optodes. *Analytica Chimica Acta*, 596(2), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.015>
- Yu, J., Qin, X., Wang, D., Lin, C., Xian, X., & Tao, N. (2019). Light-Controlled Configurable Colorimetric Sensing Array. *Analytical Chemistry*, 91(10), 6632–6637. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00549>
- Yun, H. (2007). Assessment of Ion-Selective Optical Nanosensors for Drug Screening Applications by. *Materials Science*.
- Zarrintaj, P., Ahmadi, Z., Reza Saeb, M., & Mozafari, M. (2018). Poloxamer-based stimuli-responsive biomaterials. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15516–15523. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.04.158>
- Zhang, Y., Du, X., & Xie, X. (2022). Ionophore-Based Potassium Selective Fluorescent Organosilica Nano-Optodes Containing Covalently Attached Solvatochromic Dyes. *Chemosensors*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/chemosensors10010023>

Zieger, S. E., Jones, P. D., & Koren, K. (2022). Noise versus Resolution in Optical Chemical Imaging—How Reliable Are Our Measurements? *ACS Omega*, 7(14), 11829–11838. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c07232>

CAPÍTULO 7. ANEXOS

7.1. Matriz de consistencia

Aspecto / Objetivo	Actividad / Método	Resultados Esperados	Evidencia / Resultados Encontrados
Preparación de bulk-optodo y nano-optodo	Síntesis con ionóforo valinomicina, intercambiador de iones, cromoionóforo ETH 5294; miniaturización con Pluronic	Optodos con composición óptima y buena estabilidad	Bulk-optodo: 2.43 μM valinomicina, 2.42 μM intercambiador, 2.40 μM ETH 5294; nano-optodo con 20 mg Pluronic F-127 y sonicación
Caracterización óptica	Espectroscopía UV-VIS en 400-800 nm	Cambios en λ máx acorde a concentración de potasio	$\lambda_{\text{máx}}$ desplazada de 667 nm (bajo K^+) a 529 nm (alto K^+); efecto hipsocrómico característico del cromoionóforo I
Caracterización nano-optodo	Microscopía SEM y DLS; medición tamaño micelas con variación de Pluronic	Tamaño micelas controlado por surfactante; presencia de micelas confirmada	Tamaños micelas huecas 82-87 nm; aumento a 181-412 nm con adición de cocktail; efecto Tyndall observado
Optimización de composición de optodos	Ajuste de proporciones de ionóforo, intercambiador, cromoionóforo; ajuste PVC-DOS y Pluronic según optodo	Membrana homogénea, electroneutralidad, mejor desempeño analítico	Mejor señal cuando $\text{CI}=\text{CS}=\text{CC}$; proporción soporte bulk-optodo 80 mg PVC y 160 mg DOS; nano-optodo con 20 mg Pluronic F-127
Rango y linealidad de calibración	Calibración para concentraciones de potasio con ambos optodos	Amplio rango con buena linealidad	Bulk-optodo: 10^{-6} M a 1.0 M ($r^2=0.9945$); nano-optodo: 10^{-4} M a 1.0 M ($r^2=0.9953$)

Selectividad frente a iones interferentes	Evaluación coeficientes de selectividad con Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}	Coefficiente >1 para interferentes, buena selectividad para K^+	Bulk-optodo y nano-optodo con coeficientes >1 para todos; secuencia $\text{Na}^+ < \text{Li}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$
Recuperación en presencia de interferentes	Prueba adición individual y simultánea de interferentes en concentraciones estándar	Recuperaciones cercanas al 100 %	Recuperaciones individuales ~ 100 %; combinados: sesgo con recuperaciones 105.7 % a 116 %
Límites de detección y cuantificación	Cálculo de LOD y LOQ para potasio	Límites adecuados y coherentes con sensibilidad	LDBO=0.31 μM ; LDNO=30.3 μM ; LCBO=1.05 μM ; LCNO=0.10 mM
Precisión y estabilidad bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad	Evaluación de RSD en varias concentraciones y condiciones	RSD bajo RSDHorwitz excepto en alta concentración para bulk-optodo	Nano-optodo con menor variabilidad que bulk-optodo; $\text{RSD} > \text{RSDHorwitz}$ solo en 1.0 M bulk-optodo
Veracidad en muestras reales	Comparación con métodos AA y ISE en suelos agrícolas; análisis estadístico ANOVA	Resultados estadísticamente equivalentes y confiables	p-value > 0.05 ; concentraciones potasio de muestras entre $6.84 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $8.72 \times 10^{-2} \text{ M}$
Estabilidad temporal de la señal	Evaluación de estabilidad hasta 2 horas (bulk) y 48 horas (nano) en varias concentraciones	Mayor estabilidad del nano-optodo	Bulk-optodo estable 1h (baja concentración), nano-optodo estable hasta 48h (baja concentración)

7.2. Matriz de Operaciones de Variables

Variable	Tipo	Descripción	Valores / Rangos Óptimos	Relación / Condición	Efectos en el sistema	Medición / Método
Ionóforo (Valinomicina) (CI)	Variable activa	Concentración del ionóforo valinomicina en μM	2.43 μM	$\text{CI} \geq \text{CS} \geq \text{CC}$ (ionóforo $\geq$ intercambiador $\geq$ cromoionóforo)	Influye en sensibilidad y selectividad del optodo	UV-VIS, calibración
Intercambiador de iones (CS)	Variable activa	Concentración del tetrakis (4-clorofenil) borato de potasio en μM	2.42 μM	$\text{CI} \geq \text{CS} \geq \text{CC}$	Mantiene electroneutralidad, afecta respuesta analítica	UV-VIS, calibración
Cromoionóforo (CC)	Variable activa	Concentración del ETH 5294 en μM	2.40 μM	$\text{CI} \geq \text{CS} \geq \text{CC}$	Determina desplazamiento de pico en espectro y color	UV-VIS, espectroscopía
Polímero PVC (Bulk-optodo)	Soporte	Cantidad de polímero PVC en mg	80 mg	Proporción ideal PVC:plastificante DOS = 1:2	Soporte mecánico, fijación de fase sensora	Pesaje, preparación membrana
Plastificante DOS (Bulk-optodo)	Soporte	Cantidad de plastificante DOS en mg	160 mg	Proporción ideal PVC:plastificante DOS = 1:2	Mejora flexibilidad y adhesión del bulk-optodo	Pesaje, preparación membrana
Surfactante Pluronic F-127 (Nano)	Variable soporte	Concentración de surfactante para formación de micelas	20 mg (1.0 % p/v)	Relación directa con tamaño de micelas	Controla tamaño y estabilidad de nano-optodo	SEM, DLS, efecto Tyndall
Tamaño promedio micelas	Variable respuesta	Tamaño nanométrico de las micelas del nano-optodo (nm)	82.2-87 nm (vacías), 181.7-412.4 nm (con optodo)	Depende de concentración de Pluronic y compuestos activos	Incremento indica hinchazón y carga de micelas	SEM, DLS
Rango de concentración K^+	Rango operativo	Concentración de potasio para calibración lineal	Bulk: 10^{-6} a 1.0 M; Nano: 10^{-4} a 1.0 M	-	Define límite de detección y cuantificación	Calibración UV-VIS

Coeficiente de determinación (r^2)	Calidad calibración	Medida de ajuste lineal de la calibración	Bulk: 0.9945; Nano: 0.9953	-	Indica precisión y linealidad del sensor	Análisis estadístico
Selectividad (coeficiente k)	Variable selectividad	Coeficiente de selectividad frente a interferentes Na^+ , Li^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}	Bulk: 1.79-3.45; Nano: 3.04-4.20	$k > 1.0$ (mínimo 1.0 para interferencia $\leq 10\%$)	A mayor k, menor interferencia de otros iones	Pruebas con interferentes
Límite de detección (LOD)	Sensibilidad	Concentración mínima detectable	Bulk: 0.31 μM ; Nano: 30.3 μM	-	Nano-optodo menos sensible pero más estable	Análisis de señal
Límite de cuantificación (LOQ)	Sensibilidad	Concentración mínima cuantificable	Bulk: 1.05 μM ; Nano: 0.10 mM	-	Nano-optodo con mejor rango cuantificable	Análisis de señal
Repetibilidad (RSDr)	Precisión	Variabilidad bajo condiciones controladas	Bulk: $>2\%$ en 1.0 M; Nano: $<2\%$ en todo rango	$\text{RSDr} < \text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ (2%) ideal	Nano-optodo más estable y reproducible	Análisis estadístico
Reproducibilidad (RSDR)	Precisión	Variabilidad entre diferentes analistas	Bulk: $>2\%$ en 1.0 M; Nano: $<2\%$ en todo rango	$\text{RSDR} < \text{RSD}_{\text{Horwitz}}$ ideal	Nano-optodo con mejor desempeño a largo plazo	Análisis estadístico
Tiempo de estabilidad	Estabilidad	Duración en que el optodo mantiene respuesta estable	Bulk: ≤ 1 h (alta conc.); Nano: hasta 48 h (baja conc.)	-	Nano-optodo más estable en el tiempo	Monitoreo continuo de señal
Recuperación con interferentes	Veracidad	Porcentaje de potasio recuperado tras adición de interferentes	-100% individual, 105-116% combinado	-	Indica precisión en presencia de interferentes	Ensayos de recuperación
Veracidad en muestras reales	Validación	Comparación con métodos estándar (AA, ISE)	Estadísticamente equivalente ($p > 0.05$)	-	Confirma aplicabilidad para análisis de suelos agrícolas	Análisis estadístico ANOVA