



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN SELECTIVA DE METALES CONTAMINANTES
UTILIZANDO MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE INCLUSIÓN COMO
SENSORES ÓPTICO-QUÍMICOS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JENIFFER GARCÍA BELEÑO

Dr. EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN SELECTIVA DE METALES CONTAMINANTES
UTILIZANDO MEMBRANAS POLIMÉRICAS DE INCLUSIÓN COMO
SENSORES ÓPTICO-QUÍMICOS**

**TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. JENIFFER GARCÍA BELEÑO

**Dr. EDUARDO RODRIGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO
FACULTAD DE QUÍMICA**



Ciudad de México, octubre de 2022

*Determinación Selectiva de Metales Contaminantes Utilizando
Membranas Poliméricas de Inclusión Como Sensores Óptico-
Químicos*

Laboratorio 109
Departamento de Química Analítica
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis Doctoral

Jeniffer García Beleño

1. *Presidente:* Dra. Josefina de Gyves Marciniak
 2. *Vocal:* Dra. Pilar Cañizares Macías
 3. *Vocal:* Dra. América Rosalba Vázquez Olmos
 4. *Vocal:* Dra. Flora Emperatriz Mercader Trejo
 5. *Secretario:* Dra. Lilián Iraís Olvera Garza
- Asesor:** Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

Octubre, 2022

Dedicatoria

A mis abuelos, *Jaime y Uba*. Todo lo que fui, todo lo que soy, y todo lo que estoy construyendo es por y para ustedes. Gracias por enseñarme a tratar la vida con profundo amor.

” Cuando muere, todo el mundo debe dejar algo detrás, decía mi abuelo. Un hijo, un libro, un cuadro, una casa, una pared levantada, o un par de zapatos. O un jardín plantado, algo que tu mano tocara de un modo especial, de modo que tu alma tenga algún sitio a dónde ir cuando tú mueras, y cuando la gente mire ese árbol, o esa flor, que tú plantaste, tú estarás allí. ‘No importa lo que hagas’ – decía-, en tanto que cambies algo respecto a cómo era antes de tocarlo, convirtiéndolo en algo que sea como tú después de que separes de ellos tus manos.

— Ray Bradbury, *Fahrenheit 451*

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por ser mi casa durante estos años.

Al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel por su tiempo, su generosidad, y su humanidad. Gracias porque para mí fue un tutor excepcional, sus enseñanzas las llevaré toda mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado, número de CVU 739039

A los miembros del comité tutor, Dr. Gustavo Zelada y Dra. María del Pilar Cañizares, por sus siempre acertadas y valiosas observaciones, por su tiempo y su disponibilidad.

A los miembros del jurado por sus correcciones y sus valiosos aportes.

A la M. en C. Guadalupe Espejel por su apoyo técnico, su paciencia y disponibilidad. Es una mujer excepcional.

A la M en C. Nadia Munguía por todo el apoyo brindado.

*Y a todos aquellos que quizá olvido, pero que me vieron cruzar este camino de enseñanzas y transformación. Quien hoy se va no es la misma que un 2 de enero del 2016 llegó a tierras aztecas.
Infinitas gracias.*

Productos y actividades académicas

Publicaciones

García-Beleño, J.; Rodríguez de San Miguel, E. Integration of Response Surface Methodology (RSM) and Principal Component Analysis (PCA) as an Optimization Tool for Polymer Inclusion Membrane Based-Optodes Designed for Hg(II), Cd(II), and Pb(II). *Membranes* **2021**, *11*, 288.

Congresos

- Participación en el **X Congreso Anual de la Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Membranas, A.C.**, llevado a cabo de forma virtual del 21 al 22 de octubre de 2021, con el trabajo titulado: "*Utilización de métodos quimiométricos como herramienta de optimización de óptodos para Hg(II), Cd(II) y Pb(II) basados en membranas poliméricas de inclusión*", en *modalidad oral*.
- Participación en el **VII Encuentro Argentino de Materia Blanda**, llevado a cabo en forma virtual del 27 al 29 de septiembre del 2021, con el trabajo titulado: "Integración de la metodología de superficie de respuesta (RSM) y Análisis de componentes principales (PCA) como herramienta de optimización para óptodos basados en membranas poliméricas de inclusión, diseñados para Hg(II), Cd(II) y Pb(II)", en *modalidad póster*. *Universidad de Buenos Aires, Argentina*.
- Participación en el **LatinXChem 2021, Twitter Conference** llevado a cabo el 20 de septiembre del 2021, con el trabajo titulado: "Use of Chemometric Methods as an Optimization Tool for Optodes Based on Polymeric Inclusion Membranes for Hg(II), Cd(II) and Pb(II) Determination", en *modalidad póster*, obteniendo *mención honorífica*.

Glosario

Las siglas mostradas se encuentran en inglés al ser la terminología de uso más frecuente

ALS	Mínimos cuadrados alternos
ANOVA	Análisis de varianza
ASV	Voltamperometría de redisolución anódica
CTA	Triacetato de celulosa
DoE	Diseño de experimentos
Dz, ditizona	1,5-difeniltiocarbazona
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FAAS	Espectrometría de absorción atómica de flama
GFAAS	Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito
ICP/OES	Espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado por inducción
IR	Infrarrojo
MCR	Resolución multivariada de curvas
MPI	Membrana polimérica de inclusión
MSR	Metodología de superficie de respuesta
PAN	1-(2-piridilazo)-2-naftol
PCA	Análisis de componentes principales
PC	Componente principal
PVC	Cloruro de polivinilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SVD	Descomposición en valores singulares
TEHP	Tris(2-hetilhexil) fosfato
TXRF	Fluorimetría de rayos X de reflexión total
UV-Vis	Espectroscopía ultravioleta-visible
2-NPOE	2-nitrofenil octil éter

Contenido

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
PRODUCTOS Y ACTIVIDADES ACADÉMICAS.....	6
PUBLICACIONES.....	6
CONGRESOS	6
GLOSARIO.....	7
CONTENIDO	8
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABLAS	15
ÍNDICE DE ESQUEMAS E IMÁGENES	18
RESUMEN.....	19
ABSTRACT	20
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES, PROBLEMÁTICA Y ENFOQUE TEÓRICO DEL USO DE LAS MPIS COMO SENSORES QUÍMICOS	21
INTRODUCCIÓN.....	21
1.1. <i>Metales pesados</i>	22
1.1.1. Plomo	23
1.1.2. Cadmio	23
1.1.3. Mercurio	24
1.2. <i>Métodos convencionales en la determinación de metales pesados</i>	24
1.3. <i>Sensores óptico-químicos</i>	25
1.3.1. Definición y generalidades.....	25
1.3.2. Principio químico.....	26
1.4. <i>Membranas poliméricas de inclusión</i>	27
1.4.1. Definición y generalidades	27
1.4.2. Polímero base	28
1.4.3. Plastificante	29
1.4.4. Indicadores metalocrómicos.....	30
1.5. <i>PAN y Ditizona como cromóforos</i>	31
1.5.1. PAN 1-(2-piridilazo)-2-naftol (Peso Molecular 249.27 g/mol)	31
1.5.2. Ditizona 1,5-difeniltiocarbazona (Peso Molecular 256.33 g/mol).....	32
1.6. <i>MPI en sensores óptico-químico</i>	33
1.6.1. Mecanismos de detección en MPI como sensores óptico-químicos.....	37
1.6.1.1. Mecanismo de extracción de cationes y desempeño de las MPI	37
HIPÓTESIS.....	38
OBJETIVOS.....	39
<i>Objetivo general</i>	39
<i>Objetivos específicos</i>	39
CAPÍTULO 2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LAS MPIS Y EL TIEMPO DE AGITACIÓN. IMPLICACIONES TEÓRICAS Y DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
INTRODUCCIÓN.....	40
2.1. <i>Quimiometría</i>	41
2.2. <i>Metodología de superficie de respuesta</i>	41
2.3. <i>Diseño experimental DoE</i>	43

2.3.1. Diseño Experimental Doehlert	44
2.3.2. Función deseabilidad de Derringer	45
2.4. Análisis de componentes principales	46
2.5. Materiales y métodos	46
2.5.1. Reactivos	46
2.5.2. Equipos	46
2.5.3. Matriz de diseño	47
2.5.3.1. Selección de las variables a optimizar	48
2.5.4. Preparación de las membranas	49
2.5.5. Adquisición del espectro visible de los sensores	49
2.5.6. Determinación de los iones metálicos	50
2.5.7. Presentación y estrategia del análisis de los datos	50
2.6. Resultados y discusión	51
2.6.1. M1: Análisis de componentes principales de los espectros complejados	53
2.6.2. M2: Uso de las absorbancias del cromóforo libre y del complejo formado	57
2.6.3. M3: Análisis de componentes principales sobre la sustracción de los espectros normalizados antes y después de la complejación	60
Conclusiones	66
CAPÍTULO 3. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DE LOS SENSORES ÓPTICO-QUÍMICOS	68
INTRODUCCIÓN	68
3.1. Materiales y métodos	69
3.1.1. Reactivos	69
3.1.2. Evaluación de la reproducibilidad	69
3.1.3. Evaluación de la estabilidad	70
3.1.4. Evaluación de la reversibilidad	71
3.1.5. Optimización del pH y concentración de las disoluciones metálicas	71
3.2. Resultados y discusión	73
3.2.1. Reproducibilidad de los sensores	73
3.2.2. Estabilidad de los sensores	76
3.2.3. Reversibilidad de los sensores	78
3.2.4. Efecto del pH y la concentración de las disoluciones metálicas	87
3.2.4.1. Sistemas con PAN	94
3.2.4.2. Sistemas con Ditizona	95
Conclusiones	96
CAPÍTULO 4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS IONES METÁLICOS EMPLEANDO HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS, UNA PRIMERA APROXIMACIÓN	98
INTRODUCCIÓN	98
4.1. Materiales y métodos	101
4.1.1. Reactivos	101
4.1.2. Equipos	101
4.1.3. Determinación del rango dinámico de los sensores	102
4.1.4. Determinación simultánea	102
4.2. Resultados y discusión	104
4.2.1. Determinación del rango dinámico	104
4.2.2. Determinación simultánea de los iones metálicos	105
4.2.2.1. Descripción del conjunto de datos	105
4.2.2.2. Resultados empleando Ditizona como cromóforo	106
4.2.2.3. Resultados empleando PAN como cromóforo	109
Conclusiones	111
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES	112
REFERENCIAS	114

ANEXOS	127
A1. CAPÍTULO 2.	127
<i>A1.1. M1: Análisis de componentes principales de los espectros complejados</i>	<i>127</i>
<i>A1.2. M2: Uso de las absorbancias del cromóforo libre y del complejo formado</i>	<i>136</i>
<i>A1.3. M3: Análisis de componentes principales sobre la sustracción de los espectros normalizados antes y después de la complejación</i>	<i>145</i>
A2. CAPÍTULO 3.	152
<i>A2.1. Optimización del pH y la concentración de las disoluciones de los iones metálicos.....</i>	<i>152</i>
A2.1.2. Diagramas de especiación para los tres metales estudiados	154
<i>A2.2. Cálculos de las constantes condicionales de formación de la química en disolución en la reversibilidad de los sistemas</i>	<i>157</i>
A4. CAPÍTULO 4.	163
<i>A3.1. Determinación simultánea de los iones metálicos.....</i>	<i>163</i>
A3.1.1. Interfaz empleada en la ejecución del análisis MCR para el sistema con ditizona	163
A3.1.1. Interfaz empleada en la ejecución del análisis MCR para el sistema con PAN	165
A5. ARTÍCULO PUBLICADO	166

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1.1 Representación esquemática de un sistema de dos fases, separados por una membrana.	27
Figura 1.2. Estructura química del triacetato de celulosa, TAC.	29
Figura 1.3. Estructura química de algunos plastificantes comúnmente empleados en la preparación de las MPIs.	30
Figura 1.4. Estructura química del indicador metalocrómico PAN.	31
Figura 1.5. Estructura de los complejos $M(\text{PAN})_2$	32
Figura 1.6. Estructura de la 1,5-difeniltiocarbazona, Dz.	32
Figura 1.7. Estructura de los complejos $M(\text{Dz})_2$	34
Figura 2.1. Superficie de respuesta teórica que muestra la relación entre el rendimiento de un proceso químico y las variables tiempo de reacción (ξ_1) y temperatura (ξ_2).	42
Figura 2.2. Espectros visibles para los sistemas PAN A-C y Dz D-F con Hg(II), Pb(II) y Cd(II), respectivamente, después de la complejación.	52
Figura 2.3. Análisis de componentes principales del sistema Dz-Hg (II)	53
Figura 2.4. Gráfico de cargas de la reducción del análisis de componentes principales (PCA) para el sistema Dz-Hg (II) utilizando el método de análisis del proceso M1.	53
Figura 2.5. Gráfico de Pareto de la respuesta deseabilidad después del análisis DoE para el sistema Dz-Hg (II).	54
Figura 2.6. Gráfico de interacción <i>TIEMPO</i> * <i>TAC</i> para la respuesta deseabilidad.	55
Figura 2.7. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el sistema Dz - Hg(II), para A: Factores Dz y tiempo, cuando $2\text{NPOE} = \text{TAC} = 0,0$, y B: La interacción <i>TIEMPO</i> * <i>TAC</i> cuando $2\text{NPOE} = \text{Dz} = 0,0$	56
Figura 2.8. Espectros visibles de las membranas antes (A) y después de la complejación (B) para el sistema PAN - Pb(II)	57
Figura 2.9. Gráfico de Pareto de deseabilidad después del análisis DoE para el sistema PAN - Pb(II).	58
Figura 2.10. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el sistema PAN - Pb(II), para los factores PAN y tiempo, cuando $2\text{NPOE} = \text{TAC} = 0,0$.	59

Figura 2.11. Espectros visibles y apariencia de las membranas antes (A), después (B) de la complejación y la sustracción de los espectros (C) del sistema PAN - Cd(II).	60
Figura 2.12. Análisis de componentes principales del sistema PAN - Cd (II).	60
Figura 2.13. Gráfico de cargas para el método de procesamiento M3 en el caso del óptodo PIM PAN-Cd (II).	61
Figura 2.14. Gráfico de Pareto para la función deseabilidad después del análisis DoE para el sistema PAN - Cd(II).	61
Figura 2.15. Gráfico de interacción <i>TIEMPO*PAN</i> para la respuesta deseabilidad	62
Figura 2.16. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el sistema PAN - Cd(II), cuando TEHP = TAC = 0,0	63
Figura 3.1. Valores de absorbancia para las membranas óptimas usando PAN como cromóforo A: antes de la complejación, B: después de la complejación.	73
Figura 3.2. Valores de absorbancia (n = 4) para 5 membranas óptimas usando Ditizona como cromóforo, A: 441 nm y B: 616 nm, antes de la complejación.	74
Figura 3.3. Valores de absorbancia (n = 5) para las 5 membranas óptimas usando Ditizona como cromóforo, después de la complejación (502 nm).	74
Figura 3.4 Valores de absorbancia para las membranas óptimas complejadas (n = 3) para el sistema A: PAN-Pb y B: Dz-Pb.	75
Figura 3.5 Valores de absorbancia para las membranas óptimas complejadas (n = 3) para el sistema A. PAN-Hg, y B Dz-Hg	76
Figura 3.6 Valores de absorbancia para las membranas óptimas complejadas (n = 3) para el sistema A: PAN-Cd y B: Dz-Cd.	77
Figura 3.7. Gráfico de la reversibilidad de la señal analítica (%Absorbancia relativa) para el sistema A: PAN-Pb y B: Dz-Pb, empleado EDTA y HCl (0.01 mol/L)	79
Figura 3.8. Diagrama de fracción de especie para el sistema $Pb^{2+}/EDTA$ en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Pb, construido a partir de $k'_f = 1.32 \times 10^9$ del complejo $PbEDTA^{2-}$, $[EDTA] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[Pb^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Fuerza iónica = 0.0.	80
Figura 3.9. Diagrama de fracción de especie para el sistema Pb^{2+}/HCl en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Pb, construido a partir	81

de $k'_f = 1.15 \times 10^{-11}$ del complejo $PbCl_2$, $[HCl] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[Pb^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Fuerza iónica = 0.0.

Figura 3.10. Gráfico de la reversibilidad de la señal analítica (%Absorbancia relativa) para el sistema PAN-Hg, empleado EDTA y HCl (0.01 mol/L) 82

Figura 3.11. Diagrama de fracción de especie para el sistema Hg^{2+}/HCl en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Hg, construido a partir de $k'_f = 8.4 \times 10^{-28}$ del complejo $HgCl_2$, $[HCl] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[Hg^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Fuerza iónica = 0.0. 83

Figura 3.12. Gráfico de la reversibilidad de la señal analítica (%Absorbancia relativa) para los sistemas PAN-Cd y Dz-Cd, empleado EDTA y HCl (0.01 mol/L) 84

Figura 3.13. Diagrama de fracción de especie para el sistema $Cd^{2+}/EDTA$ en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Cd, construido a partir de $k'_f = 1.99 \times 10^{11}$ del complejo $CdEDTA^{2-}$, $[EDTA] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[Cd^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Fuerza iónica = 0.0. 84

Figura 3.14 Diagrama de fracción de especie para el sistema Cd^{2+}/HCl en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Cd, construido a partir de $k'_f = 1.33 \times 10^{-10}$ del complejo $PbCl_2$, $[HCl] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[Cd^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$. Fuerza iónica = 0.0. 85

Figura 3.15. Análisis de componentes principales para la optimización del pH y la concentración los sistemas A: PAN-Pb²⁺, B: PAN-Hg²⁺, C: PAN-Cd²⁺, D: Dz- Pb²⁺, E: Dz- Hg²⁺, F: Cd²⁺. 87

Figura 3.16. Diagramas de Pareto para la respuesta *función deseabilidad* de los sistemas A: PAN-Pb, B: PAN-Hg, C: PAN-Cd, D:Dz-Pb, E:Dz:Hg, F:Dz-Cd. 90

Figura 3.17. Gráficos de superficie respuesta función *deseabilidad* (A-C) y efectos principales (D-F) para los sistemas A y D: PAN-Pb, B y E: PAN-Hg, C y F: PAN-Cd. 91

Figura 3.18. Gráficos de superficie respuesta función *deseabilidad* (A-C) y efectos principales (D-F) para los sistemas A y D: Dz-Pb, B y E: Dz-Hg, C y F: Dz-Cd. 92

Figura 3.19. Espectros visibles para el sistema PAN-Pb, para los experimentos A: 5 y B: 7 93

Figura 3.20. Espectros visibles para el sistema Dz-Cd, para los experimentos A: 5 y B: 7	94
Figura 4.1. Respuesta de los sensores frente a diferentes concentraciones de iones metálicos, pH: 6.5. A: Ditizona. B: PAN	103
Figura 4.2. Espectros visibles de los sensores después de la complejación para los sensores preparados con A: Ditizona y B: PAN, empleando 0.68 mg de cromóforo, 62.5 mg de plastificante y 62.5 mg de polímero base, pH: 6.5.	104
Figura 4.3. Espectros puros de los sistemas Ditizona (izquierda) y PAN (derecha), empleados como estimadores iniciales en el análisis MCR. $[M^{2+}]$: 1×10^{-3} mol/L, pH: 6.5.	105
Figura 4.4. Gráfica de la concentración (izquierda) y espectros (derecha) de los componentes resueltos por MCR, para los sistemas Ditizona/Metales	106
Figura 4.5. Comparación de los espectros visibles de los componentes puros y factores calculados mediante la MCR, para los sistemas Ditizona/Metales.	106
Figura 4.6. A: Comparación de las concentraciones empleadas en DoE y las concentraciones calculadas luego de la MCR, para los sistemas Ditizona/Metales. B: Ampliación eje y, de -1.0 a 5.0.	107
Figura 4.7. Gráfica de la concentración (izquierda) y espectros (derecha) de los componentes resueltos por MCR, para los sistemas PAN/Metales.	108
Figura 4.8. Comparación de los espectros visibles de los componentes puros y factores calculados mediante la MCR, para los sistemas PAN/Metales.	109
Figura 4.9. A: Comparación de las concentraciones empleadas en DoE y las concentraciones calculadas luego de la MCR, para los sistemas PAN/Metales. B: Ampliación eje y, de -1.0 a 5.0.	110

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1.1 Límites máximos permisibles en agua de uso público (mg/L)	23
Tabla 1.2. Rangos de la radiación electromagnética más ampliamente usados en sensores óptico-químicos	26
Tabla 1.3. Aplicaciones de algunos tipos de membranas poliméricas de inclusión en la determinación de los iones Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+}	35
Tabla 1.4. Características de algunos sensores ópticos que incorporan Ditizona y PAN para la determinación de los iones Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+}	36
Tabla 2.1. Región experimental para la optimización de la composición y el tiempo de equilibrio	47
Tabla 2.2. Matriz de Doehlert empleada para estudiar la influencia de la composición de la membrana y el tiempo de equilibrio sobre el rendimiento de los sensores. Se indican los valores codificados y reales de las variables	48
Tabla 2.3. Resultados del análisis de varianza para el sistema Dz-Hg(II).	55
Tabla 2.4. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con ditizona, utilizando M1 en la determinación de Hg (II), Pb (II) y Cd (II), a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Se indican los valores codificados y reales de las variables.	56
Tabla 2.5. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con PAN, utilizando M1 en la determinación de Hg (II), Pb (II) y Cd (II), a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Se indican los valores codificados y reales de las variables.	57
Tabla 2.6. Resultados del análisis de varianza para el sistema PAN-Pb(II).	58
Tabla 2.7. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con ambos cromóforos, utilizando M2 en la determinación de Hg (II), Pb (II) y Cd (II). Se indican los valores codificados y reales de las variables.	59
Tabla 2.8. Resultados del análisis de varianza para el sistema PAN-Cd(II).	62
Tabla 2.9. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con PAN utilizando M3 en la determinación de Hg(II), Pb(II) y Cd(II).	63
Tabla 2.10. Resultados de la optimización utilizando la estrategia M3.	64-65

Tabla 3.1. Longitudes de onda a las que aparecen el cromóforo libre y el complejo formado para los 3 sistemas estudiados, empleando PAN como cromóforo.	69
Tabla 3.2. Longitudes de onda a las que aparecen el cromóforo libre y el complejo formado para los 3 sistemas estudiados, empleando Ditizona como cromóforo.	69
Tabla 3.3. Región experimental para la optimización del pH y la concentración de los metales.	72
Tabla 3.4. Matriz del diseño central compuesto usada para estudiar la influencia del pH y la concentración de los metales en el desempeño de las membranas como sensores óptico-químicos.	72
Tabla 3.5. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la reproducibilidad de los sensores usando PAN como cromóforo	73
Tabla 3.6. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la reproducibilidad de los sensores usando Ditizona como cromóforo	74
Tabla 3.7. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias promedio (n = 3) para la evaluación de la estabilidad de los sensores para los sistemas PAN-Pb y Dz-Pb.	76
Tabla 3.8. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la estabilidad de los sensores para el sistema PAN-Hg y Dz-Hg.	77
Tabla 3.9. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la estabilidad de los sensores para el sistema PAN-Cd y Dz-Cd.	78
Tabla 3.10. Constantes de formación de los quelatos metálicos estudiados con EDTA	79
Tabla 3.11. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) del % de absorbancia relativa promedio para la evaluación de la reversibilidad de los sensores para el sistema PAN-Pb, empleando EDTA y HCl (0.01 mol/L)	82
Tabla 3.12. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) del % de absorbancia relativa para la evaluación de la reversibilidad de los sensores para el sistema PAN-Hg, empleando EDTA y HCl (0.01 mol/L)	84

Tabla 3.13. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) del % de absorbancia relativa para la evaluación de la reversibilidad de los sensores para el sistema PAN-Cd, empleando EDTA y HCl (0.01 mol/L)	86
Tabla 3.14. Porcentaje de varianza explicada por los primeros dos componentes principales (PCs), para cada sistema	86
Tabla 3.15. Respuestas (PC1 y PC2) para la optimización del pH y la concentración de los sistemas PAN-Me ²⁺	87
Tabla 3.16. Respuestas (PC1 y PC2) para la optimización del pH y la concentración de los sistemas Dz-Me ²⁺	88
Tabla 3.17. Valores de la función deseabilidad obtenidos a partir de las respuestas PC1 y PC2.	88
Tabla 3.18. Ecuaciones ajustadas para la respuesta deseabilidad en cada sistema	89
Tabla. 3.19 Condiciones de pH y concentración óptimas para todos los sistemas empleando PAN como cromóforo.	94
Tabla. 3.20 Condiciones de pH y concentración óptimas para todos los sistemas empleando Ditizona como cromóforo.	95
Tabla 4.1. Concentraciones de cada ión metálico, empleadas en la determinación del rango lineal de cada sensor.	101
Tabla 4.2. Región experimental escogida en la determinación simultánea de los iones metálicos.	102
Tabla 4.3. Matriz del diseño central compuesto usada para estudiar la determinación simultánea de los iones metálicos.	102
Tabla 5.1. Resumen de las condiciones experimentales en la determinación de los iones metálicos empleando PIMs como sensores óptico-químicos.	112

Índice de esquemas e imágenes

	Pág.
Esquema 1.1. Equilibrio ácido base del PAN. $pK_{a1} = 11.2$, $pK_{a2} = 2.9$	31
Esquema 1.2. Equilibrio tautomérico de la ditizona, Dz.	33
Esquema 1.3. Mecanismo de extracción del analito y posterior complejación en la membrana	37
Esquema 1.4. Mecanismo de reacción propuesto para el uso de un sensor de ditizona en la determinación de iones metálicos M^{n+} .	38
Imagen 2.1. Fotografías de la posición de las membranas en el paso óptico del espectrofotómetro en la adquisición de los espectros.	50
Esquema 2.1. Procedimiento empleado en el análisis de los datos del diseño experimental.	51
Esquema 3.1. Procedimiento empleado en la evaluación de la estabilidad de los sensores.	70
Esquema 3.1. Mecanismo de reacción propuesto para la regeneración de un sensor de ditizona en la determinación de iones metálicos M^{n+} .	78
Esquema 4.1. Descomposición matricial de la matriz de datos original (D).	98
Esquema 4.2. Pasos requeridos en la descomposición de la matriz original de los datos (D).	98

Resumen

Se determinó simultáneamente Hg(II), Cd(II) y Pb(II), en disolución acuosa, mediante el uso de membranas poliméricas de inclusión como sensores óptico-químicos, empleando dos cromóforos diferentes, difeniltiocarbazona (ditizona) y 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN). En primer lugar, se empleó un diseño experimental tipo Doehlert con el fin de optimizar las cantidades de cada componente de la membrana (cromóforos (0.06 mg – 1 mg), triacetato de celulosa (25 mg – 100 mg), plastificantes (25 mg – 100 mg)) y el tiempo de exposición del sensor (20 mi – 80 min), para su identificación de manera individual empleando la técnica espectrofotométrica de ultravioleta visible, como variable respuesta se emplearon los valores de la función de deseabilidad de Derringer. Los valores óptimos de cada variable fueron 35 min – 65 min para la variable tiempo, 0.53 mg – 1 mg de cantidad de cromóforos, 34.4 mg – 71.9 mg de plastificantes y 62.5 mg – 100 mg de triacetato de celulosa. En cuanto a los parámetros de desempeño, los sensores resultaron ser reproducibles, estables durante un periodo de 13 días, excepto el sistema PAN-Hg; y reversibles, excepto el sistema Dz-Hg. El pH óptimo encontrado fue 6.0 para todos los sistemas y la concentración óptima de los iones metálicos fue de $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ para los sistemas empleando ditizona como cromóforo, $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ para el sistema PAN-Pb y $1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ para los sistemas PAN-Cd y PAN-Hg, en su determinación individual. La determinación simultánea de los tres iones se realizó empleando la resolución multivariada de curvas (MCR), una herramienta quimiométrica que obtiene, por medio de la descomposición matemática de la respuesta instrumental de una mezcla, la contribución pura de cada componente involucrado en el sistema de estudio. Este análisis, apoyado en un diseño experimental central compuesto, donde las variables estudiadas fueron las concentraciones de los iones metálicos en un rango de 3×10^{-5} a $3 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, y la variable respuesta empleada en el análisis fue la matriz de los espectros visibles de las membranas, con restricción de no-negatividad, dio como resultados los perfiles de concentración relativa y los espectros de tres componentes que se correlacionan con los tres metales Hg(II), Cd(II) y Pb(II) en la matriz de datos original, con un valor de residual total del orden de 1×10^{-4} y 7×10^{-4} para los sistemas ditizona y PAN, respectivamente.

Abstract

Hg(II), Cd(II) and Pb(II) were selectively determined in aqueous solution using polymeric inclusion membranes as optical-chemical sensors, employing two different chromophores, diphenylthiocarbazone (dithizone) and 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN). First, a Doehlert-type experimental design was used to optimize the amounts of each membrane component (chromophores (0.06 mg – 1 mg), cellulose triacetate (25 mg – 100 mg), plasticizer (25 mg – 100 mg)) and the sensor exposure time (20 min – 80 min), for its individual identification using the visible ultraviolet technique, the values of the Derringer desirability function were used as the response variable. Regarding the performance parameters, the sensors turned out to be reproducible, stable for a period of 13 days, except for the PAN-Hg system; and reversible, except the Dz-Hg system. The optimal pH found was 6.0 for all systems and the optimal concentration of metal ions was $2 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ for the systems using dithizone as chromophore, $2 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ for the PAN-Pb system and $1 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ for the PAN-Cd and PAN-Hg systems, in their individual determination. The simultaneous determination of the three ions was carried out using multivariate curve resolution (MCR), a chemometric tool that obtains, through the mathematical decomposition of an instrumental response of a mixture, the pure contribution of each component involved in the studied system. This analysis, supported by a central composite experimental design, where the variables studied were the concentrations of metal ions in a range of 3×10^{-5} to $3 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$, and the response variable used in the analysis was the matrix of the Visible spectra of the membranes, using the non-negativity restriction, yielded as results the relative concentration profiles and the spectra of three components that correlate with the three metals Hg(II), Cd(II) and Pb(II) in the original data matrix, with a total residual value of the order of 1×10^{-4} and 7×10^{-4} for the dithizone and PAN systems, respectively.

Capítulo 1. Antecedentes, problemática y enfoque teórico del uso de las MPIs como sensores químicos

1



Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos.

— Marie Curie

La creciente preocupación por la contaminación ambiental, especialmente en cuerpos de agua, debida a la presencia de metales pesados, ha hecho que se desarrollen estrategias con el fin de monitorearlos. El uso de membranas poliméricas de inclusión como sensores óptico-químicos se ha convertido en la estrategia de mayor interés y desarrollo en este ámbito¹. Presentar el concepto, funcionamiento y las implicaciones de las membranas poliméricas de inclusión en este tipo de aplicaciones es el principal objetivo del presente capítulo.

Introducción

Desde hace décadas es bien sabido que los metales pesados se encuentran ampliamente distribuidos en la corteza terrestre, sin embargo, las actividades antropogénicas han contribuido al aumento de la concentración de ellos en fuentes naturales provocando un aumento en los riesgos que representa su presencia en los ecosistemas para la salud humana y el medio ambiente ².

Hoy en día los seres humanos están cada vez más preocupados por su entorno, lo cual ha llevado a que se desarrollen nuevas tecnologías con el fin de regular la contaminación ambiental. La mayoría de estas tecnologías están basadas en el desarrollo de metodologías cada vez más limpias y amigables con el medio ambiente, que no requieran el uso de disolventes químicos altamente contaminantes¹. Es por ello que el desarrollo de las membranas poliméricas de inclusión y su adecuación a dispositivos de sensores ópticos químicos ha tenido un auge creciente en los últimos años³. La necesidad de la implementación de métodos analíticos sensibles, altamente selectivos, con bajo costo y amigables con el ambiente continúa siendo uno de los mayores objetivos de la comunidad científica⁴. Una de las tecnologías que precisa cumplir con los requerimientos mencionados anteriormente es el uso de sensores óptico-químicos; éstos son de interés debido a su bajo costo, fácil preparación, rápida respuesta, razonable selectividad, alta sensibilidad y la

posibilidad de realizar mediciones *in situ* de los analitos de interés^{5,6}, sin embargo también presentan algunas desventajas como rangos dinámicos limitados, entre otras que se ampliarán más adelante. Estos sensores consisten generalmente en la integración de un reactivo (ionóforo o cromóforo) por adsorción, atracción electrostática o enlace químico al soporte sólido. Se han utilizado como soportes materiales sol-gel y matrices poliméricas⁷. Estos dispositivos se han usado en la determinación de metales pesados, contaminantes orgánicos, nutrientes, entre otros parámetros de calidad del agua, encontrándose que en muchos casos han superado las limitaciones de las técnicas empleadas comúnmente para realizar este tipo de determinaciones, como lo son altos costos, labores intensas y el requerimiento de personal altamente capacitado^{3,8}. El desarrollo de este tipo de sensores ópticos ha permitido determinar metales como Hg^{2+} , Cu^{2+} , Al^{3+} entre otros, utilizándose métodos de detección como absorción, fluorescencia, luminiscencia etc., empleándose en cada caso diferentes composiciones de membrana¹.

1.1. Metales pesados

Los metales pesados se definen como elementos con *una densidad relativamente mayor a la del agua*⁹, su peligrosidad radica en que poseen características como alta movilidad, capacidad para bioacumularse, alta afinidad por las proteínas y otros constituyentes celulares, entre otras¹⁰. Son concurrenciosos en el medio ambiente debido a fuentes naturales como meteorización y erupciones volcánicas, sin embargo, su concentración en el ambiente puede aumentar a causa de las actividades antropogénicas debido a que son ampliamente usados en la industria.

El cadmio, plomo y mercurio se clasifican entre los metales de mayor importancia y cuidado para la salud pública debido a su alto grado de toxicidad, ya que pueden inducir múltiples daños en los órganos incluso a bajos niveles de concentración¹¹. Estos metales han mostrado una tendencia a formar complejos con nitrógeno, oxígeno y azufre, átomos presentes en diversos ligandos⁹, lo cual puede explicar sus efectos tóxicos dada su afinidad por la estructura molecular de las proteínas. Por ello se hace necesaria su regulación en el ambiente, estableciéndose concentraciones límites permisibles de éstos en agua de uso público, reportadas por entidades tanto nacionales como internacionales (tabla 1.1). Además de eso, se han encontrado reportes en los cuales determinan la presencia de estos iones metálicos en el mismo cuerpo de agua, encontrando concentraciones superiores a las establecidas por las entidades de regulación¹².

Tabla 1.1 Límites máximos permisibles en agua (mg/L)¹³⁻¹⁵

Metal	NOM-001-ECOL-2021 <i>Aguas de descarga</i>	NOM-127-SSA1-2021 <i>Aguas de consumo</i>	EPA <i>Agua potable</i>
Pb	0.01	0.01	0.05
Cd	0.4	0.005	0.005
Hg	0.2	0.001	0.002

1.1.1. Plomo

El plomo, como la mayoría de los metales, se encuentra presente en la corteza terrestre en pequeñas cantidades y las actividades antropogénicas contribuyen a un aumento en su concentración; su uso se encuentra ampliamente vinculado a la producción de baterías, soldaduras y tuberías, municiones y óxidos para pintura, vidrios y pigmentos ¹⁶. A pesar de que se ha disminuido su uso industrial, se ha encontrado que en pinturas deterioradas y polvo contaminado con este metal puede aumentar las concentraciones de plomo en la sangre, principalmente en los niños expuestos a estos materiales, alcanzando niveles de hasta 0.02 mg/L ¹⁷.

Es bien conocido que exposiciones a este metal generan un deterioro en la salud humana, conociéndose que principalmente tiene efectos reproductivos adversos en adultos, daño cerebral, enfermedades gastrointestinales, efectos en el sistema nervioso central, entre otros ¹⁸. Y en niños, altos niveles de plomo en el organismo representan una disminución en el desarrollo neurológico ¹⁹.

El principal mecanismo por medio del cual el plomo produce sus efectos tóxicos se debe a su capacidad de inhibir la acción del calcio y su interacción con las proteínas, uniéndose a los grupos sulfhidrilos y amida de las enzimas. Este metal también compite con cationes metálicos esenciales por los sitios de unión, alterando el transporte de estos dentro del organismo ²⁰.

1.1.2. Cadmio

El cadmio se encuentra de manera natural en el ambiente en concentraciones considerablemente altas debido a su acumulación en rocas sedimentarias y fosfatos marinos ²¹. Y debido a su uso industrial en la producción de pigmentos, baterías y aleaciones, su concentración aumenta en el ambiente generando un riesgo para la salud humana ²². A diferencia del plomo, su uso industrial ha ido en aumento ²³, a pesar de conocerse sus efectos adversos para la salud, que incluyen irritación pulmonar y gastrointestinal, así como lesiones hepáticas o renales dependiendo de la ruta de exposición ²¹. Los efectos adversos del cadmio en la salud humana están bien estudiados y conocidos, sin embargo, sus mecanismos de toxicidad no están del todo entendidos. Se han realizado estudios donde al parecer el

daño a las células sucede por la generación de especies reactivas del oxígeno, lo cual genera un daño al ADN de cadena sencilla y detiene la producción de proteínas ²⁴.

1.1.3. Mercurio

El mercurio se encuentra en la naturaleza en tres formas (elemental, inorgánico y orgánico), teniendo cada forma su propio perfil de toxicidad²⁵. Es un metal pesado que pertenece a la familia de los metales de transición en la tabla periódica, a temperatura ambiente existe como líquido teniendo una alta presión de vapor. También existe como catión con estados de oxidación de +2 o +1. La forma más común en la que se encuentra este metal es como metilmercurio y es resultado de la metilación de su forma inorgánica llevada a cabo por microorganismos presentes en el agua o suelo²⁶. Debido a su concurrencia en el medio ambiente, tanto animales y plantas como seres humanos no están exentos de exponerse a cualquiera de las formas en las que se encuentra; una vez más, esta exposición aumenta debido a su uso en la industria, principalmente en la industria eléctrica, dental y en numerosos procesos como en reactores nucleares, en la producción de agentes antifúngicos para el procesamiento de madera, etc²⁷. Las principales fuentes de exposición crónica al mercurio son las amalgamas dentales y el consumo de pescados; dependiendo de su fuente de exposición y la forma de mercurio absorbida se puede generar daño cerebral, problemas gastrointestinales, neurotoxicidad, entre otros²⁸. Se ha encontrado que su toxicidad es debida principalmente al estrés oxidativo, mostrando gran reactividad con los grupos sulfhidrilos. Entra a la célula donde forma enlaces covalentes con la cisteína produciendo daño oxidativo debido a la acumulación de especies reactivas del oxígeno ²⁹.

1.2. Métodos convencionales en la determinación de metales pesados

Existe una variedad de técnicas analíticas para la determinación de metales pesados en agua, dentro de las cuales se encuentran las espectroscopías atómicas, como la espectrometría de absorción atómica de flama (FAAS)^{30,31}, la espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GFAAS, por las siglas en inglés)³²⁻³⁴, la espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado por inducción (ICP/OES, por las siglas en inglés) ³⁵, así como la fluorimetría de rayos X de reflexión total (TXRF, por las siglas en inglés)^{36,37}, voltamperometría de redisolución anódica (ASV, por las siglas en inglés)³⁸, entre otras . Si bien estos métodos brindan buenos límites de detección y amplios rangos lineales, también poseen ciertas desventajas que limitan sus aplicaciones en análisis de rutina y ambiental, como lo es sus altos costos, por lo que no se pueden usar para el análisis de un gran número de muestras, lo cual es necesario para la detección continua de los efluentes industriales o muestras ambientales. En segundo lugar, la espectrofotometría de absorción atómica como método ampliamente aceptado para la determinación de iones metálicos necesita etapas de preconcentración adicionales como la generación de hidruros para la determinación de Hg²⁺³⁹. En tercer lugar, los desechos industriales y las muestras ambientales tienen matrices complejas que contienen otros iones metálicos interferentes, como Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺ y Ag⁺. La presencia de cantidades

comparables de estos cationes interferentes junto con cantidades excesivas de cationes alcalinos/terrestres en las muestras puede causar graves interferencias espectrales y ionizantes en la determinación de los iones objetivo, por lo que en la mayoría de los casos son vitales los pasos de separación efectivos. Además, estos pasos de muestreo, transporte y pretratamiento de muestra aumentan el tiempo de análisis y son posibles fuentes de error; frente a estas desventajas los sensores ópticos son opciones adecuadas para la determinación simple y de bajo costo de iones de metales pesados^{40,41}.

1.3. Sensores óptico-químicos

1.3.1. Definición y generalidades

Los sensores ópticos están definidos como “*Dispositivos capaces de responder a la presencia de iones, generando información óptica de manera reversible*”⁵. El principio de trabajo de este tipo de dispositivos está basado en el cambio de las propiedades ópticas (absorción, transmisión, emisión, etc.) producidas por el enlace de un indicador con el analito⁴². Desarrollar y mejorar este tipo de dispositivos ha sido uno de los mayores retos en la investigación, impulsado por la necesidad de técnicas de monitoreo y determinación de iones rápida, sencilla y principalmente que pueda ser empleada en mediciones *in situ* dada la creciente preocupación por la calidad del ambiente⁴³. Por definición, un sensor *ideal* es aquel que al ser insertado en una muestra mostrará una respuesta química en poco tiempo, con la selectividad y precisión adecuadas, sin requerir pasos de muestreo, dilución o adicción de reactivos⁴⁴.

Dentro de las ventajas en el uso de estos sensores se encuentran que son de fácil miniaturización lo que permite obtener sensores muy pequeños, ligeros y flexibles, en general son de bajo costo, pueden ser usados en determinaciones remotas, debido a que su señal primaria es óptica no existe el riesgo de interferencias eléctricas, se pueden realizar análisis en tiempo real, entre otras. Sin embargo, también se han reportado diversas desventajas entre las cuales se encuentran su descomposición debido a la luz ambiental, limitaciones en los tiempos de respuesta para analitos con coeficientes de difusión pequeños, poseen rangos dinámicos limitados en comparación con, por ejemplo, el uso de electrodos⁵.

Como se mencionó, con el incremento de la preocupación sobre la calidad del agua, el monitoreo continuo de los cuerpos de agua se ha convertido en un asunto primordial para la química analítica. Es por esto por lo que se han propuesto el uso de sensores para monitoreo de pH, cloruros, sulfatos, contaminantes orgánicos, herbicidas, etc.^{44,45}. Sus aplicaciones en el monitoreo de agua subterránea han sido realizadas para estudios de trazadores geológicos que utilizan marcadores fluorescentes como la rodamina 6G, detectándose contaminantes en cantidades de nanogramos⁴⁶.

De manera general, los sensores ópticos requieren la conversión de datos de la magnitud que se está midiendo a un valor eléctrico que pueda ser manejado mediante técnicas electrónicas. Dicha transducción se lleva a cabo mediante una fuente de luz, requiriendo, por lo tanto, un elemento sensible (óptodo), un fotorreceptor encargado de convertir la luz en corriente eléctrica y una fuente de luz ^{47,48}, por lo tanto, su fabricación y aplicación dependerá del tipo de medida a realizar (absorción, luminiscencia, dispersión) sobre el medio a analizar ⁵.

1.3.2. Principio químico

Los métodos de detección espectroscópicos requieren la interacción de la radiación electromagnética con la materia⁴⁹. Es bien sabido que la espectroscopía óptica se ha empleado como método conveniente para el monitoreo de muestras líquidas, sólidas y gaseosas, empleando incluso películas delgadas⁵⁰ y para el análisis cuantitativo se ha empleado un amplio rango de radiación electromagnética que va desde el infrarrojo (IR) hasta el ultravioleta (UV) (tabla 1.2)⁴⁹.

Tabla 1.2. Rangos de la radiación electromagnética más ampliamente usados en sensores óptico-químicos

Radiación electromagnética	Rango espectral
Ultravioleta (UV)	200 nm – 380 nm
Visible (Vis)	380 nm – 780 nm
Infrarrojo-cercano (NIR)	780 nm – 3 μm
Infrarrojo (IR)	3 μm – 50 μm

Se pueden encontrar diferentes fenómenos durante la interacción de la radiación electromagnética con la materia, por ejemplo, la frecuencia ν (s^{-1} , Hz) de la radiación interferente no cambia, sin embargo, la longitud de onda λ (nm, μm) y velocidad v de la radiación propagada se ven afectadas de acuerdo con la teoría de la refracción de la luz. Dado lo anterior, y teniendo en cuenta que la radiación puede ser considerada como onda o como partícula, se hace necesario tener en cuenta diferentes interacciones de la radiación con la materia como lo es dispersión, absorción, difracción, etc., principalmente al emplear un medio no acuoso. Además, el empleo de una u otra técnica de determinación espectroscópica está determinado por las consideraciones mencionadas anteriormente ⁵. Considerando esto, en los sensores químicos la radiación electromagnética genera una señal analítica en un elemento de transducción, que para el caso particular corresponde a una MPI (membrana polimérica de inclusión), sobre la cual está inmovilizado un cromóforo que, al enlazarse con el analito, cambia las propiedades ópticas de la membrana. Dicho cambio se puede correlacionar con la concentración del analito permitiendo su detección⁵¹.

1.4. Membranas poliméricas de inclusión

1.4.1. Definición y generalidades

En términos generales, una membrana se define como “una barrera selectiva entre dos fases, donde el término selectivo está inherente al tipo de membrana o el proceso que ocurra”. Por lo tanto, sus aplicaciones han sido diversas en los métodos de separación, que se basan en diferentes procesos para la resolución de problemas específicos⁵². Estos procesos se pueden representar esquemáticamente en la figura 1.1.

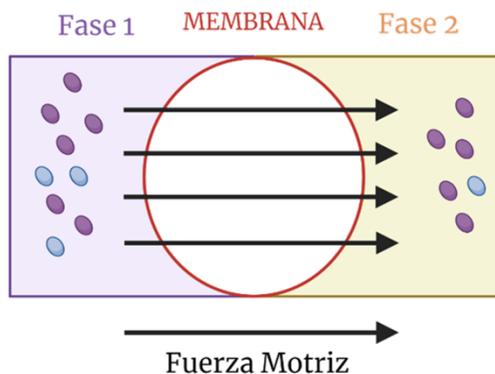


Figura 1.1 Representación esquemática de un sistema de dos fases, separados por una membrana ⁵².

El proceso mediante el cual cualquier especie difunde a través de la membrana se conoce como transporte y se hace posible debido a la capacidad de la membrana de permitir el paso de un componente de una fase a la otra de manera más rápida. Esta difusión puede ocurrir a través de diferentes mecanismos y su eficiencia está determinada por la selectividad de la membrana y el flujo del analito a través de esta. La fuerza motriz del transporte es el gradiente de potencial, que puede ser debido a una diferencia de pH, fuerza iónica, entre otros.

El proceso de transporte empleando una membrana se puede comparar a la extracción líquido – líquido debido a que en este tipo de separación se emplean agentes complejantes disueltos en la fase orgánica, que correspondería a la membrana, generando la formación del complejo metal/extractante que difundirá a través de ésta, y posteriormente se disociará en la interfaz fase orgánica (membrana)/fase líquida (fase de recuperación)⁵³. Debido a lo anterior, es usual encontrar el término *transporte facilitado* para describir el proceso de difusión.

Según exista o no reacciones químicas durante el proceso anteriormente explicado, las membranas se clasifican de manera general como reactivas o no reactivas. Las membranas no reactivas incluyen a las membranas porosas y no porosas, mientras que dentro de las membranas reactivas se encuentran las membranas líquidas. Estas últimas se componen por dos líquidos miscibles, fase aceptora y donadora, que están separadas por una tercera fase que corresponde a la fase de membrana líquida,

presentándose una segunda clasificación que comprende a las membranas líquidas soportadas (MLSs) y las MPIs, entre otras⁵⁴.

Ahora bien, las MPI surgieron de la necesidad de recuperar numerosos iones metálicos y algunos compuestos orgánicos muy pequeños, comenzando con estudios enfocados en el mejoramiento de las membranas líquidas preexistentes. La naturaleza de las MPIs depende de los componentes empleados en su preparación, lo que a su vez depende del analito de interés a determinar; en general están compuestas por un polímero base, un acarreador que puede ser un ácido, una base, agentes quelantes, o compuestos macrocíclicos, (depende de la aplicación) y un plastificante que en conjunto forman una película delgada, estable, flexible y muy versátil⁵⁵. Y es precisamente su versatilidad la que ha hecho que este tipo de membranas tengan diferentes aplicaciones ¹, como lo es su uso en pretratamiento de muestra, muestreadores pasivos y como sensores, dentro de los cuales se encuentra su uso como sensores óptico – químicos que es la aplicación de especial interés en el presente trabajo.

Como se mencionó en la sección 1.3 los sensores se definen como dispositivos capaces de responder a la presencia de iones, generando información óptica. La aplicación de las MPIs en este tipo de sensores consiste en la incorporación de un indicador en la matriz polimérica, dichos indicadores pueden ser cromóforos, fluoróforos o ionóforos. Esta incorporación resulta principalmente en la disminución en los pasos de preparación del sensor, generando ciertas ventajas adicionales sobre los sensores ópticos como lo es reducción en sus costos, fácil preparación, rápida respuesta, razonable selectividad, entre otras⁵.

1.4.2. Polímero base

El polímero es de suma importancia debido a que es el encargado de proveer fuerza mecánica a la membrana. Su función principal es soportar los demás componentes que constituyen a la MPI. En general, los polímeros empleados para este propósito son termoplásticos y consisten en hebras poliméricas lineales no entrecruzadas entre sí, que son separadas al ser disueltas en un disolvente orgánico⁵⁵. Los polímeros más comunes empleados en esta aplicación son el TAC (triacetato de celulosa) y el PVC (cloruro de polivinilo), en general debido a que pueden generar una película delgada a través de un procedimiento relativamente sencillo cuando son disueltos en un disolvente orgánico. El TAC es un polímero polar con un número de grupos hidroxilo y acetilo capaces de formar enlaces de hidrógeno altamente orientados, lo cual le provee un alto grado de cristalinidad que le proporciona una gran estabilidad mecánica^{55,56}.

En la mayoría de las aplicaciones de sensores el indicador y los reactivos se encuentran de forma inmovilizada. Se han estudiado diversos materiales, principalmente poliméricos para este fin. De manera general es conocido que el polímero no solo actúa como soporte para los demás componentes

sino también le provee permeabilidad para ciertas especies. La elección del material polimérico tiene una influencia importante en el comportamiento del sensor, y son usados principalmente en membranas delgadas o películas ⁴⁸.

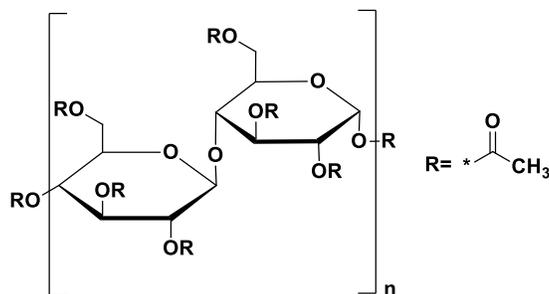


Figura 1.2. Estructura química del triacetato de celulosa, TAC.

1.4.3. Plastificante

Es bien sabido que las cadenas moleculares de las MPIs están unidas por la combinación de varios tipos de fuerzas atractivas, como lo son las fuerzas de tipo Van Der Waals, débiles e inespecíficas, y las interacciones polares, generando una película rígida e inflexible desfavoreciendo el flujo de la especie a transportar a través del material polimérico⁵⁵. Con el fin de superar estos inconvenientes se incorpora un plastificante dentro de la matriz polimérica, lo que provoca un aumento en la distancia entre las moléculas del polímero, reduciendo la intensidad de las fuerzas intermoleculares. Esto sucede debido a que al penetrar entre las moléculas del polímero se neutralizan los grupos polares del mismo mejorando la solubilidad de las especies extraídas⁵⁶. La estructura de los plastificantes está constituida por grupos alquílicos hidrofóbicos con algunos grupos solvatantes, siendo ésta la principal característica estructural de la mayoría de los plastificantes empleados en este tipo de aplicaciones, como se observa en la figura 1.3. En general se considera buen plastificante a aquellos compuestos que tengan gran compatibilidad por el soporte polimérico, baja viscosidad, toxicidad y volatilidad, alta constante dieléctrica y bajo costo. Se ha encontrado que existe una relación de la concentración del plastificante con el desempeño de la membrana, ya que, al tener una baja concentración de este componente se genera una membrana rígida y frágil, sin embargo, un exceso de este provoca su exudación hacia la fase acuosa que dificulta la difusión del analito hacia una fase u otra ⁵⁷.

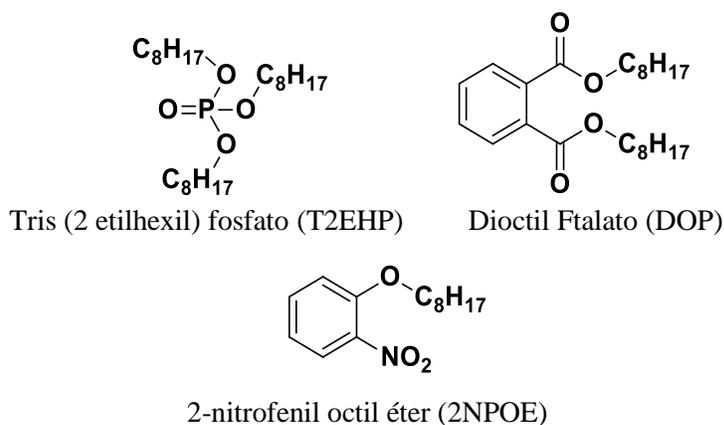


Figura 1.3. Estructura química de algunos plastificantes comúnmente empleados en la preparación de las MPIs.

Si bien, existen diversos plastificantes, el 2-NPOE ha sido empleado en muchas investigaciones dado a su alta constante dieléctrica en comparación con la de otros. Este hecho reduce la resistencia a la transferencia del ión metálico hacia la fase de la membrana puesto que aumenta la polaridad de la fase líquida de la misma ⁵⁸.

1.4.4. Indicadores metalocrómicos

Como se mencionó la aplicación de las MPIs como sensores óptico-químicos es de especial interés en el presente trabajo, dicha aplicación consiste en la incorporación de un cromóforo dentro de la matriz polimérica de la MPI. Tomando ventaja del hecho de que los cromóforos son grupos que absorben radiación, las moléculas que poseen estos grupos en su estructura se denominan cromóforos o indicadores metalocrómicos⁵⁹. Éstos han sido ampliamente empleados en la determinación de iones metálicos debido a que sufren una reacción de complejación con éstos. Dicha reacción va acompañada, generalmente, de un cambio de color evidenciado por un cambio en sus propiedades ópticas como lo es la aparición o desaparición de bandas en el espectro ultravioleta visible, o desplazamientos batocrómico e hipsocrómico. Muchos cationes forman complejos en disolución con este tipo de compuestos debido a que poseen pares de electrones no compartidos sobre átomos de Nitrógeno, Oxígeno o Azufre, presentes en su estructura. Dichos electrones son capaces de satisfacer el número de coordinación del metal. En este caso, el agente complejante es una base de Lewis (donador de pares de electrones) y el metal se comporta como un ácido de Lewis (aceptor de pares de electrones).

En términos de aplicación, los indicadores metalocrómicos actúan como transductores de una señal química generada por especies que no pueden ser determinadas de manera directa empleando métodos ópticos⁴⁴. Es importante mencionar que, si bien existen numerosos indicadores ampliamente estudiados, su uso en sensores óptico-químicos está limitado a únicamente aquellos que poseen ciertas

características, siendo la principal que sean insolubles en agua, así como buena absorptividad molar, y resistentes a la fotólisis, entre otras ⁵.

1.5. PAN y Ditzona como cromóforos

1.5.1. PAN 1-(2-piridilazo)-2-naftol (Peso Molecular 249.27 g/mol)

El 1-(2-piridilazo)-2-naftol, PAN, es un colorante sólido amorfo de color anaranjado-rojo, altamente estable, empleado principalmente como indicador visual en titulaciones complejométricas debido a que forma especies coloreadas con metales pesados para la determinación espectrofotométrica de los mismos^{60,61}.

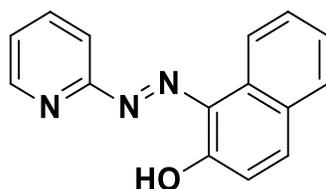
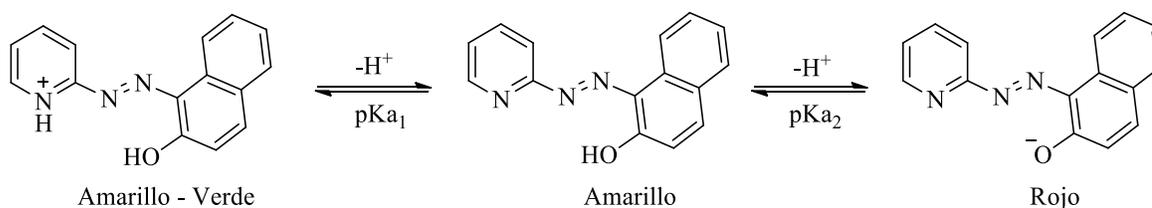


Figura 1.4. Estructura química del indicador metalocrómico PAN.

Es un colorante comercial, poco soluble en agua, pero soluble en varios disolventes orgánicos. Se considera un indicador ácido base, de color amarillo a pH neutro y rojo a pH básico; su forma neutra, que es insoluble en agua, puede aceptar protones en el nitrógeno del anillo de la piridina lo que genera una forma ácida de color verde-amarillo (esquema 1.1). También puede disociarse para formar la especie básica de color rojo ^{62,63}.



Esquema 1.1. Equilibrio ácido base del PAN. $pK_{a1} = 11.2$, $pK_{a2} = 2.9$

Las reacciones de formación de complejos del PAN con iones metálicos son dependientes del pH de la disolución debido a que este es un anfótero orgánico que en medios ácidos puede atraer un protón al nitrógeno del anillo de la piridina mientras que en medio básico el protón del grupo hidroxilo se puede disociar fácilmente, los valores de pK_a son de 2.9 y 11.2

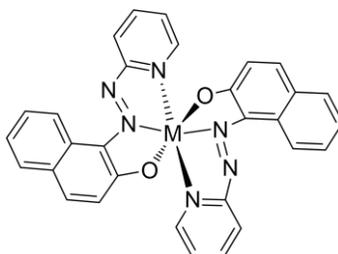


Figura 1.5. Estructura de los complejos $M(\text{PAN})_2$

Estas reacciones de complejación con PAN se comenzaron a estudiar en la determinación de metales como cobre, zinc y cadmio. Encontrándose que puede formar complejos coloridos, generalmente de color rojizo/naranja y que dicha complejación va a depender directamente de la acidez del medio. Se ha reportado la estructura de complejos del PAN, adsorbido en nanopartículas de plata, con cadmio(II), mercurio(II) y plomo(II) con coordinación tridentada (Figura 1.5). Aunque se encuentran numerosos metales con los que el PAN puede reaccionar, los metales alcalinos y alcalinotérreos no forman complejos coloridos con este cromóforo ⁶⁴.

1.5.2. Ditizona 1,5-difeniltiocarbazona (Peso Molecular 256.33 g/mol)

La 1,5-difeniltiocarbazona, ditizona (Dz), es un sólido cristalino, violeta oscuro, su estructura se muestra en la figura 1.6. En estado sólido es casi planar, soluble en disolventes orgánicos e insoluble en agua por debajo de pH 7 ⁶⁵. Se ha empleado en extracciones analíticas para la determinación colorimétrica de diferentes iones metálicos debido a que forma complejos hidrofóbicos, en general de color rojo, con la mayoría de los iones metálicos di y trivalentes ⁶⁶. Es un ácido débil que en disolución se comporta como un ácido diprótico y se disocia en 2 etapas, pK_{a1} : 4.46.

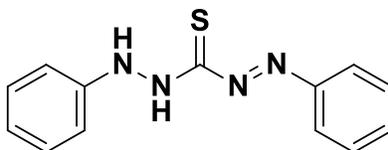
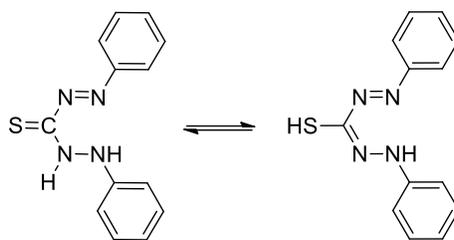


Figura 1.6. Estructura de la 1,5-difeniltiocarbazona, Dz.

El espectro visible de la ditizona exhibe dos bandas bien definidas en 420 nm y 620 nm, dando información sobre la coexistencia de dos tautómeros en disolución (esquema 1.2), ya que, al disolverse fácilmente en disoluciones básicas, se comporta como un tiol en la formación de compuestos insolubles con mercurio y otros metales pesados, siendo esta forma la responsable de la banda a bajas longitudes de onda ⁶⁵.



Esquema 1.2. Equilibrio tautomérico de la ditizona, Dz.

La mayoría de los complejos formados entre la ditizona y los iones metálicos son insolubles en agua, lo cual favorece la extracción líquido-líquido, sin embargo, esta aplicación se ve limitada por factores de solubilidad en cuanto a la selección del disolvente a usar. Además, también se considera una limitante la toxicidad, costos, volatilidad, y velocidad de extracción del disolvente a escoger, entre otros factores. La estructura de los complejos formados ha sido ampliamente estudiada y determinada por cristalografía de rayos-X, encontrándose que el mercurio y el zinc forman complejos tetraédricos, mientras que metales como el cobre y el paladio forman estructuras plano-cuadradas^{65,67}. Se presenta en la figura 1.7 una representación general de estas estructuras considerando que se han reportado complejos 2:1 ditizona ión metálico⁶⁸⁻⁷⁰. Los espectros de la región visible de los complejos metálicos de ditizona muestran una sola banda en la región 450 - 550 nm, típica de los derivados del grupo azobenceno. La alta absorptividad de cada una de las bandas y su relativa independencia de la naturaleza del metal, así como las 2 bandas intensas de la ditizona libre, sugieren que estas transiciones están asociadas al sistema electrónico deslocalizado del ligando. Se ha reportado que los complejos sólidos con los metales mercurio, cadmio y plomo tienen color rojo oscuro, naranja-café y rojo respectivamente. En disolución de tetracloruro de carbono CCl_4 , los colores de estos mismos metales son naranja, rosa y rojo carmín, y el espectro ultravioleta visible de éstos en tetracloruro de carbono exhibe una banda bien definida a 485 nm para el mercurio y a 520 nm para el cadmio y el plomo⁶⁵.

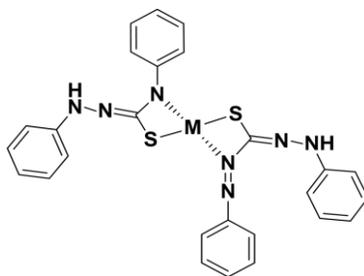


Figura 1.7. Estructura de los complejos $\text{M}(\text{Dz})_2$

1.6. MPI en sensores óptico-químico

Como se mencionó en la sección 1.4.2, es bien sabido que, en aplicaciones para sensores, el indicador está inmovilizado en el soporte polimérico y dicho soporte es usado en forma de membrana delgada o película⁴⁸. De ahí a que se empleen las membranas poliméricas de inclusión en este tipo de

aplicaciones, ya que estas están compuestas por un polímero base y un plastificante que generan una película delgada y según la aplicación se empleará uno o varios componentes extras que pueden ser acarreadores o en el caso particular cromóforos ⁵⁵. Según sea la estructura del polímero, las membranas presentan ciertas clasificaciones, pero de manera general se encuentran las membranas hidrofóbicas e hidrofílicas. Las membranas hidrofílicas, por lo general, emplean como material de soporte hidrogeles, mientras que las membranas hidrofóbicas emplean materiales como el PVC o el TAC ⁵.

Al emplear TAC como soporte polimérico es posible emplear MPIs como sensores óptico-químicos con la incorporación del cromóforo adecuado según el analito objetivo. Se ha reportado el uso de MPI en la determinación de metales empleando TAC como soporte polimérico y como cromóforos, por ejemplo, *4-hidroxisalofen* ⁷¹ y *ácido-2 aminociclopenteno-1-ditiocarbozilico* ⁷² en la determinación de cadmio, derivados de rodamina ⁴⁶ en la determinación de mercurio, o naranja de Xylenol⁷³ para la determinación de plomo, así como otros compuestos orgánicos sintéticos ⁷⁴.

En la tabla 1.3 se muestran algunas de las aplicaciones reportadas donde usan tipos de membranas poliméricas con TAC en la determinación de Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , empleando diferentes cromóforos y plastificantes, según el metal a determinar, indicando algunas condiciones experimentales empleadas como niveles de pH, concentración de iones metálicos, la presencia de concomitantes, y algunas observaciones respecto a los parámetros de desempeño como reproducibilidad y reversibilidad, etc. De manera general, estos sensores mostraron buena reproducibilidad y selectividad frente al ion metálico en estudio, así como buena capacidad para regenerarse. Sin embargo, se encontró que muchos de los cromóforos o ionóforos empleados son sintéticos; en la mayoría de estas síntesis se emplean disolventes orgánicos tóxicos, altos tiempos de reacción y la elaboración de la membrana muchas veces es demasiado extensa ^{74,75}. Es por eso por lo que el empleo MPIs facilita la incorporación de los cromóforos debido a su relativa fácil preparación, y la posibilidad de emplear cromóforos disponibles comercialmente que cumplan las características mencionadas, como lo es que sean insolubles en agua, presenten buena estabilidad y tengan costos accesibles.

Tabla 1.3. Aplicaciones de algunos tipos de membranas poliméricas de inclusión en la determinación de los iones Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+}

Metal	Método	Condiciones	Medio	Concomitantes	Parámetros de desempeño	Ref.
Cd^{2+}		TAC, 2NPOE, Aliquat 336	[Cd(II)] 10 mg/L, pH básicos	cloruros	Membrana selectiva	76
		Ácido - 2 aminociclopenteno - 1-ditiocarboxílico (ACDA)	[Cd(II)]: 10^{-6} - 10^{-4} mol/L, pH: 6,8	Varios cationes y aniones	Síntesis del ACDA, estable hasta 45 días	72
	Membrana adherida	PVC + Ditizona y (otros ligandos)	pH: 4-7, Hg: 10 ng/mL	Na, K, Ca, Zn	Buena selectividad	77
Hg^{2+}	MPI	4- hidroxisalofen, TAC	pH: 6, 10^{-6} - 10^{-2} mol/L	Varios cationes	Reproducibile y selectivo	78
	MLS	Calix [4] areno, Celgard 2500 y 2400	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ y HgCl_2 , 10^{-2} mol/L	Influencia de los aniones Cl^- y NO_3^-	-	79
Pb^{2+}		TAC, dioctil ftalato, 2-(10-carboxydecylsulfanyl)benzoic acid methyl monoester	pH: 5 - 7, Feed: 0.001 mol/dm ³ , Strip: HNO_3 1 mol/dm ³	Na, K y Ca	Sintetizaron el ionóforo. Fue selectiva	80
	MPI	5,8-bis((5-cloro-8-hidroxi-7 - quinolinil) metil)-2,11-ditia-5,8-diaza-2,6-piridino, NPOE, PVC, KTpClPB en THF	pH: 5.5, [Pb(II)]: 10^{-4} mol/L	Cu, Zn, Hg	Fácilmente regenerada, selectiva	62

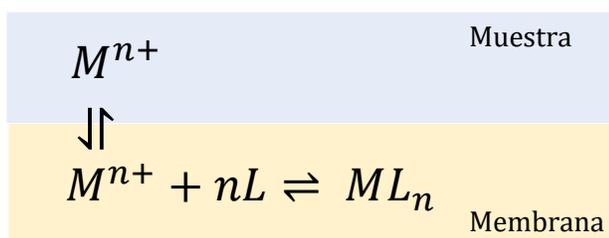
Tabla 1.4. Características de algunos sensores ópticos que incorporan Ditizona y PAN para la determinación de los iones Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+}

Metal	Método	Condiciones	Medio	Concomitantes	Parámetros de desempeño	Ref.
Cd^{2+}	Nanopartículas	Dz@TiO/ ácido poli(terbutil acrílico)	[Cd(II)], pH: 6-7	Varios cationes	Reversible, detección colorimétrica	81
	Membrana PVC	PVC, D2EHPA, PAN	[Cd(II)]: 10^{-9} - 10^{-4} mol/L, pH: 5	Cu^{2+} , Zn^{2+}	Reversible con HNO_3	82
Hg^{2+}	Inmovilización	TAC de películas fotográficas, Ditizona	pH: 2, [Hg]: 7.5×10^{-7} - 9.7×10^{-6} mol/L	Pb^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} y otros	Reversible con I^-	83
	Inmovilización	PVC, PAN, 2NPOE	[Hg(II)]: 10^{-5} - 10^{-3} mol/L, pH: 5.5	Varios cationes	Reversible	84
Pb^{2+}	Membrana de PVC	PAN, NPOE, PVC, DBzDA18C6	pH: 5, [Pb(II)]: 1×10^{-8}	Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} y otros iones	Selectiva	85
	Membrana de agarosa	Agarosa, Ditizona	pH: 5-6, [Pb(II)]: 1.2×10^{-8} - 1.2×10^{-6} mol/L	Varios cationes	Reversible con EDTA	86

1.6.1. Mecanismos de detección en MPI como sensores óptico-químicos

Al emplear una MPI el principio de transporte consiste en que una especie va a difundir a través de ésta, mediante diferentes mecanismos que van a depender de la composición de la membrana. La fuerza motriz del transporte es el gradiente de potencial, que puede ser debido a una diferencia de pH, fuerza iónica, entre otros. Así pues, la extracción o transporte a través de la membrana se puede llevar a cabo cuando se combina un ionóforo con un cromóforo, la extracción de iones empleando acarreadores o la extracción de un ion en conjunto con su contraión ^{52,53}.

Lo anterior se puede representar de manera esquemática (esquema 1.3), considerando el hecho de que la extracción se realiza previo a la complejación en la membrana, y que se tiene un analito M^{n+} ; el primer paso es la distribución del analito entre la muestra y la membrana y el segundo paso consiste en la complejación en la membrana por un ligante L ^{5,87}.

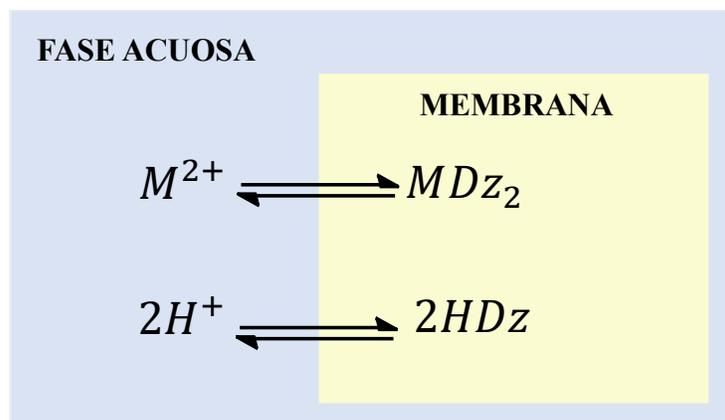


Esquema 1.3. Mecanismo de extracción del analito y posterior complejación en la membrana.

En la medida en que ocurre la extracción y posterior complejación, ocurre un cambio en las propiedades ópticas de la membrana que se han estudiado utilizando diferentes métodos de detección en el uso de las MPIs como sensores óptico-químicos, explicados a continuación ^{5,59}.

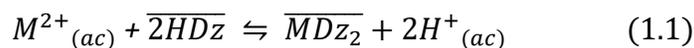
1.6.1.1. Mecanismo de extracción de cationes y desempeño de las MPI

El mecanismo más ampliamente reportado para el transporte de especies cargadas, aniones o cationes, a través de la membrana es el de intercambio iónico. En éste se asegura la electroneutralidad de la membrana, esto es que la extracción un ión deberá ir ligada a la pérdida de una especie de carga equivalente en sentido contrario, es decir, de la membrana hacia la disolución acuosa ⁸⁸. En general, lo que ocurre es que al extraerse un metal M^{n+} se produce la liberación de n protones por el cromóforo y esto es lo que genera un cambio en el color y por lo tanto en las propiedades ópticas de la membrana. Este mecanismo se ejemplifica en el esquema 1.4, tomando como referencia el uso de la ditizona como cromóforo inmovilizado en la membrana para la determinación de un metal M^{n+} ⁸⁹.



Esquema 1.4. Mecanismo de reacción propuesto para el uso de un sensor de ditizona en la determinación de iones metálicos M^{n+} .

El anterior esquema se puede también representar por las ecuaciones 1.1 y 1.2, donde la barra encima de las especies representa la fase orgánica. El uso de la ditizona para la determinación de iones metálicos a través de extracción líquido – líquido está bien establecido y por lo tanto se encuentran reportadas constantes de formación con los iones metálicos de interés⁸⁹.



$$K_e = \frac{[H^+]^n [\overline{MDZ_2}]}{[M^{n+}] [\overline{HDZ}]^2} \quad (1.2)$$

La forma más común en la que este tipo de sensores actúa es a través de la exposición a un volumen fijo de la disolución del ión metálico por un tiempo determinado hasta que se alcanza el equilibrio. Por lo tanto, un cambio en la señal analítica es la evidencia de que se ha alcanzado el equilibrio, que a su vez depende de la relación estequiométrica entre el metal y el cromóforo^{5,59,88}. Por lo tanto, existen algunos parámetros que se deben tener en cuenta al trabajar con este tipo de dispositivos, ya que evidencian qué tan eficiente es el desempeño de la membrana para ser considerada como sensor óptico-químico. La determinación de estos parámetros y su importancia en el uso de las MPIs como sensores óptico-químicos son ilustrados en el capítulo 3.

Hipótesis

El diseño y optimización de un sensor óptico - químico, capaz de proporcionar información óptica frente a la presencia de iones metálicos en disolución, permitirá la cuantificación simultánea de Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} en disolución acuosa, haciendo uso de técnicas quimiométricas

Objetivos

Objetivo general

Determinar Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} en medio acuoso de manera simultánea mediante el uso de una membrana polimérica de inclusión como sensor óptico químico.

Objetivos específicos

- Evaluar diferentes composiciones de sensor óptico químico y diferentes tiempos de agitación, con el fin de encontrar la combinación adecuada de estos factores para la determinación óptima de los iones metálicos de manera individual.
- Determinar los parámetros de desempeño de los sensores óptimos, como reversibilidad, reproducibilidad y estabilidad.
- Evaluar diferentes condiciones de pH y concentración de las disoluciones metálicas que favorezcan la determinación adecuada de los iones metálicos.
- Determinar de manera simultánea la presencia de los iones metálicos en disolución acuosa.

Capítulo 2. Optimización de la composición de las MPIs y el tiempo de agitación. Implicaciones teóricas y desarrollo experimental.

2



La mayoría de las ideas fundamentales de la ciencia son esencialmente sencillas y, por regla general pueden ser expresadas en un lenguaje comprensible

— **Albert Einstein**

En el capítulo 1 se vio la importancia que tienen las membranas poliméricas de inclusión como sensores óptico-químicos y sus antecedentes teóricos. Considerando la complejidad de estas aplicaciones en cuanto a su composición y funcionamiento, el uso de la quimiometría permite un estudio más completo de estos sistemas, puesto que una de sus aplicaciones más importantes es la interpretación de mediciones espectroscópicas, obteniéndose información sobre la cantidad de cierta sustancia en una muestra (cuantificación), la identidad de la muestra (clasificación) o la similitud o cercanía de una muestra a un estándar de calidad (discriminación); incorporando conceptos como metodología de superficie de respuesta, diseño experimental, análisis de componentes principales, entre otros. El objetivo del presente capítulo es introducir los conceptos anteriormente mencionados, así como mostrar la aplicación de ellos en la optimización de la composición y el tiempo de agitación de los sensores seleccionados para la determinación individual de Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} .

Introducción

A medida que avanzan los desarrollos tecnológicos la complejidad en las investigaciones aumenta requiriéndose trabajar con sistemas que involucran múltiples variables, haciéndose necesaria la extracción de la mayor cantidad de información en un tiempo razonable. En este ámbito, la quimiometría se ha convertido en un área ampliamente destacada en el desarrollo de estrategias que ayuden a evaluar e interpretar datos químicos⁹⁰. El desarrollo de técnicas analíticas instrumentales se ha convertido en una fuente de múltiples respuestas que son generadas cada vez con mayor facilidad, como por ejemplo espectros de RMN, IR, UV-vis y RAMAN. La información generada por estas

técnicas puede ser fácilmente organizada y optimizada si se emplea como base de la experimentación un diseño de experimentos (DoE) adecuado, que al ser combinado con el análisis multivariante se obtiene una herramienta capaz de estudiar sistemas químicos complejos ⁹¹.

Como se vio en el capítulo 1, es ampliamente conocido el uso de las MPIs como sensores óptico - químicos; en este capítulo se presentará la optimización de la composición de una membrana polimérica de inclusión como sensor de este tipo y el tiempo de agitación, para la determinación de Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} , por medio de herramientas quimiométricas, considerando que se requiere el desarrollo de nuevos dispositivos que sean fáciles de diseñar, sensibles y altamente selectivos.

2.1. Quimiometría

Por definición la quimiometría es la rama de la química que utiliza las matemáticas, estadística y lógica formal para diseñar o seleccionar procedimientos experimentales óptimos, proporcionar información química de máxima relevancia para el análisis de datos y para obtener conocimiento de sistemas químicos ⁹².

Cuando se realiza cualquier medición, a ésta se encuentra ligada ruido, incertidumbre, variabilidad e interacciones que no son reconocidas de manera directa; así pues, la estadística es empleada para extraer información de estas mediciones. La quimiometría está íntegramente ligada a la estadística, ya que esta también es una herramienta de extracción de información de datos que garantiza que los mismos contengan la máxima información, cuidando de no perder el enfoque químico que requiera el análisis⁹³. A partir de las herramientas que ofrece la quimiometría es posible analizar la información que proporcionan, por ejemplo, los sensores óptico-químicos a través del análisis multivariante, el cual permite determinar de manera simultánea varios analitos o un único analito en presencia de una matriz compleja ⁹⁴.

2.2. Metodología de superficie de respuesta

Las aplicaciones de la química hoy en día están regidas por la complejidad, variedad y la importancia de contar con resultados de calidad, esto hace importante la aplicación de un enfoque estadístico en el diseño experimental. El uso de herramientas como la quimiometría en conjunto con la metodología de superficie de respuesta (MSR) asegura y facilita la organización y optimización de la información generada a través de técnicas analíticas instrumentales, como el UV-vis, que se han convertido en fuentes de múltiples respuestas. Sin embargo, para comprender de mejor manera la integración de estas dos herramientas es necesario entender que la MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para desarrollar, mejorar y optimizar procesos⁹⁵. Su mayor aplicación se encuentra en la industria, en donde, por ejemplo, varias variables de “entrada” influyen en la calidad de un

producto deseado, donde la calidad se mide por medio de una variable que sería la “variable respuesta”.

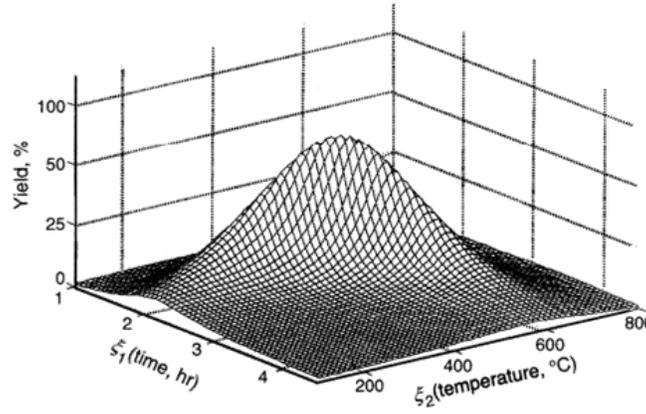


Figura 2.1. Superficie de respuesta teórica que muestra la relación entre el rendimiento de un proceso químico y las variables tiempo de reacción (ξ_1) y temperatura (ξ_2)⁹⁵.

Por ejemplo, en la figura 2.1 se observa un gráfico de superficie de respuesta en el que se muestra como dos variables como el tiempo y la temperatura influyen en la respuesta que en este caso es el rendimiento.

Matemáticamente la definición de MSR se puede expresar según la ecuación 2.1, donde la respuesta y depende de variables controlables (ξ_1 y ξ_2 hasta ξ_k) y e representa otras fuentes de variabilidad que no se incluyen en f .

$$y = f(\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k) + e \quad (2.1)$$

En general se hace conveniente transformar las variables naturales $\xi_1, \xi_2, \dots, \xi_k$ a variables codificadas x_1, x_2, \dots, x_k , con el fin de evitar que diferentes unidades o escalas influyan en la respuesta dándole un peso equivocado a una variable por encima de otra. Esta forma codificada se muestra en la ecuación 2.2. En todo caso, la forma de la función f es desconocida, y debe ser aproximada a una ecuación de primer o segundo orden.

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k) \quad (2.2)$$

Para el caso de dos variables independientes, el modelo de primer orden en términos de las variables codificadas se muestra en las ecuaciones 5 y 6, y se refieren únicamente a los efectos principales (ecuación 2.3) y a las interacciones entre las variables (ecuación 2.4).

$$\eta = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 \quad (2.3)$$

$$\eta = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (2.4)$$

Los modelos de segundo orden son sumamente útiles y son los más empleados en aplicaciones de múltiples variables, como el mostrado en la ecuación 2.5 donde, además de las variables y sus interacciones, también se incluyen los términos cuadráticos. Estas aproximaciones y el cálculo de los coeficientes en estas ecuaciones polinomiales se realizan empleando mínimos cuadrados y utilizando un *diseño experimental* adecuado según el número de variables y el conocimiento que se tenga del sistema a estudiar ⁹⁶.

$$\eta = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{12}x_1x_2 \quad (2.5)$$

En muchas técnicas analíticas la respuesta depende de varios factores experimentales y se deben establecer los niveles de dichos factores que aseguren que la respuesta obtenga el valor deseado; a este proceso se le conoce como *optimización* y la forma más adecuada de realizarla es empleando un *diseño de superficie de respuesta*.

2.3. Diseño experimental DoE

Como se mencionó, la determinación de la forma de la función que describe la influencia de varias variables sobre una respuesta y la optimización de éstas se realiza a través del uso de diseños experimentales. En general, en términos estadísticos a las variables a estudiar se les denomina *factores*, que a su vez pueden ser cualitativos o cuantitativos y pueden adquirir valores, que al ser ordenados numéricamente, se obtienen diferentes *niveles* del mismo factor. Teniendo en cuenta lo anterior, un *diseño experimental* es un conjunto de experimentos definidos por diferentes combinaciones de los niveles de los factores a estudiar⁹⁷, arreglando los experimentos de manera tal que se controla el error experimental⁹⁸. Es bien sabido que existen diversos diseños experimentales que permiten la reducción del número de experimentos, por ejemplo, si se desea determinar factores influyentes se puede emplear un diseño experimental de primer orden, por el contrario si lo que se requiere es optimizar un proceso, los diseños experimentales de segundo orden son los más adecuados⁹⁹.

Son ampliamente encontrados en la literatura diferentes diseños experimentales tales que satisfacen las características del análisis a realizar (número de variables y niveles de éstas); los diseños multivariados permiten el estudio simultáneo de varios factores, una de sus características más importantes es que son rápidos de implementar y más productivos que los enfoques univariados tradicionales ⁹⁶. El diseño de primer orden empleado de forma más común es el diseño factorial de

dos niveles, gracias a su simplicidad y economía es empleado en estudios preliminares, sin embargo, tiene sus limitantes cuando el estudio requiere un gran número de factores a diferentes niveles⁹⁹. Por el contrario, los diseños de segundo orden son modelos más sofisticados que permiten la localización de las condiciones óptimas de un conjunto de experimentos empleando más de dos niveles para cada factor lo que permite el ajuste de un polinomio cuadrático completo. Dentro de este tipo de diseños se encuentra el diseño central compuesto ¹⁰⁰, el diseño de Box-Behnken ¹⁰¹ y el diseño Doehlert ¹⁰².

2.3.1. Diseño Experimental Doehlert

En el diseño Doehlert el número de niveles es diferente para todas las variables, lo cual confiere cierta flexibilidad al momento de escoger los factores con muchos o pocos niveles. Aunque existen diferentes criterios para realizar esta asignación, se recomienda escoger la variable que se considera tendrá el mayor efecto como el factor con el mayor número de niveles. Este tipo de diseños ha sido empleado en diferentes aplicaciones analíticas para determinar condiciones óptimas del transporte de un ión metálico a través de una membrana líquida¹⁰³, remoción de iones empleando microalgas¹⁰⁴ y su primer uso se encontró en la optimización de procesos empleando HPLC¹⁰⁵.

El dominio experimental total (matriz de diseño) está determinado por un número mínimo de experimentos que dependen del número de factores a estudiar, así para k factores, se requieren $k^2 + k + 1$ experimentos. Cada diseño está definido según sus variables reales y los valores codificados de las mismas, la relación entre las variables reales y codificadas está dado por la ecuación 2.6.

$$U_1 = \frac{\Delta U_i \times X_i}{X_{m\acute{a}x}} + U_{i,0} \quad (2.6)$$

Dónde:

$U_{i,0} = \frac{M\acute{a}x+Min}{2}$, corresponde al punto central de la matriz de diseño

$\Delta U_i = \frac{M\acute{a}x-Min}{2}$, corresponde a la distancia entre los valores máximos y mínimos de las variables reales y X_i corresponde a las variables codificadas, siendo X_{max} el valor codificado límite para cada factor¹⁰⁶.

Como se observa en las ecuaciones, es necesario conocer el rango de los valores reales de cada uno de los factores a estudiar, a partir de éstos se calculan los valores intermedios, conociendo las variables codificadas que ya están dadas según el número de factores¹⁰².

2.3.2. Función deseabilidad de Derringer

Existen casos en los que se requiere optimizar varios factores que influyen sobre más de una respuesta. Dado que los valores óptimos de cada respuesta pueden ubicarse en diferentes regiones de la superficie encontrada, se pueden presentar casos en el que el cambio de niveles dentro de los factores puede llegar a tener una influencia positiva para una respuesta específica y un efecto negativo sobre la otra. Con el fin de superar este problema surgieron las metodologías multicriterio que se aplican cuando se deben considerar varias respuestas de manera simultánea y se requiera encontrar una relación óptima entre ellas. Dentro de estas metodologías se encuentra la *función deseabilidad de Derringer*, que se obtiene precisamente a través del ajuste polinomial de las funciones que relacionan la respuesta con los factores considerados^{97,107}.

Esta función surgió debido a la necesidad de comparar múltiples respuestas que muchas veces tienen diferente naturaleza, por ejemplo, evaluar el rendimiento de una reacción y el costo total del proceso. Al existir problemas de compatibilidad de estas características entonces surgió la función deseabilidad para hacer comparables diferentes objetos asignándoles un valor de deseabilidad. Por lo tanto, primero cada respuesta se convierte en una función de *deseabilidad individual* d_i que varía en el rango de 0 a 1, ecuación 2.7.

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 0 & Y_i < \text{bajo} \\ \left(\frac{Y_i - \text{bajo}}{\text{alto} - \text{bajo}} \right)^S & \text{bajo} \leq Y_i \leq \text{alto} \\ 1.0 & Y_i > \text{alto} \end{cases} \quad (2.7)$$

Dónde 1 significa que la función alcanzó su valor ideal y 0 significa que está lejos de esa “idealidad”. Si el objetivo es maximizar la respuesta, entonces se emplea la ecuación 2.7, donde alto y bajo se refiere a los valores límite de la respuesta asociada y el índice S hace referencia a la forma que va a tomar la función deseabilidad, siendo lineal cuando $S = 1$, y este valor depende de si la respuesta quiere ser maximizada, minimizada o llevada a un valor fijo. Una vez se tienen las deseabilidades individuales se combinan en una función deseabilidad general D , a través de la ecuación 2.8, que no es más que la media geométrica de todas las deseabilidades individuales donde I hace referencia al coeficiente de impacto y se modifica dependiendo de la importancia de cada variable^{95,108}.

$$D = (d_1^{I_1} \cdot d_2^{I_2} \cdot \dots \cdot d_k^{I_k})^{1/\sum I_k} \quad (2.8)$$

La construcción de estas funciones requiere un conocimiento matemático bien fundamentado, por lo cual se hace necesario el uso de herramientas como programas estadísticos que facilitan la

construcción del diseño, así como todas las implicaciones necesarias para el ajuste de las ecuaciones y la optimización de las respuestas.

2.4. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica de reducción de datos que tiene como objetivo principal encontrar nuevas variables (componentes principales, PCs) que expliquen la variabilidad en el conjunto de datos original, pero eliminando el ruido. En términos generales con el PCA se busca reducir la matriz de datos original X que contiene m variables y n muestras en componentes que estén correlacionados linealmente según la ecuación 2.9.

$$X = A \cdot F + E \quad (2.9)$$

Dónde A son las cargas (del inglés, loadings) y F las puntuaciones (del inglés, scores). Por lo tanto, la combinación lineal de ambos factores A y F pueden reproducir el conjunto de datos original X , con una mínima pérdida de información representada por la matriz residual, E ^{109,110}.

2.5. Materiales y métodos

2.5.1. Reactivos

Para la preparación de las membranas se empleó triacetato de celulosa (CTA, Aldrich) como polímero base, se emplearon como plastificantes 2-nitrofenil,octiléter (2NPOE, Aldrich, 99%) y tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP, Aldrich, 97%). Como cromóforos se emplearon 1,5-difeniltiocarbazona (Ditizona A.C.S grado reactivo, Aldrich) y 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN grado indicador, Aldrich); los disolventes empleados fueron diclorometano (CH_2Cl_2 , J.T. Baker, 99.99%) y etanol (Analyka, 99.9%).

Las disoluciones metálicas fueron preparadas a una concentración de $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, empleando las siguientes sales metálicas: nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, reactivo A.C.S 99.5%, Fermont), nitrato de cadmio tetrahidratado ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, J. T. Baker 99.1%) y nitrato de mercurio monohidratado ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Reactivo A.C.S 99.5%, Fermont). Como sistema buffer, pH: 6.5, se empleó una disolución de ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico (MES hydrate, >99.5% Sigma-Aldrich) a una concentración de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Todas las disoluciones se prepararon empleando agua desionizada.

2.5.2. Equipos

Las mediciones de pH se realizaron usando un pH-metro SevenCompact S220 con un electrodo combinado de vidrio Cole-Palmer 62014, Mettler Toledo. Para las mediciones de los espectros de

absorbancia (400 nm – 700 nm) se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 2 y la agitación del sistema disolución metálica/membrana se realizó en un agitador mecánico Burrel 75.

El análisis estadístico se realizó empleando el software The Unscrambler para la realización del análisis de componentes principales, el procesamiento de datos para el análisis del diseño experimental fue llevado a cabo empleando el software STATGRAPHICS Centurion XVI. Todos los espectros visibles se graficaron con el software OriginPro 8.

2.5.3. Matriz de diseño

Como se mencionó al principio del capítulo, uno de los objetivos es realizar la optimización de la composición y el tiempo de agitación de los sensores seleccionados para la determinación individual de Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} . Esto se llevó a cabo a través de la evaluación de 4 factores, que son los componentes de la membrana (polímero, plastificante y cromóforo) y el tiempo de agitación, cada uno a diferentes niveles; estos niveles fueron escogidos con base a resultados preliminares en los cuales se prepararon MPIs empleando diferentes composiciones y realizando observaciones respecto a la posibilidad de formación de la membrana y su resistencia; a partir del cálculo de las variables reales para cada nivel codificado empleando la ecuación 8, se obtuvo la región experimental para los factores mencionados (tabla 2.1). Dadas tales características, se escogió una matriz Doehlert considerando las características de este diseño mencionadas en la sección 2.3.1, obteniéndose 21 experimentos como se muestra en la tabla 2.2, donde se indican los valores codificados y los reales entre paréntesis. Así pues, fueron ejecutados seis diseños experimentales para la determinación individual de los tres iones (Hg^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+}) en disolución, empleando como cromóforos ditizona y PAN cada vez.

Tabla 2.1. Región experimental para la optimización de la composición y el tiempo de equilibrio.

Factores	Niveles de las variables					
Tiempo (min)	-1 (20)	-0.5 (35)	0 (50)	0.5 (65)	1 (80)	-1 (20)
Cromóforo (mg)	-0.866 (0.06)	-0.577 (0.21)	-0.289 (0.37)	0 (0.53)	0.289 (0.68)	-0.866 (0.06)
Plastificante (mg)	-0.817 (25)	-0.613 (34.36)	-0.204 (53.13)	0 (62.5)	0.204 (71.86)	-0.817 (25)
CTA (mg)	-0.791 (25)		0 (62.5)		0.791 (100)	

Tabla 2.2. Matriz de Doehlert empleada para estudiar la influencia de la composición de la membrana y el tiempo de equilibrio sobre el rendimiento de los sensores. Se indican los valores codificados y reales de las variables.

Exp. #	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
	Tiempo	Cromóforo	Plastificante	CTA
1	0 (50 min)	0 (0.53 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
2	1 (80 min)	0 (0.53 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
3	0.5 (65 min)	0.866 (1 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
4	0.5 (65 min)	0.289 (0.68 mg)	0.817 (100 mg)	0 (62.5 mg)
5	0.5 (65 min)	0.289 (0.68 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
6	-1 (20 min)	0 (0.53 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
7	-0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
8	-0.5 (35 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.817 (25.0 mg)	0 (62.5 mg)
9	-0.5 (35 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.204 (53.13 mg)	-0.791 (25 mg)
10	0.5 (65 min)	-0.866 (0.06 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
11	0.5 (65 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.817 (25 mg)	0 (62.5 mg)
12	0.5 (65 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.204 (53.13 mg)	-0.791 (25 mg)
13	-0.5 (35 min)	0.866 (1.0 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
14	0 (50 min)	0.577 (0.84 mg)	-0.817 (25 mg)	0 (62.5 mg)
15	0 (50 min)	0.577 (0.84 mg)	-0.204 (53.13 mg)	-0.791 (25 mg)
16	-0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0.817 (100 mg)	0 (62.5 mg)
17	0 (50 min)	-0.577 (0.21 mg)	0.817 (100 mg)	0 (62.5 mg)
18	0 (50 min)	0 (0.53 mg)	0.613 (90.63 mg)	-0.791 (25 mg)
19	-0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
20	0 (50 min)	-0.577 (0.21 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
21	0 (50 min)	0 (0.53 mg)	-0.613 (34.36 mg)	0.791 (100 mg)

2.5.3.1. Selección de las variables a optimizar

Se propuso optimizar la composición de la membrana y el tiempo de agitación, debido a algunas consideraciones, señaladas a continuación:

1. El comportamiento de la PIM está determinado por su composición, el rango de concentraciones en el cual ésta trabaja y el tiempo durante el cual el sensor está expuesto a la disolución que contiene el analito⁴⁸. Dada la versatilidad física y química de este tipo de membranas, existen múltiples aditivos, plastificantes, polímeros, etc., que pueden ser escogidos como componentes de estas. La selección de estos dependerá de factores como la técnica de inmovilización, el tipo de soporte sólido y, por supuesto, del método óptico empleado para el análisis. En este caso, se empleará espectrofotometría, que ha sido ampliamente usada en la determinación de metales empleando MPIs¹¹¹. Esto se realizará

midiendo la intensidad del cambio de color de los sensores¹¹¹⁻¹¹⁵, para lo cual es necesario emplear cromóforos que generen un cambio en las propiedades ópticas de la membrana frente a la presencia de los iones metálicos. Por otro lado, en la selección de la matriz polimérica se consideraron factores como estabilidad mecánica, inercia frente a la presencia del analito y la capacidad para inmovilizar a los demás componentes, siendo el CTA idóneo para realizar esta tarea considerando que ha sido ampliamente usado en este tipo de aplicaciones^{46,116,117}.

2. Teniendo en cuenta que el cromóforo es el encargado de generar el cambio en la señal óptica y el color del sensor, se hizo necesario optimizar sus cantidades, así como la cantidad de los otros componentes de la membrana con el fin de obtener información del comportamiento del sistema en general. Considerando además que no se encontraron suficientes referencias en las que se empleara Ditizona y PAN como cromóforos incorporados en la matriz polimérica de una MPI, fue de interés optimizar dichas cantidades con el fin de abarcar un mayor rango de este factor y evaluar las mejores condiciones en las que éste reaccionaría a la presencia de los iones de manera efectiva (cambio de color y de sus propiedades ópticas).
3. En una eventual aplicación ambiental, factores como la composición de la membrana y el tiempo de exposición del sensor, se consideran fácilmente manejables de manera experimental, por lo tanto, se consideró pertinente optimizarlos como punto de partida para el análisis completo de los sistemas.

2.5.4. Preparación de las membranas

Las membranas fueron preparadas pesando cantidades de polímero base (CTA), plastificante (THEP o 2NPOE) y cromóforo (PAN o Ditizona), de acuerdo con lo indicado por la matriz de diseño (Tabla 2.2). Los componentes se llevaron a agitación durante una hora en un vaso de precipitados de vidrio de 25 mL, en una mezcla diclorometano-etanol 1:9 (v/v), hasta homogeneidad. La disolución se vertió en una caja Petri de vidrio de 5 cm de diámetro, se tapó y se dejó evaporar el disolvente durante 24 h. Una vez transcurridas las 24 h, las membranas se desprendieron agregando un poco de agua desionizada y se secaron cuidadosamente con toallas de papel. Posteriormente se pesaron, se midió su espesor y se adquirió el espectro de absorbancia visible.

2.5.5. Adquisición del espectro visible de los sensores

El espectro visible de los sensores fue medido antes y después de la complejación con los iones metálicos en un rango de longitudes de onda entre 400 nm – 700 nm. Para esto, las membranas se colocaron en la dirección del paso óptico sosteniéndolas cuidadosamente como se muestra en la imagen 2.1, se indica con la flecha roja la dirección del haz de luz incidente.

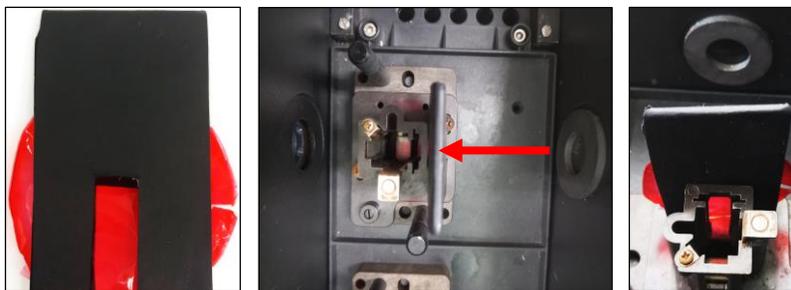


Imagen 2.1. Fotografías de la posición de las membranas en el paso óptico del espectrofotómetro en la adquisición de los espectros.

Las membranas se sujetan entre dos cartulinas que le sirven de soporte para mantenerse en el paso óptico, para posteriormente ser ubicadas afuera del compartimento donde se colocaría la celda con la muestra, cuidando que permanezcan sostenidas en dirección del paso óptico. Todas las mediciones se realizaron a una velocidad de 240 nm/min, midiéndose un ciclo a una resolución de 1 nm; y por cada membrana se obtuvieron 4 espectros en diferentes puntos de esta, empleándose el promedio de estos espectros en el análisis de los resultados.

2.5.6. Determinación de los iones metálicos

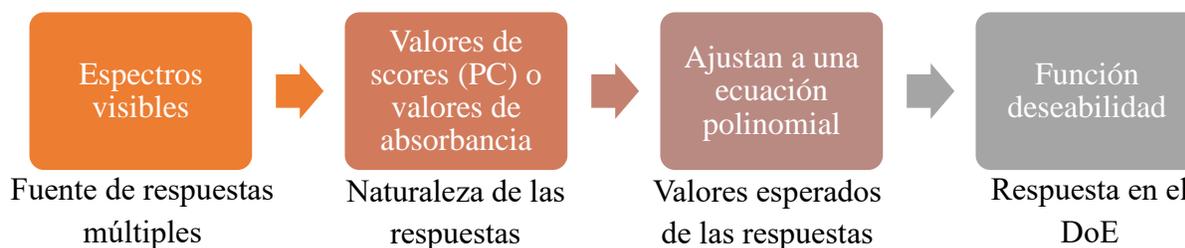
Las membranas ya preparadas fueron puestas en agitación mecánica en presencia de 30 mL de una disolución que contenía el ion metálico a una concentración de $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ y pH 6.5, ajustado con buffer MES $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Cada sensor fue sometido a agitación durante un tiempo diferente, según lo indicado por la matriz de diseño (Tabla 2.2); una vez transcurrido este tiempo, cada sensor fue secado cuidadosamente y se obtuvo su espectro de absorbancia visible para posteriormente realizar el análisis de los datos.

2.5.7. Presentación y estrategia del análisis de los datos

Como se mencionó, se realizaron 6 diseños experimentales, cada uno con 21 experimentos, con el objetivo de optimizar cada sistema metal/cromóforo, donde el principal reto fue encontrar la respuesta adecuada para dicha finalidad. Por lo tanto, la optimización se llevó a cabo empleando tres estrategias diferentes. En la primera (M1) se realizó el análisis de componentes principales sobre los espectros obtenidos después de la complejación y se emplearon los valores de puntuaciones de los primeros dos PCs como respuesta en el diseño experimental. La segunda estrategia (M2) se realizó empleando los valores de absorbancia tanto del cromóforo libre como las del complejo formado como respuesta en el diseño experimental. En la tercera estrategia (M3) se realizó una transformación algebraica que consistió en normalizar los espectros visibles al valor de absorbancia más alto entre todos, con el fin de preservar las relaciones cuantitativas que pudieran existir entre los valores de absorbancia, y posteriormente se sustrajo cada pareja de espectros antes y después de la complejación, sobre dicha

sustracción se realizó un análisis de componentes principales y se emplearon los valores de puntuaciones de los dos primeros PCs como variable respuesta en el diseño experimental.

Los valores de PCs y absorbancias como respuesta en el diseño experimental se ajustaron a una función polinomial, a través de la cual se generan los valores de las respuestas esperadas para calcular el valor de la función deseabilidad de cada respuesta estimada y emplear dicha función deseabilidad como respuesta a optimizar en el diseño experimental. Lo anterior se ejemplifica en el esquema 2.1.



Esquema 2.1. Procedimiento empleado en el análisis de los datos del diseño experimental.

Es necesario recordar que los espectros visibles son una fuente de múltiples respuestas que pueden tener diferente naturaleza (valores de absorbancia o valores de scores); al aplicar MSR, estos valores son ajustados a una ecuación experimental que genera los valores esperados de la respuesta que a su vez pueden ser representados a través de sus valores de función deseabilidad. De esta manera se obtiene un único valor, con información completa de sistemas, adecuado para emplear como variable respuesta en el DoE.

2.6. Resultados y discusión

Como se mencionó, las reacciones de los iones metálicos con los cromóforos usados forman un complejo coloreado; la determinación colorimétrica de estos iones puede ser realizada empleado MPIs en las que el cromóforo está contenido en la matriz polimérica de un soporte no poroso¹¹⁸. El comportamiento de la MPI empleada como óptodo está determinado por su composición, el rango de concentraciones en las que se encuentra cada componente y el tiempo durante el cual el sensor se expone a la disolución que contiene el analito⁴⁸, por lo tanto fueron estos parámetros los factores a optimizar a través del diseño experimental, considerando todos los factores de manera simultánea para determinar su influencia e interacciones en el comportamiento del sensor representado por los valores de función deseabilidad que, como se explicó en la sección anterior, dan cuenta de la información contenida en los espectros visibles de cada sistema. Lo anterior se realizó empleando tres estrategias de análisis de datos obteniéndose un conjunto de factores óptimos para cada sistema, como se detalla a continuación.

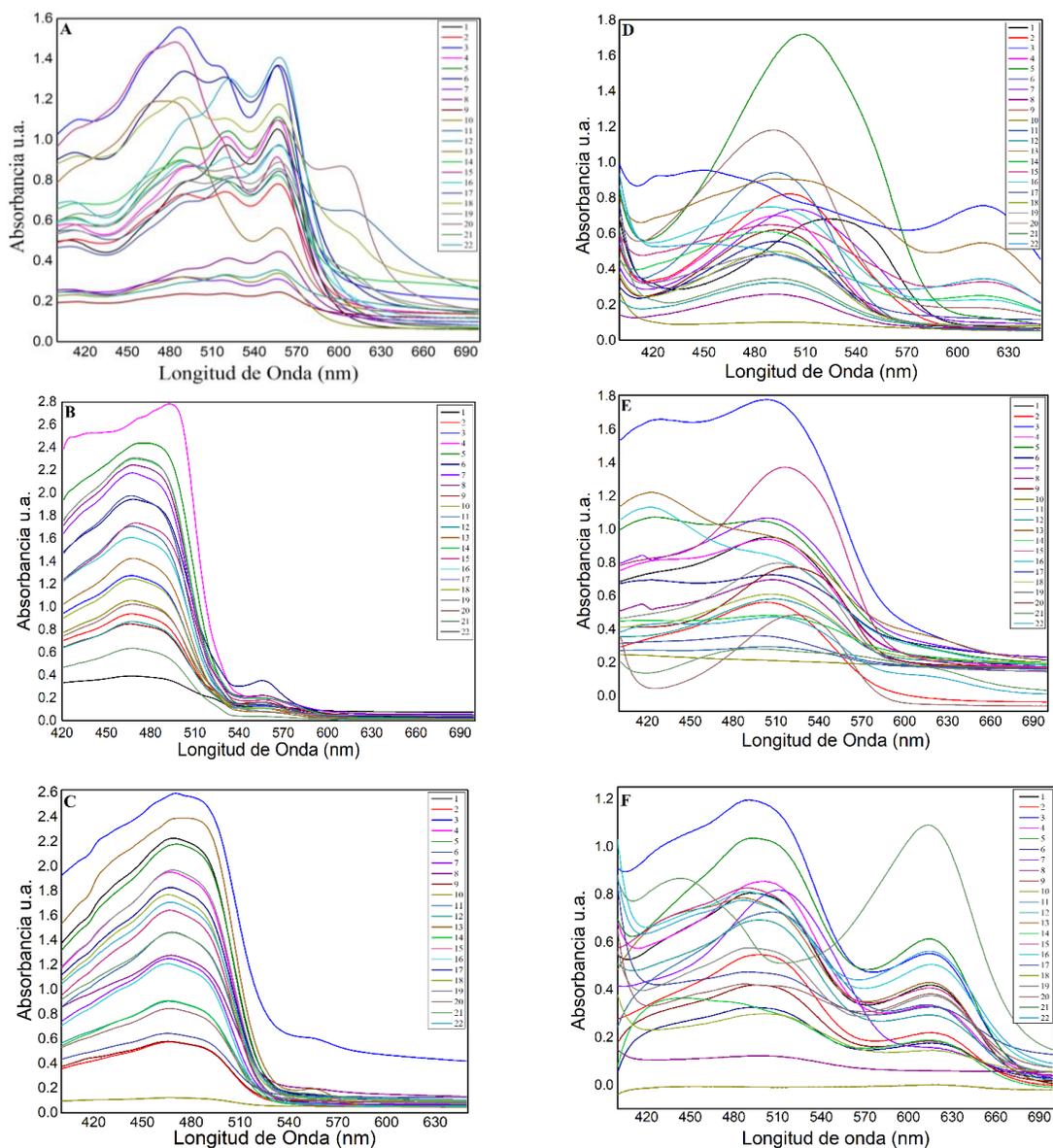


Figura 2.2. Espectros visibles para los sistemas PAN A-C y Dz D-F con Hg(II), Pb(II) y Cd(II), respectivamente, después de la complejación.

En la figura 2.2 se muestran los espectros complejados de los seis sistemas metal/cromóforo. Es notable que existen diferencias entre cada uno de los perfiles según la composición de la membrana, principalmente desplazamientos de la línea base, así como la aparición y desaparición de bandas en aproximadamente 500 a 625 nm para los sensores preparados con ditizona y en alrededor de 560 nm para aquellos preparados con PAN. Estas regiones del espectro están relacionadas con el cromóforo libre y el complejo formado.

2.6.1. M1: Análisis de componentes principales de los espectros complejados

Con el fin de facilitar la explicación del análisis M1, se escogió el sistema Dz-Hg(II) para ejemplificar el procedimiento realizado, así como los resultados obtenidos, sin embargo, los resultados para el resto de los sistemas se presentan en los anexos (A1). La estrategia M1 consistió en realizar una reducción de la dimensionalidad de los datos originales. Una vez realizada esta reducción para los espectros visibles del sistema Dz-Hg(II), se obtuvo el gráfico de varianza explicada para los primeros dos componentes principales que explicaron el 85 % de la variabilidad de los datos originales (Figura 2.3).

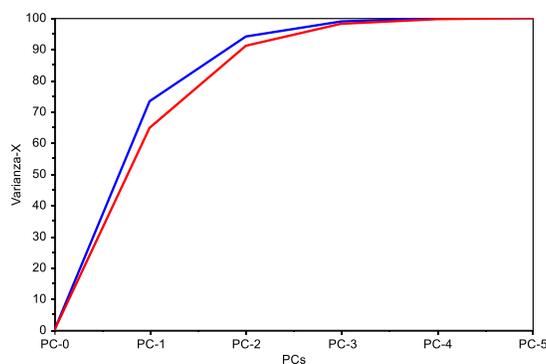


Figura 2.3. Análisis de componentes principales del sistema Dz-Hg (II).

Estos dos PCs se relacionan con las variables originales a partir de la gráfica de cargas como se observa en la figura 2.4, por ejemplo, en la región entre 490 y 510 nm se observa una influencia en el PC1; esta región del espectro corresponde al complejo Dz-Hg formado. Sin embargo, en PC2 se observa una influencia inversa en la misma región del espectro, por lo tanto, las contribuciones de esta región se cancelan. Por el contrario, la región correspondiente al cromóforo libre tiene una contribución positiva en ambos PCs, lo que significa que el análisis está afectado de manera importante por la región espectral de la forma no complejada.

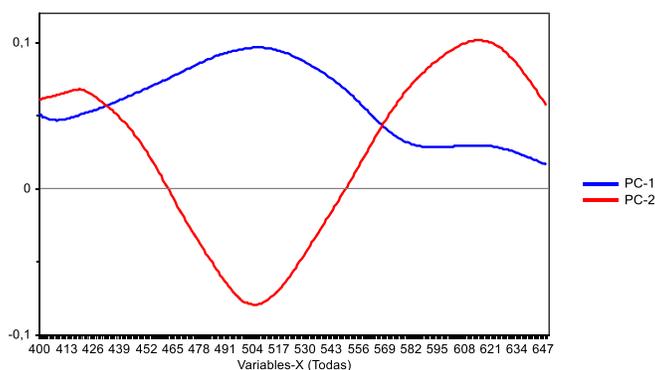


Figura 2.4. Gráfico de cargas de la reducción del análisis de componentes principales (PCA) para el sistema Dz-Hg (II) utilizando el método de análisis del proceso M1.

Una vez estos valores de PCs fueron ajustados a una ecuación polinomial, se obtuvieron sus valores de deseabilidad, que al ser empleados como respuesta en el DoE arrojaron la ecuación ajustada para la respuesta, ecuación 2.10, que en conjunto con el diagrama de Pareto (Figura 2.5) y el análisis de varianza ANOVA (Tabla 2.3), muestran los términos estadísticamente significativos.

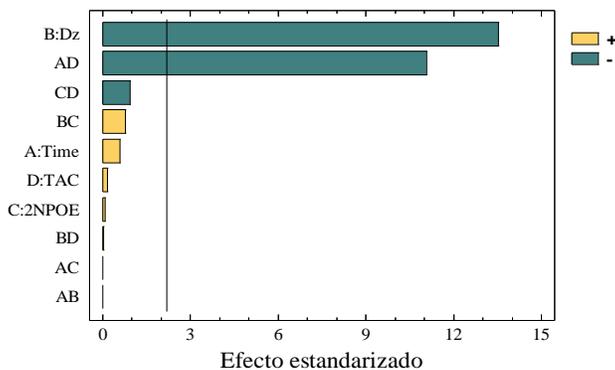


Figura 2.5. Gráfico de Pareto de la respuesta deseabilidad después del análisis DoE para el sistema Dz-Hg (II).

$$D = 0.576507 - 0.09592 * Dz - 0.2357997 * Tiempo * TAC \quad (2.10)$$

En este caso se observa que los factores estadísticamente significativos son la *CANTIDAD DE DITIZONA* y la interacción *TIEMPO*TAC*, ambos con influencia negativa, lo que significa que un aumento en, por ejemplo, la cantidad de ditizona, disminuye la función deseabilidad, y considerando que ésta función representa conjuntamente las respuestas PC1 y PC2 y éstos a su vez están relacionados con el comportamiento de la membrana complejada, significa que cuanto mayor es la cantidad del cromóforo se satura la membrana y debido a la baja concentración del metal, la banda del ligando libre enmascara a la del complejo formado.

Ahora bien, respecto a la interacción *TIEMPO*TAC*, esto significa que el factor tiempo afecta a la respuesta de manera diferente para cada nivel de TAC como se observa en la figura 2.6; lo que puede significar químicamente que membranas gruesas, con altas cantidades de TAC deberían ser expuestas a periodos de tiempo más cortos para obtener un mejor comportamiento de la membrana. Sin embargo, químicamente esto representa una ambigüedad por lo que es probable que este resultado sea producto de la respuesta que se empleó en este análisis, ya que los componentes principales no tienen ningún significado químico, por lo cual los resultados obtenidos con esta metodología no se tuvieron en consideración para análisis posteriores.

Tabla 2.3. Resultados del análisis de varianza para el sistema Dz-Hg(II).

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:Tiempo	0.0000836037	1	0.0000836037	0.33	0.5759
B:Dz	0.0460006	1	0.0460006	182.85	0.0000
C:2NPOE	0.0000018768	1	0.0000018768	0.01	0.9327
D:TAC	0.00000643161	1	0.00000643161	0.03	0.8759
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AC	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AD	0.0309215	1	0.0309215	122.91	0.0000
BC	0.0001458	1	0.0001458	0.58	0.4625
BD	1.26293x10 ⁻⁷	1	1.26293x10 ⁻⁷	0.00	0.9825
CD	0.000213563	1	0.000213563	0.85	0.3766
Error total	0.00276736	11	0.000251578		
Total (corregido)	0.0840181	21			
R²	96.7062%				
R²-Adj	93.7119%				
Error estándar	0.0158612				
Desv. estándar	0.00881342				

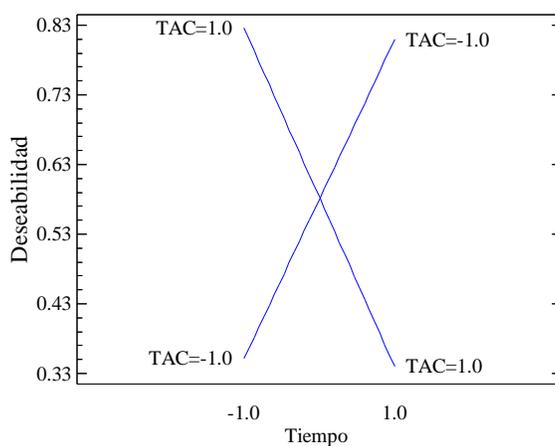


Figura 2.6. Gráfico de interacción *TIEMPO***TAC* para la respuesta deseabilidad.

Una vez reducido el análisis, es decir considerando únicamente los factores significativos, se obtuvo una composición óptima que aumenta la función deseabilidad. Como se observa en la figura 2.7A, donde se muestra el diagrama de superficie de respuesta, un valor máximo de deseabilidad se alcanza cuando se tienen bajos niveles de ditizona. Esto podría relacionarse con el hecho de que a altas concentraciones de cromóforo la señal puede saturarse y al estar M1 fuertemente influenciado por la cantidad de cromóforo libre la respuesta no es sensible al cambio.

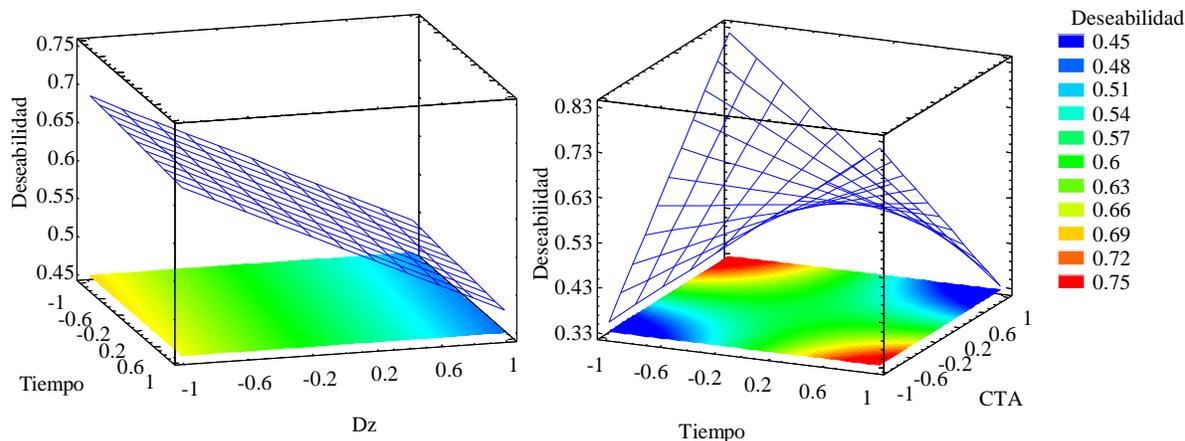


Figura 2.7. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el sistema Dz – Hg(II), para A: Factores Dz y tiempo, cuando $2NPOE = TAC = 0,0$, y B: La interacción *TIEMPO*TAC* cuando $2NPOE = Dz = 0,0$.

La figura 2.7B ilustra de forma más clara cómo la interacción *TIEMPO:CTA* afecta a la función deseabilidad, encontrándose dos máximos en la superficie de respuesta, un máximo cuando se tienen niveles de tiempo bajos y niveles altos de TAC y un segundo máximo a niveles de tiempo altos, pero cuando el TAC alcanza bajos niveles. Esto es consistente con la interacción *TIEMPO*TAC* antes citada.

Como se mencionó al inicio de esta sección, el análisis M1 se realizó para todos los sistemas, resultados que pueden encontrarse completos en anexos (A1.1). Sin embargo, en las tablas 2.4 y 2.5 se presentan los resultados de la optimización para el resto de los sistemas.

Tabla 2.4. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con ditizona, utilizando M1 en la determinación de Hg (II), Pb (II) y Cd (II), a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Se indican los valores codificados y reales de las variables.

Metal	Composición óptima			
	Tiempo	Dz	2NPOE	TAC
Hg²⁺	0.5 (65 min)	- 0.289 (0.37 mg)	- 0.204 (53.13 mg)	- 0.791 (25 mg)
Pb²⁺	0 (50 min)	- 0.577 (0.21 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
Cd²⁺	- 0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)

Tabla 2.5. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con PAN, utilizando M1 en la determinación de Hg (II), Pb (II) y Cd (II). Se indican los valores codificados y reales de las variables.

Metal	Composición óptima			
	Tiempo	PAN	TEHP	TAC
Hg ²⁺	0 (50 min)	- 0.577 (0.21 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
Pb ²⁺	0.5 (65 min)	0.866 (1 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
Cd ²⁺	- 0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)

2.6.2. M2: Uso de las absorbancias del cromóforo libre y del complejo formado

Para la estrategia M2 se emplearon los valores de absorbancia máxima a las cuales aparecen las bandas debidas al cromóforo libre (PAN 465 nm, Dz 550 y 615 nm) y al complejo formado (PAN: Hg(II) 556 nm, Cd 550 nm, y Pb 556 nm; Dz: Hg 490 nm, Cd 490 nm, Pb 502 nm). Una vez más, para efectos de simplificar la explicación se empleará el sistema PAN-Pb(II) para ejemplificar esta estrategia de análisis, nuevamente los resultados para los demás sistemas se presentan en Anexos (A1.2). En la figura 2.8 se presentan los espectros de las membranas antes y después de la complejación donde se señalan las bandas a las que aparece el cromóforo libre (465 nm) y el complejo formado (556 nm).

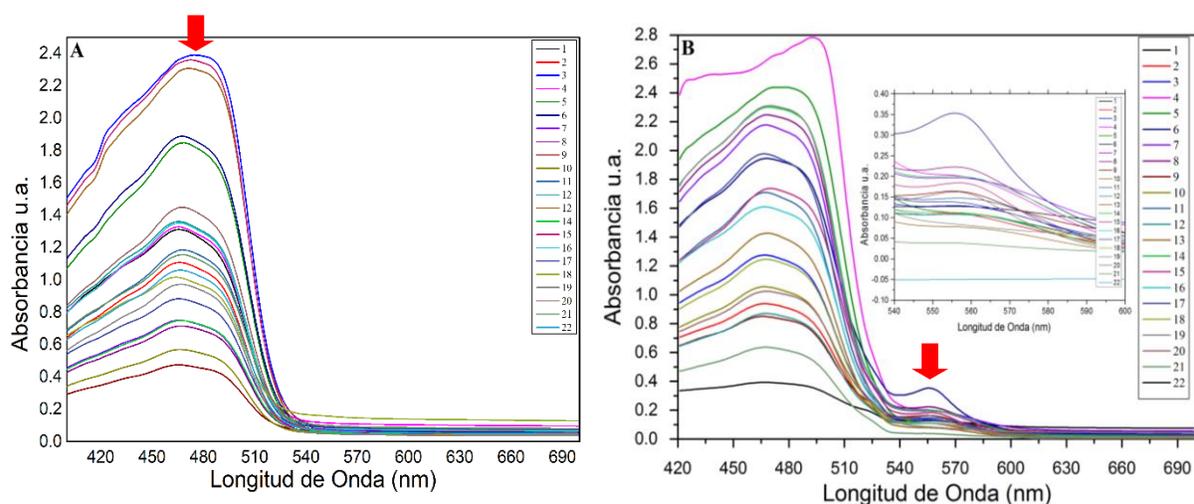
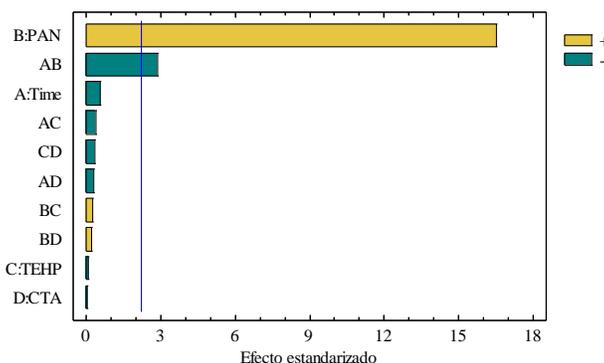


Figura 2.8. Espectros visibles de las membranas antes (A) y después de la complejación (B) para el sistema PAN – Pb(II).

Nuevamente, las dos respuestas fueron combinadas en su función deseabilidad, maximizando la absorbancia de la banda debida al complejo metálico y minimizando la del cromóforo libre, encontrándose la ecuación ajustada del modelo (ecuación 2.11), que en conjunto con el diagrama de

Pareto (Figura 2.9) y el análisis de varianza (tabla 2.6) con un 95% de confianza, los términos estadísticamente significativos fueron la cantidad de PAN y la interacción TIEMPO*PAN.



$$D = 0.535822 + 0.190557 * \text{PAN} - 0.0859353 * \text{Tiempo} * \text{PAN} \quad (2.11)$$

Figura 2.9. Gráfico de Pareto de deshabilitación después del análisis DoE para el sistema PAN – Pb(II).

Del diagrama de Pareto podemos observar que el factor PAN influye de manera positiva sobre la respuesta, esto es, a mayor cantidad de PAN se favorece la formación del complejo; al también ser significativa su interacción con el tiempo, su influencia no puede ser analizada de manera independiente, lo que denota un fuerte efecto cinético en la extracción del metal.

Tabla 2.6. Resultados del análisis de varianza para el sistema PAN-Pb(II).

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:Tiempo	0.000200484	1	0.000200484	0.30	0.5941
B:Dz	0.181549	1	0.181549	272.70	0.0000
C:2NPOE	0.00000417595	1	0.00000417595	0.01	0.9383
D:TAC	0.00000250761	1	0.00000250761	0.00	0.9522
AB	0.00553834	1	0.00553834	8.32	0.0149
AC	0.000100039	1	0.000100039	0.15	0.7057
AD	0.0000556332	1	0.0000556332	0.08	0.7779
BC	0.0000519484	1	0.0000519484	0.08	0.7852
BD	0.0000275653	1	0.0000275653	0.04	0.8425
CD	0.0000784508	1	0.0000784508	0.12	0.7379
Error total	0.00732311	11	0.000665738		
Total (corregido)	0.197303	21			
R²	96.2884%				
R²-Adj	92.9142%				
Error estándar	0.0258019				
Desv. estándar	0.0135246				

Del diagrama de superficie de respuesta (Figura 2.10) se observa que la función deshabilitación alcanza valores óptimos a altos niveles del cromóforo PAN y bajos niveles de tiempo, a partir de lo cual se

obtuvo una composición óptima que se presenta en la tabla 2.7, tanto para el sistema explicado como para el resto de los sistemas. El hecho de que esta vez la alta cantidad de cromóforo se vea favorecida en contraste con lo expuesto en M1, es una consecuencia directa de la forma de optimización, donde se utiliza información específica del espectro que maximiza la señal del complejo y minimiza la del cromóforo libre.

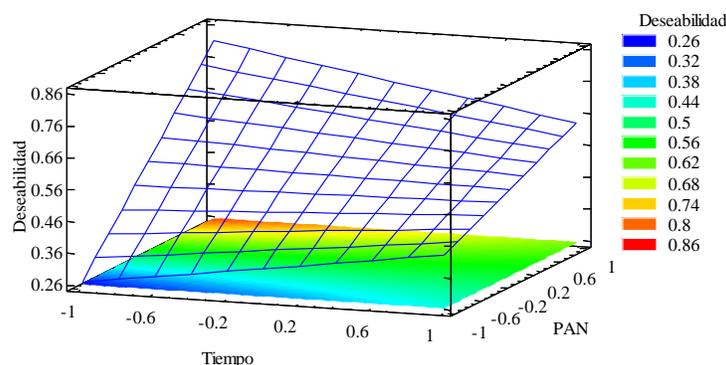


Figura 2.10. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el sistema PAN – Pb(II), para los factores PAN y tiempo, cuando 2NPOE = TAC = 0,0.

Tabla 2.7. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con ambos cromóforos, utilizando M2 en la determinación de Hg (II), Pb (II) y Cd (II). Se indican los valores codificados y reales de las variables.

Metal	Composición óptima			
	Tiempo	PAN	THEP	TAC
Hg ²⁺	-0.5 (35 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.817 (25 mg)	0 (62.5 mg)
Pb ²⁺	-0.5 (35 min)	0.866 (1.0 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
Cd ²⁺	0 (50 min)	0.577 (0.84)	-0.817 (25 mg)	0 (62.5 mg)
	Tiempo	Dz	2NPOE	TAC
Hg ²⁺	-0.5 (35 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.204 (53.13 mg)	-0.791 (25 mg)
Pb ²⁺	-0.5 (35 min)	-0.866 (0.06 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
Cd ²⁺	-0.5 (35 min)	-0.866 (0.06 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)

Si bien según la ampliación de la gráfica 2.8 B se observa que solo en el experimento 6 la señal debida al complejo formado es de mayor magnitud con respecto los demás experimentos, y aunque a simple vista parece ser el único experimento en el que ocurre la complejación, no es el caso ya que como composición óptima se obtuvo el experimento 13 (figura 2.11), donde a pesar de que sí se observa la banda debida al complejo PAN-Pb formado, sigue siendo muy pequeña y la membrana formada, a simple vista, no presenta homogeneidad.

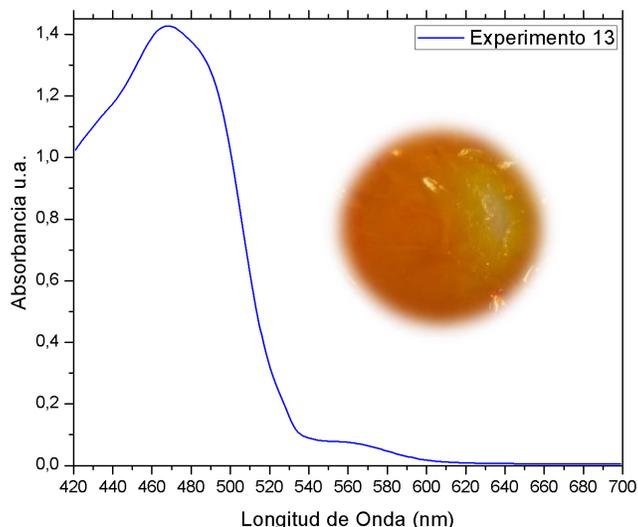


Figura 2.11. Espectro visible correspondiente al experimento 13 para el sistema PAN-Pb, encontrado como óptimo según la metodología M2.

Es posible que este resultado se deba precisamente al hecho que aquí únicamente se está considerando el valor de la absorbancia a la longitud de onda del complejo formado; esta fue otra razón por lo que se descartaron los resultados de esta metodología y se continuó con la metodología M3 donde se consideraron los espectros completos, como se mostrará a continuación.

2.6.3. M3: Análisis de componentes principales sobre la sustracción de los espectros normalizados antes y después de la complejación

Los resultados obtenidos empleando este análisis se ejemplifican a continuación para el sistema PAN-Cd(II). No obstante, los resultados para el resto de los sistemas se presentan en la sección de anexos (A1.3). La figura 2.11 muestra los espectros antes y después de la complejación, observándose nuevamente la aparición de la banda debida al complejo en 550 nm (Figura 2.11B), sin embargo, nuevamente se observan distorsiones y superposición de bandas.

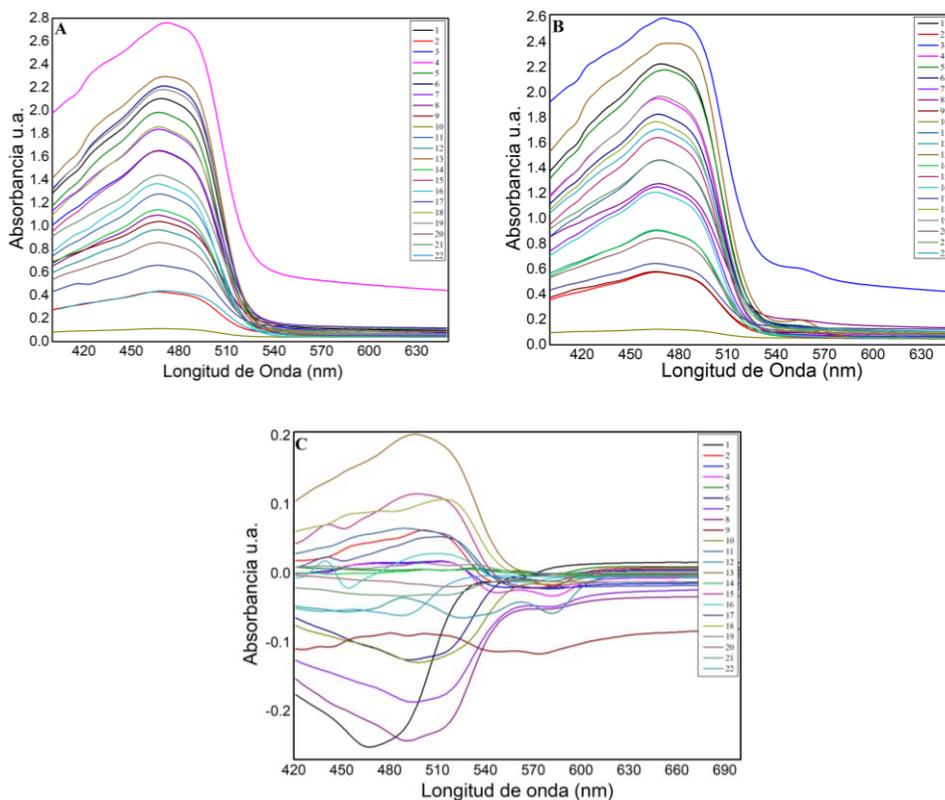


Figura 2.11. Espectros visibles y apariencia de las membranas antes (A), después (B) de la complejación y la sustracción de los espectros (C) del sistema PAN - Cd(II).

Así pues, en la figura 2.11C se presentan los resultados de la resta espectral que señalan claramente que el análisis se enfocará en la parte de los espectros donde los cambios son máximos; precisamente sobre los espectros restados se realizó el análisis de componentes principales, que llevó a valores de puntuaciones en PC1 y PC2 que explican el 97% de la variabilidad en los datos (Figura 2.13).

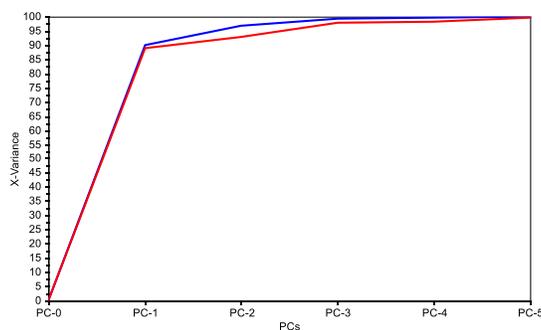


Figura 2.12. Análisis de componentes principales del sistema PAN – Cd (II).

Esta vez, la gráfica de cargas (Figura 2.14) mostró prácticamente el mismo perfil que el de los datos restados con la ventaja de que el significado químico de la técnica de reducción de datos no está oculto por el significado abstracto de los componentes principales.

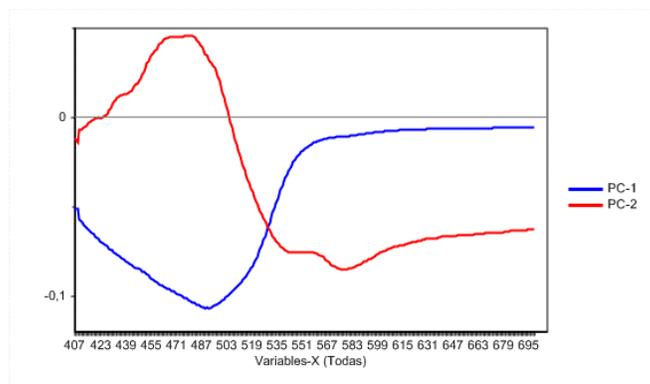


Figura 2.13. Gráfico de cargas para el método de procesamiento M3 en el caso del óptodo PIM PAN-Cd (II).

Las dos respuestas (PC1 y PC2) finalmente se combinaron en su función de deseabilidad, maximizando la deseabilidad individual, lo que permitió identificar los factores significativos (diagrama de Pareto, Figura 2.16).

$$D = 0.45101 + 0.105882 * \text{PAN} - 0.19029 * \text{Tiempo} * \text{PAN} \quad (2.12)$$

Los términos significativos, con un 95% de confianza se escogieron con base a la ecuación ajustada del modelo (ecuación 2.12), obtenida a partir del análisis de varianza (Tabla 2.8) y el diagrama de Pareto (Figura 2.15).

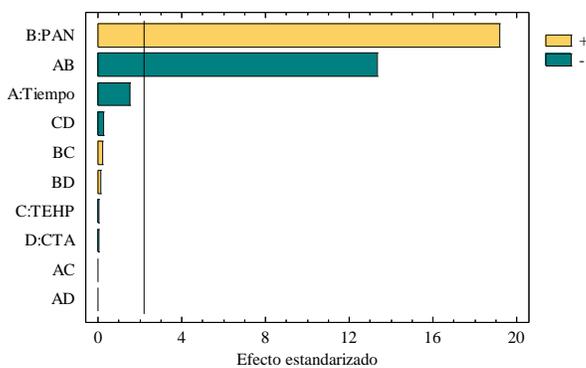


Figura 2.14. Gráfico de Pareto para la función deseabilidad después del análisis DoE para el sistema PAN – Cd(II).

Como el contenido de PAN tuvo una influencia positiva, significa que a medida que aumenta la cantidad de PAN, también aumenta la respuesta, bajo la misma lógica de análisis discutida en el

método M2; sin embargo, este hecho está condicionado por el nivel de la variable tiempo, con un comportamiento negativo, lo que indica que el tiempo y el contenido de cromóforo están inversamente relacionados, como se observa en el gráfico de interacciones, figura 2.16.

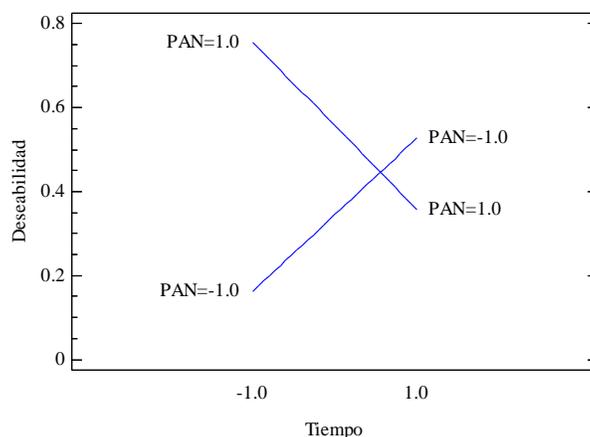


Figura 2.15. Gráfico de interacción *TIEMPO***PAN* para la respuesta deseabilidad

Tabla 2.8. Resultados del análisis de varianza para el sistema PAN-Cd(II).

Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:Tiempo	0.00035041	1	0.00035041	2.30	0.1573
B:Dz	0.0560517	1	0.0560517	368.35	0.0000
C:2NPOE	2.38862x10 ⁻⁷	1	2.38862x10 ⁻⁷	0.00	0.9691
D:TAC	1.43434x10 ⁻⁷	1	1.43434x10 ⁻⁷	0.00	0.9761
AB	0.0271562	1	0.0271562	178.46	0.0000
AC	3.5837x10 ⁻⁸	1	3.5837x10 ⁻⁸	0.00	0.9880
AD	1.99296x10 ⁻⁸	1	1.99296x10 ⁻⁸	0.00	0.9911
BC	0.00000700214	1	0.00000700214	0.05	0.8341
BD	0.00000371548	1	0.00000371548	0.02	0.8787
CD	0.0000103725	1	0.0000103725	0.07	0.7989
Error total	0.00167386	11	0.000152169		
Total (corregido)	0.0913495	21			
R²	98.1676%				
R²-Adj	96.5018%				
Error estándar	0.012357				
Std. Dev	0.00509949				

Así pues, según el gráfico de superficie de respuesta (Figura 2.17), el mayor valor para la función deseabilidad se encuentra a niveles altos de PAN y niveles bajos de tiempo. Lo que llevó a encontrar composiciones óptimas para todos los sistemas, tabla 2.9. En los anexos (A1.3) se encuentran los valores de las funciones de deseabilidad predichas, así como los diagramas de Pareto y los análisis de varianza, ANOVA, de todos los metales con ambos extractantes.

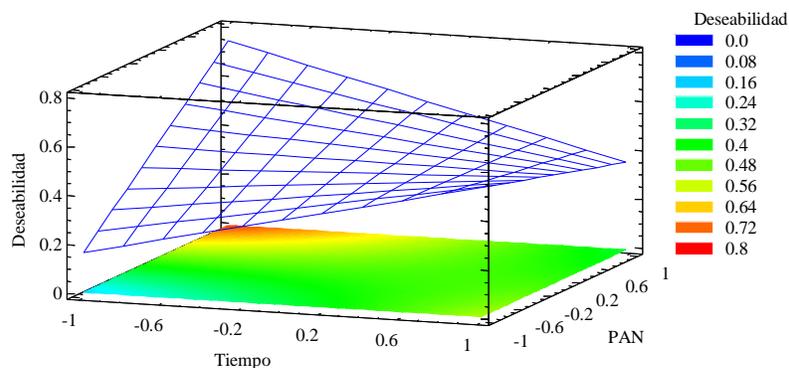


Figura 2.16. Superficie de respuesta y gráfico de contorno para el sistema PAN - Cd(II), cuando TEHP = TAC = 0,0

Tabla 2.9. Resumen de los resultados de optimización de las membranas preparadas con PAN utilizando M3 en la determinación de Hg(II), Pb(II) y Cd(II).

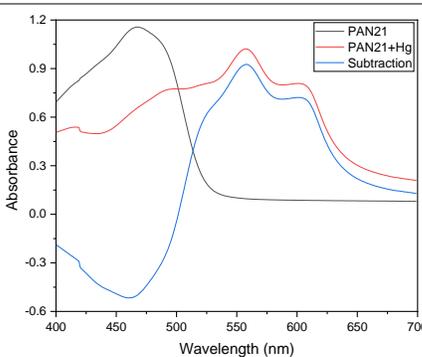
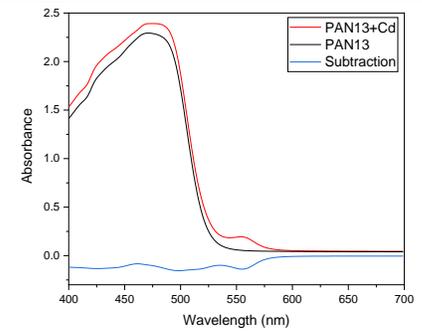
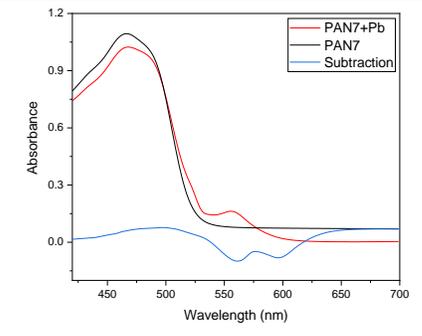
Metal	Composición Óptima			
	Tiempo	PAN	THEP	TAC
Hg ²⁺	50 min	0.53 mg	34.36 mg	100 mg
Cd ²⁺	35 min	1.0 mg	62.5 mg	62.5 mg
Pb ²⁺	35 min	0.68 mg	62.5 mg	62.5 mg
	Tiempo	Dz	2NPOE	TAC
Hg ²⁺	65 min	0.68 mg	71.86 mg	100 mg
Cd ²⁺	35 min	0.68 mg	62.5 mg	62.5 mg
Pb ²⁺	65 min	0.68 mg	71.86 mg	100 mg

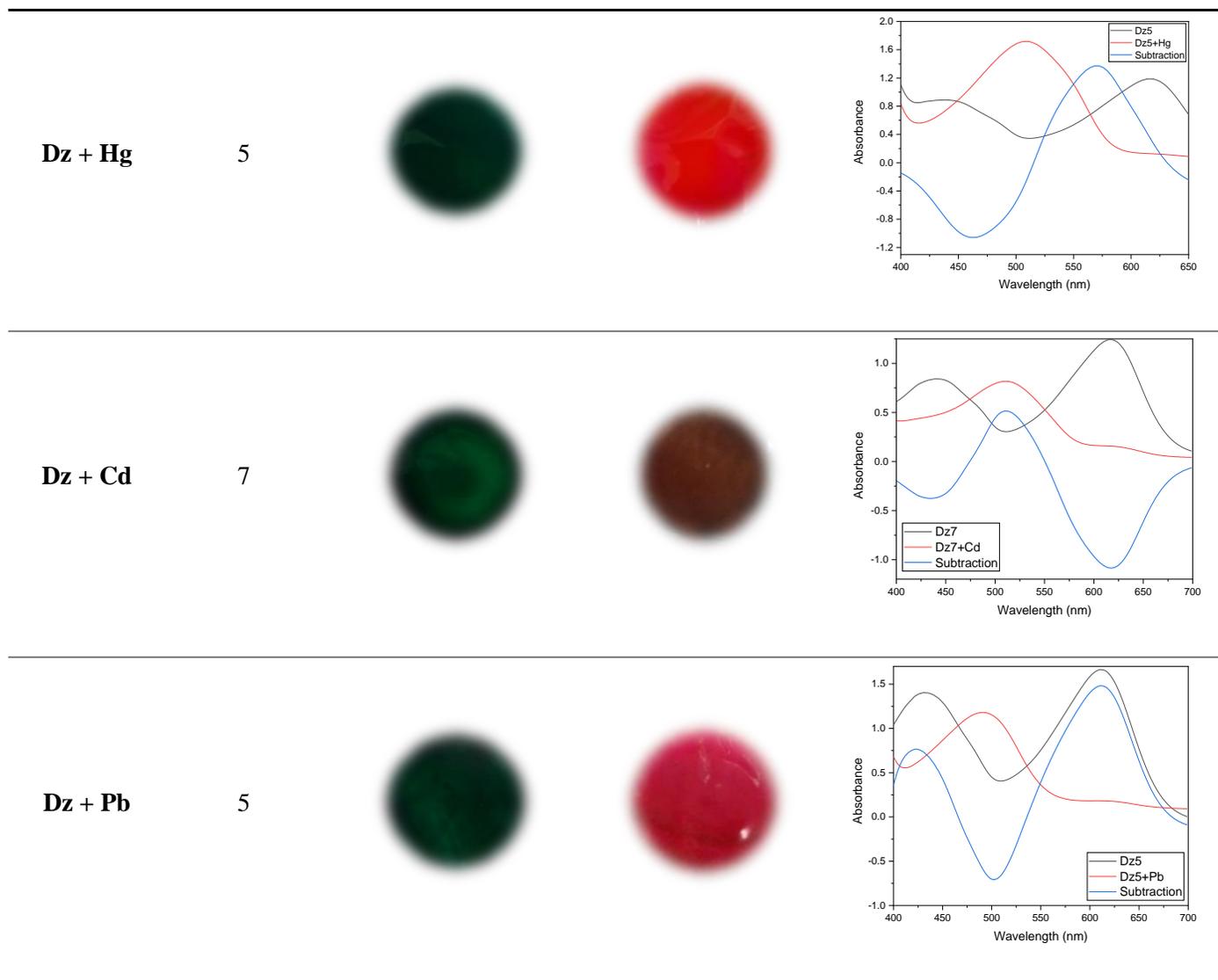
La comparación de tres métodos de procesamiento diferentes, es decir, utilizando los valores de puntuaciones de los dos primeros componentes de la técnica de reducción de datos de PCA de membranas complejadas (M1), empleando las absorbancias del cromóforo libre y el complejo formado (M2), y utilizando los valores de puntuaciones del PCA después de restar los espectros normalizados de las membranas antes y después de la complejación (M3), mostraron que M3 permite la detección de diferencias más discernibles entre los sensores en el diseño DoE.

Como M3 se centra en los cambios relevantes después de que se ha producido la complejación del cromóforo y el metal, el método de espectro completo desarrollado se podría utilizar cuando los métodos basados en bandas presentan problemas relacionados con la superposición, el desplazamiento y la distorsión de las señales. La tabla 2.18 muestra los espectros y el aspecto de las membranas encontradas como óptimas empleando el método de espectro completo, M3, y se observa tanto el cambio de color de los sensores antes y después de la complejación que va en acuerdo con

los colores característicos reportados en disolución, como la aparición de la banda debida al complejo formado, tanto para los sensores preparados con PAN⁶⁴ como aquellos preparados con ditizona⁶⁵.

Tabla 2.10. Resultados de la optimización utilizando la estrategia M3.

Sistema	Experimento óptimo	Apariencia de la membrana		Espectro
		Antes	Después	
PAN + Hg	21			
PAN + Cd	13			
PAN + Pb	7			



Conclusiones

La optimización de los optosensores de Hg(II), Cd(II) y Pb(II) utilizando ditizona y PAN como cromóforos para su aplicación en disolución acuosa se llevó a cabo con éxito mediante la integración de MSR y PCA. La comparación de tres métodos de procesamiento diferentes, es decir, utilizando los valores de puntuaciones de los dos primeros componentes de la técnica de reducción de datos PCA para las membranas complejadas (M1), empleando las absorbancias del cromóforo libre y el complejo formado (M2), y utilizando los valores de puntuaciones de los dos primeros componentes principales en PCA después de restar los espectros normalizados de las membranas antes y después de la complejación (M3), mostraron que M3 permite la detección de diferencias más discernibles entre las PIM en el diseño DoE. Aunque cada método de procesamiento dio resultados característicos, en general, tendieron a dar la misma importancia a variables similares, pero con diferentes pesos, de

acuerdo con los ANOVA y los diagramas de Pareto de los coeficientes de las reducciones de PCA de sus funciones de deseabilidad. Como M3 se centra en los cambios relevantes después de que se ha producido la complejación del cromóforo y el metal, el método de espectro completo desarrollado se puede utilizar cuando los métodos basados en bandas presentan problemas relacionados con la superposición, el desplazamiento y la distorsión de las señales. Debido a su fácil significado químico y los cambios de color adecuados, el método se recomienda como una forma novedosa para llevar a cabo optimización para este tipo de óptodos.

Capítulo 3. Determinación de los parámetros de desempeño de los sensores óptico-químicos

3



La ciencia se compone de errores que, a su vez, son los pasos hacia la verdad.

— Julio Verne

Obtenidas las composiciones óptimas de los sensores, en el presente capítulo se mostrará la determinación de parámetros como reproducibilidad, estabilidad, reversibilidad, pH y concentración de las disoluciones de los iones metálicos, que en conjunto darán cuenta de las características de las membranas como sensores óptico-químicos, y se establecerá si su uso es adecuado en la determinación individual de los iones metálicos Hg(II), Cd(II) y Pb(II).

Introducción

La importancia en la determinación de los parámetros de desempeño es debido a que éstos son la manera de determinar qué tan eficiente es el desempeño de la membrana para ser considerada como sensor óptico-químico, a través de, por ejemplo, evaluar su reproducibilidad, la cual ayuda a determinar la existencia de diferencias en la respuesta de varios sensores de la misma composición. Para ello se preparan sensores bajo las condiciones experimentales establecidas y se realiza un análisis de varianza sobre las absorbancias a la longitud de onda máxima del cromóforo libre y del complejo formado. Respecto a la reversibilidad, en principio, las reacciones de formación de complejos son reversibles, sin embargo, una gran parte de éstas, principalmente con metales pesados, no lo son; en general, la regeneración de la membrana puede ser realizada utilizando ácidos fuertes muy diluidos que proporcionen una fuente de protones tal que la reacción de regeneración se vea favorecida ⁷, también se ha reportado el uso de otros agentes complejantes o enmascarantes como el *ácido etilendiaminotetraacético* EDTA, el *tiocianato de sodio*, la tiourea, glicina entre otros ^{119,120}. Además de la reversibilidad es importante evaluar la estabilidad del sensor, dado que se pueden presentar inconvenientes como la degradación o lixiviación de sus componentes, factores determinantes en el desempeño de la misma ¹²¹ Este parámetro ha sido estudiado por algunos autores con el fin de asegurar la estabilidad de los experimentos ^{122,123}. En la mayoría de estas investigaciones el sensor se mantiene en condiciones de laboratorio o en disolución buffer en periodos de tiempo que van desde

los 30 minutos a 10 horas para evaluar su estabilidad a corto plazo y de 2 días a 2 meses para evaluar su estabilidad a largo plazo, midiendo la respuesta (espectro UV-Vis o fluorescencia) cada cierto periodo de tiempo. La dependencia de la formación de la especie complejada con el pH está ligada a las propiedades ácido-base del cromóforo empleado, por lo tanto, el efecto del pH es otro parámetro ampliamente estudiado en la aplicación de los sensores ¹²⁴. Este factor en conjunto con la concentración del ion metálico a determinar, son considerados factores dependientes, esto es que, en una eventual aplicación analítica de los sensores aquí preparados, estos factores no podrán ser modificados, por lo tanto, se propone su optimización a través de un diseño experimental.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Reactivos

Para la preparación de las membranas se siguió el mismo procedimiento y los mismos reactivos indicados en la sección 2.5 del capítulo 2.

En la evaluación de la reversibilidad de los sensores se emplearon disoluciones de regenerador a una concentración $10^{-2} mol L^{-1}$ de ácido etilendiaminotetraacético EDTA (99.8 %, J. T. Baker) y ácido clorhídrico (HCl, Sigma-Aldrich, 37 %). El ajuste de pH se realizó con los sistemas buffer ácido acético/acetato de sodio a una concentración $10^{-2} mol L^{-1}$ preparado a partir de ácido acético (CH₃COOH Sigma-Aldrich, 99.7 %) y acetato de sodio, (CH₃CO₂Na, Aldrich ≤ 99 %), para valores de pH: 4, se empleó una disolución de ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico (MES hydrate, > 99.5% Sigma-Aldrich) $10^{-2} mol L^{-1}$ para valores de pH: 6.5, y buffer tris(hidroximetil) aminometano, (TRIS Aldrich, ≤ 99.8 %): 7-9. Todas las disoluciones se prepararon empleando agua desionizada.

3.1.2. Evaluación de la reproducibilidad

La reproducibilidad de los sensores se evaluó preparando $n = 5$ sensores, pesando las cantidades de polímero (TAC), plastificante (NPOE o TEHP) y cromóforo (Dz o PAN) según la composición óptima encontrada para cada sistema (tabla 2.17). Estas cantidades se agregaron en un vaso de precipitados de 25 mL, y se disolvieron en una mezcla de diclorometano-etanol 1:9 (v/v). La mezcla se agitó durante 1 hora hasta homogeneidad y luego se vertió en una caja Petri, se tapó y se dejó evaporar alrededor de 24 horas. Una vez transcurrido este tiempo las membranas se desprendieron empleando agua desionizada, se secaron y, posteriormente se midió su espesor y su absorbancia a la longitud de onda máxima para cada sistema (tabla 3.1 y 33.2).

Tabla 3.1. Longitudes de onda a las que aparecen el cromóforo libre y el complejo formado para los 3 sistemas estudiados, empleando PAN como cromóforo.

Sistema	Longitud de Onda (nm)		Espesores (μm)
	Cromóforo libre	Complejo Metálico	
PAN-Hg²⁺	465	556	55.23 ± 8.62
PAN-Pb²⁺	465	556	69.66 ± 17.87
PAN-Cd²⁺	465	550	65.03 ± 10.68

Tabla 3.2. Longitudes de onda a las que aparecen el cromóforo libre y el complejo formado para los 3 sistemas estudiados, empleando Ditizona como cromóforo.

Sistema	Longitud de Onda (nm)		Espesor promedio
	Cromóforo libre	Complejo Metálico	
Dz-Hg²⁺	436 y 616	490	65.11 ± 3.68
Dz-Pb²⁺	436 y 616	502	63.08 ± 5.13
Dz-Cd²⁺	436 y 616	490	46.48 ± 5.77

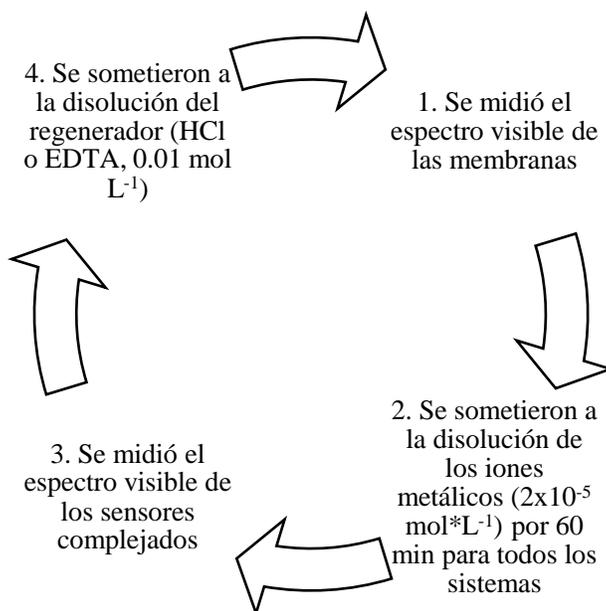
Posteriormente se sometieron a la disolución del ión metálico en disolución MES a pH 6.5 y nuevamente se determinó su absorbancia a la longitud de onda máxima para cada sistema. Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se realizó un análisis de varianza sobre las $n = 5$ réplicas para determinar posibles las diferencias que pudieran existir entre éstas.

3.1.3. Evaluación de la estabilidad

Se prepararon $n = 6$ sensores óptimos, se dividieron en 2 grupos de 3 sensores cada uno. Un grupo de sensores fue almacenado en disolución buffer MES, $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, pH: 6.5, y el otro grupo fue mantenido en condiciones de laboratorio, es decir fueron almacenados en pequeñas bolsas plásticas. En ambos casos se midió la absorbancia a la longitud de onda máxima (tabla 3.1) cada dos horas las primeras 6 horas, con el fin de evaluar su estabilidad a corto plazo y posteriormente cada 24 horas por un periodo de tiempo de 13 días, para evaluar su estabilidad a largo plazo. Una vez transcurrido este tiempo se realizó un análisis de varianza sobre los valores de absorbancia máxima obtenidos para cada condición de almacenamiento.

3.1.4. Evaluación de la reversibilidad

Se prepararon 3 membranas óptimas para cada sistema pesando las cantidades de TAC, plastificante THEP, cuando se empleó PAN como cromóforo o plastificante 2NPOE cuando se empleó Ditizona como cromóforo, según la composición óptima encontrada para cada sistema (tabla 2.17). Posteriormente se siguió el procedimiento mostrado en el esquema 3.1, que se realizó durante 6 ciclos.



Esquema 3.1. Procedimiento empleado en la evaluación de la estabilidad de los sensores.

3.1.5. Optimización del pH y concentración de las disoluciones metálicas

Como se mencionó antes, se considera el pH y la concentración como parámetros que, en una posible aplicación, por ejemplo, determinación *in situ*, no podrán ser modificados. Así pues, con el fin de encontrar su valor óptimo para cada sistema, se escogió emplear un *diseño central compuesto con puntos estrella*.

El número de experimentos para cada diseño se escogió según la ecuación 3.1, Donde k son los factores por evaluar, en este caso dos (pH y concentración del ión metálico), y β es la distancia entre los puntos (puntos centrales), que para cuando las variables son 2, el número recomendado de puntos centrales es 5^{125} .

$$2^k + 2k + \beta \quad (3.1)$$

Para calcular los niveles de las variables reales que se deben emplear, a partir de las codificadas, se emplean las ecuaciones 3.2 – 3.6.

$$-\beta \text{ (Más bajo): } X_{min} \quad (3.2)$$

$$-1 \text{ (Bajo)}: \left[\frac{(X_{max} + X_{min})}{2} \right] - \left(\left[\frac{(X_{max} - X_{min})}{2\alpha} \right] \right) \quad (3.3)$$

$$0 \text{ (Central)}: \left[\frac{(X_{max} + X_{min})}{2} \right] \quad (3.4)$$

$$+1 \text{ (Alto)}: \left[\frac{(X_{max} + X_{min})}{2} \right] + \left(\left[\frac{(X_{max} - X_{min})}{2\alpha} \right] \right) \quad (3.5)$$

$$+\beta \text{ (Más alto)}: X_{min} \quad (3.6)$$

En este caso se tendrán 13 experimentos según la ecuación 3.1, cuando $k = 2$, y la región experimental contempla diferentes niveles según el sistema a estudiar (Tabla 3.3).

En la tabla 3.4 se muestra la matriz de diseño, que no es más que las combinaciones de ambos factores a sus diferentes niveles, para cada sistema. Para el ajuste de pH se empleó buffer ácido acético/acetato de sodio para los valores de pH de 4 y 4.7, buffer MES para los valores de pH 5 y 5.6 y buffer TRIS para los valores de pH de 7 a 9. En este caso, se tienen 13 experimentos para los que se deben preparar 13 membranas a su composición óptima (dependiendo del metal a determinar) y preparar 13 disoluciones a la concentración y pH indicadas por la matriz de diseño.

Tabla 3.3. Región experimental para la optimización del pH y la concentración de los metales.

Factores	Variables	Niveles de las variables				
		Más bajo	Bajo	Central	Alto	Más alto
		$-\beta$	-1	0	+1	$+\beta$
pH	X ₁	4	4.7	6.5	8.3	9
Concentración (mol/L)	X ₂	2×10^{-7}	3×10^{-6}	1×10^{-5}	1.7×10^{-5}	2×10^{-4}

Tabla 3.4. Matriz del diseño central compuesto usada para estudiar la influencia del pH y la concentración de los metales en el desempeño de las membranas como sensores óptico-químicos.

Experimento	pH		Concentración del metal	
	Cod.	Exp.	Cod.	Exp.
1	$-\beta$	4	0.0	1×10^{-5}
2	$+\beta$	9	0.0	1×10^{-5}
3	-1.0	4.7	+1.0	1.7×10^{-5}
4	-1.0	4.7	-1.0	3×10^{-6}
5	0.0	6.5	$-\beta$	2×10^{-7}
6	+1.0	8.3	-1.0	3×10^{-6}
7	0.0	6.5	$+\beta$	2×10^{-4}
8	0.0	6.5	0.0	1×10^{-5}
9	+1.0	8.3	+1.0	1.7×10^{-5}
10	0.0	6.5	0.0	1×10^{-5}
11	0.0	6.5	0.0	1×10^{-5}
12	0.0	6.5	0.0	1×10^{-5}
13	0.0	6.5	0.0	1×10^{-5}

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Reproducibilidad de los sensores

La reproducibilidad de los sensores se evaluó empleando las absorbancias máximas a la longitud de onda máxima del cromóforo libre y del complejo formado (tabla 3.1). Sobre los valores de absorbancia obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para todos los sistemas, con un nivel de confianza del 95 %. La figura 3.1A representa los valores de absorbancia alcanzados para las 5 membranas óptimas preparadas para cada sistema antes de la complejación, las barras de error corresponden a que para cada membrana se midió 4 veces la absorbancia en diferentes puntos de la membrana. Además, se observa que los valores de absorbancia son muy similares para los sistemas PAN-Pb y PAN-Hg, puesto que la cantidad de cromóforo empleado para la preparación de las membranas es cercana (0.68 mg y 0.53 mg respectivamente), sin embargo, para el sistema PAN-Cd el valor de absorbancia es mayor considerando que en este caso la cantidad de cromóforo óptima es de 1.0 mg.

La figura 3.1B muestra los valores de absorbancia alcanzados para las 5 membranas óptimas preparadas para cada sistema después de la complejación (556 nm para los sistemas PAN-Pb y PAN-Hg, y 550 nm para el sistema PAN-Cd). En la gráfica se observa que la dispersión en una misma membrana aumentó, así como también entre membranas. Esto está en acuerdo con el análisis de varianza realizado sobre los valores de absorbancia, al 95 % de confianza, como se observa en la tabla

3.5, donde se muestran los valores de la razón-F y sus correspondientes valores-P para los tres sistemas estudiados, donde se encontró que los sistemas antes de la complejación el valor-P es mayor que 0.05, por lo tanto, no existe diferencia estadísticamente significativa entre las absorbancias de las 5 membranas a la longitud de onda del cromóforo libre. Sin embargo, para los sistemas PAN-Hg y PAN-Cd se observa que sí hay diferencia estadísticamente significativa después de la complejación, no así para el sistema PAN-Pb. Esto podría ser indicativo que el metal no está siendo atrapado por la membrana de forma homogénea en toda la superficie, lo cual también maximiza las diferencias entre las réplicas realizadas.

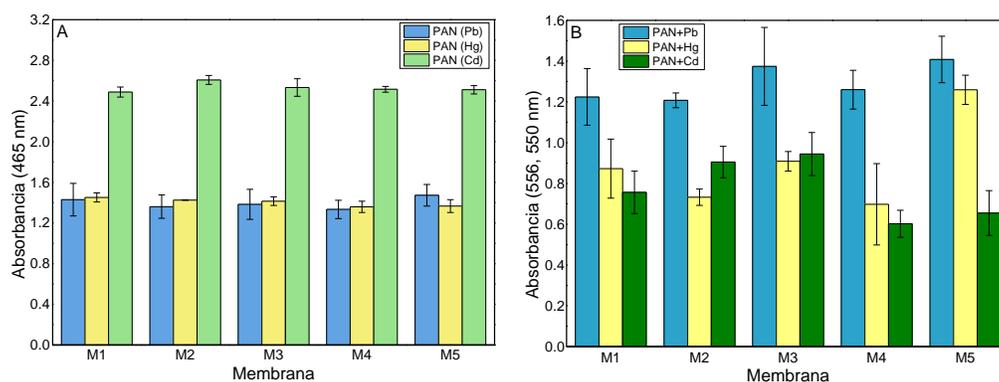


Figura 3.1. Valores de absorbancia para las membranas óptimas usando PAN como cromóforo A: antes de la complejación, B: después de la complejación.

Tabla 3.5. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la reproducibilidad de los sensores usando PAN como cromóforo

Metal	Sin complejar (466 nm)		Complejado (566 nm, 550 nm)	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Hg²⁺	2.55	0.0896 > 0.05	8.00	0.0012 < 0.05
Cd²⁺	1.86	0.1784 > 0.05	10.17	0.0003 < 0.05
Pb²⁺	0.76	0.5673 > 0.05	2.08	0.1346 > 0.05

Para los sistemas con Ditizona como cromóforo, la reproducibilidad de la absorbancia se evaluó tanto para las membranas sin complejar y complejadas, sin embargo, la ditizona presenta dos bandas en su espectro visible a 441 nm y a 616 nm, por lo tanto, se evaluó la reproducibilidad de la señal analítica a ambas longitudes de onda. La figura 3.2 muestra los valores de absorbancia alcanzados para las 5 membranas en condiciones óptimas cuando se realizaron las mediciones a 441 nm.

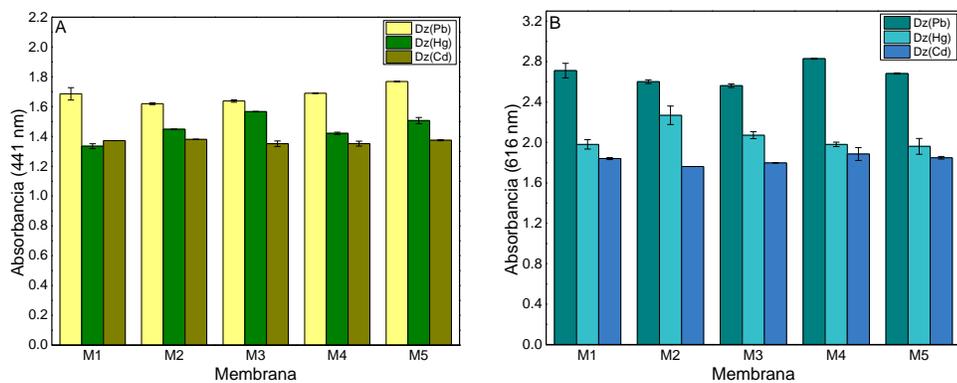


Figura 3.2. Valores de absorbancia (n = 4) para 5 membranas óptimas usando Ditizona como cromóforo, A: 441 nm y B: 616 nm, antes de la complejación.

La reproducibilidad de las membranas complejadas se muestra en la figura 3.3, donde se representan los valores de absorbancia a la longitud de onda del complejo formado (502 nm).

Tabla 3.6. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la reproducibilidad de los sensores usando Ditizona como cromóforo

Metal	Sin complejar (441 nm)		Sin complejar (616 nm)		Complejado (566 nm)	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Hg ²⁺	2.22	0.123 > 0.05	1.20	0.349 > 0.05	684.13	0.00 < 0.05
Cd ²⁺	0.04	0.997 > 0.05	0.18	0.941 > 0.05	0.08	0.988 > 0.05
Pb ²⁺	1.07	0.407 > 0.05	1.48	0.262 > 0.05	13.47	0.00 < 0.05

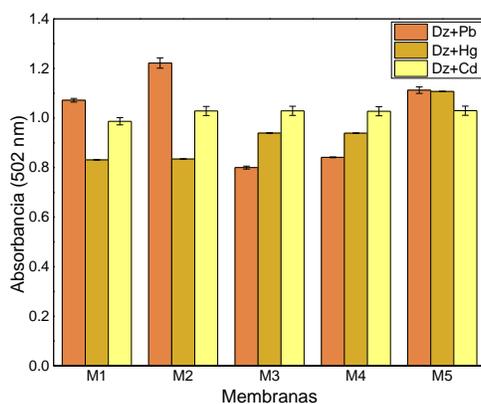


Figura 3.3. Valores de absorbancia (n = 5) para las 5 membranas óptimas usando Ditizona como cromóforo, después de la complejación (502 nm).

Como se observa, en esta ocasión, sólo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para los sensores con cadmio después de la complejación. Estos resultados indican que la forma de

ingreso del metal al sensor es un factor muy importante para controlar su reproducibilidad, pero esto también está determinado por el tipo de catión y cromóforo utilizado.

3.2.2. Estabilidad de los sensores

La evaluación de la estabilidad de los sensores da cuenta del buen desempeño de éste, asegurando que su capacidad de detección se mantenga constante respecto al tiempo.

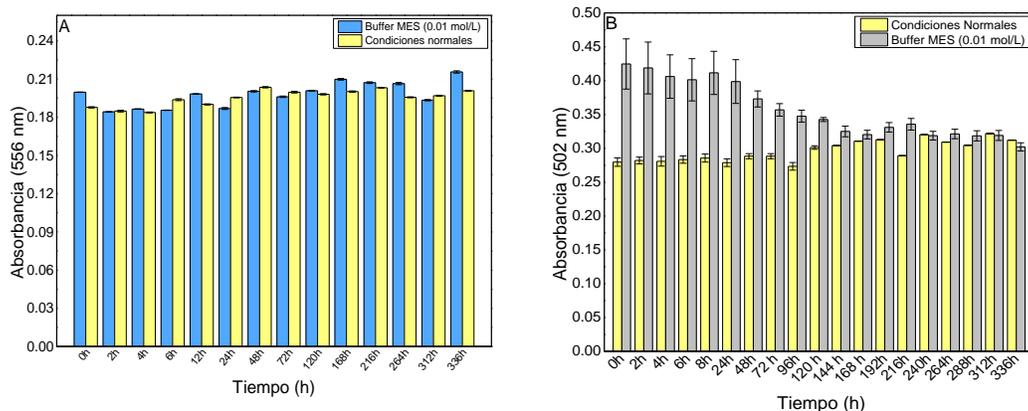


Figura 3.4 Valores de absorbancia para las membranas óptimas complejadas ($n = 3$) para el sistema A: PAN-Pb y B: Dz-Pb.

En este caso, para todos los sistemas, las membranas óptimas complejadas se mantuvieron en disolución buffer MES pH: 6.5 y en condiciones normales de laboratorio durante 13 días, midiendo su valor de absorbancia a la longitud de onda del complejo formado. En la figura 3.4 se observa el perfil de estabilidad para los sistemas A: PAN-Pb y B: Dz-Pb, mostrándose los valores de absorbancia promedio ($n = 3$) a 556 nm para ambos grupos de membranas.

Tabla 3.7. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias promedio ($n = 3$) para la evaluación de la estabilidad de los sensores para los sistemas PAN-Pb y Dz-Pb.

Sistema	PAN			
	8 horas		13 días	
Tiempo	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Normal	2.20	0.14 > 0.05	0.67	0.78 > 0.05
Buffer	0.14	0.96 > 0.05	0.43	0.95 > 0.05
Sistema	Ditizona			
Tiempo	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Normal	0.003	1.00 > 0.05	0.18	0.99 > 0.05
Buffer	0.009	1.00 > 0.05	0.22	0.99 > 0.05

En este caso no se observa variación apreciable en los valores de absorbancia a lo largo del tiempo para el sistema PAN-Pb en ninguna de las dos condiciones, notándose que las membranas mantienen su valor de absorbancia durante los 13 días que duró el experimento; no así ocurre con el sistema Dz-

Pb donde sí se observa una disminución paulatina en los valores de absorbancia. Sin embargo, como se observa en los resultados del análisis de varianza, al 95 % de confianza, mostrados en la tabla 3.7 donde según el valor-P > 0.05, no existen diferencias estadísticamente significativas entre las absorbancias en ninguno de los dos sistemas. Por lo cual, las membranas son estables durante los 13 días que se llevó a cabo el experimento.

Para los sistemas PAN-Hg y Dz-Hg, en la gráfica 3.5A se observa que para el sistema PAN-Hg, en ambas condiciones hay una disminución en la absorbancia promedio (n =3), siendo más visible para los sensores conservados en disolución buffer MES, pH: 6.5, lo que puede indicar que el complejo PAN-Hg formado no es estable bajo estas condiciones. No así para el sistema Dz-Hg, para el cual no se observa variaciones en la absorbancia a lo largo de los 13 días que se mantuvo el experimento.

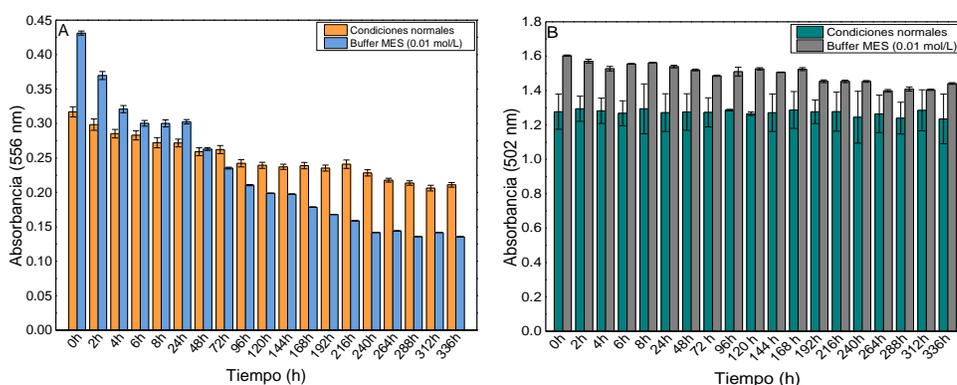


Figura 3.5 Valores de absorbancia para las membranas óptimas complejadas (n = 3) para el sistema A. PAN-Hg, y B Dz-Hg

Lo anterior va en acuerdo con el análisis de varianza realizado, se observa en la tabla 3.8 que para el sistema PAN-Hg existe una diferencia estadísticamente significativa, con lo cual las membranas, no son estables a lo largo del tiempo. Caso que no ocurre con el sistema Dz-Hg donde se observa que, bajo ambas condiciones, no existe diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 3.8. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la estabilidad de los sensores para el sistema PAN-Hg y Dz-Hg.

Sistema	PAN			
	8 horas (corto plazo)		13 días (largo plazo)	
Grupo	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Cond. Normal	56.41	0.000 < 0.05	25.22	0.000 < 0.05
Buffer	6.90	0.000 < 0.05	13.79	0.000 < 0.05
Sistema	Ditizona			
Sistema	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Normal	0.004	1.00 > 0.05	0.009	1.00 > 0.05
Buffer	0.601	0.70 > 0.05	1.67	0.99 > 0.05

Con respecto a la estabilidad de los sensores para el sistema PAN-Cd y Dz-Cd, la figura 3.6 muestra los valores de absorbancia respecto al tiempo para $n = 3$ sensores. En la gráfica se puede observar que para ambos sistemas se mantienen los valores de absorbancia cercanos entre sí con respecto al tiempo.

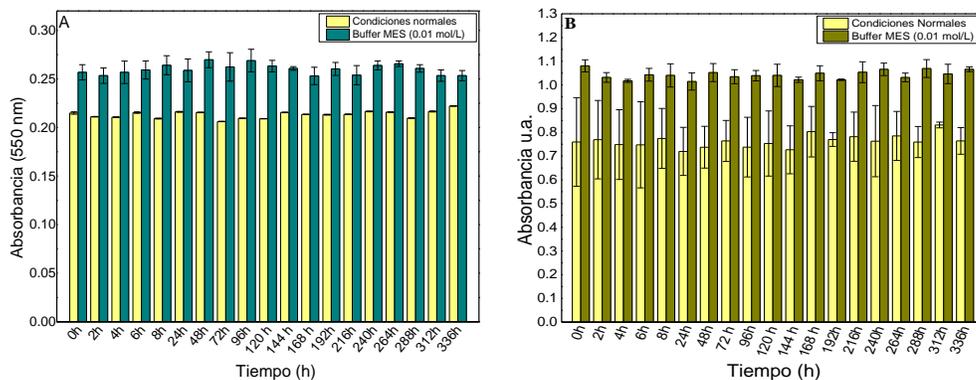


Figura 3.6 Valores de absorbancia para las membranas óptimas complejadas ($n = 3$) para el sistema A: PAN-Cd y B: Dz-Cd.

En este caso, esta estabilidad se puede constatar con los resultados del análisis de varianza, los valores de probabilidad mostrados en la tabla 3.9, donde se observa que en todos los casos el valor-P es mayor 0.05.

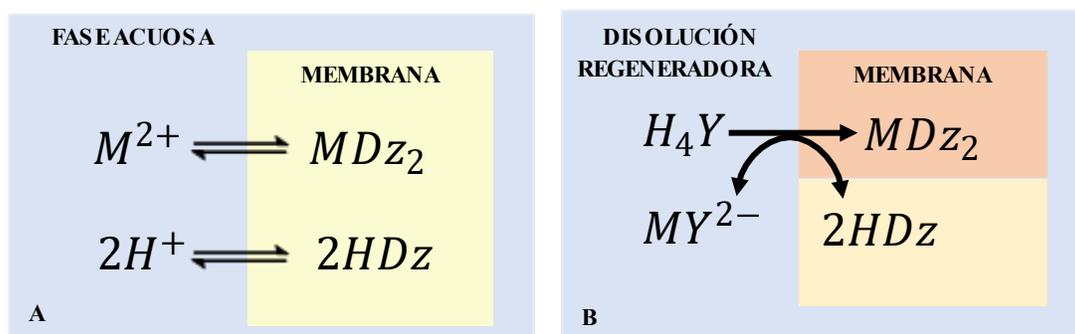
Tabla 3.9. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) de las absorbancias máximas para la evaluación de la estabilidad de los sensores para el sistema PAN-Cd y Dz-Cd.

Grupo	8 horas (corto plazo)		13 días (largo plazo)	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Cond. Normal	0.40	0.8021 > 0.05	0.24	0.9991 > 0.05
Buffer	0.03	0.9979 > 0.05	0.03	1.000 > 0.05
Sistema	Ditizona			
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Normal	0.016	0.999 > 0.05	0.146	1.00 > 0.05
Buffer	1.959	0.1771 > 0.05	1.171	0.330 > 0.05

3.2.3. Reversibilidad de los sensores

La reversibilidad de los sensores se evaluó empleando dos regeneradores como lo es el HCl y el EDTA, ambos a una concentración de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Al considerar el esquema 3.1A, se espera que el metal se compleje con el cromóforo inmovilizado en la membrana, al tiempo que se liberan protones. Por lo tanto, una vez se lleva a cabo la complejación, si se tiene como fase acuosa una fuente de protones, es posible que se produzca la reacción inversa de tal manera que se regenere el cromóforo, recuperándose la capacidad de detección del sensor.



Esquema 3.2. Mecanismo de reacción propuesto para la regeneración de un sensor de ditizona en la determinación de iones metálicos M^{n+} .

Así, considerando que el *ácido etilendiaminotetraacético* EDTA (figura 3.5) es un agente quelante ampliamente usado en reacciones de titulación complejométricas, ya que, como se observa en su estructura, los dos átomos de nitrógeno y los grupos carboxilo contienen electrones no compartidos que pueden complejarse con un ion metálico. El EDTA es entonces un ácido tetraprótico, con cuatro hidrógenos ionizables, que son desplazados al complejarse con un ion metálico, siendo un buen candidato como agente regenerador dada su alta capacidad de complejación con diversos metales. En la tabla 3.10 se muestran las constantes de formación de los quelatos de los metales aquí empleados con EDTA.

Tabla 3.10. Constantes de formación de los quelatos metálicos estudiados con EDTA¹²⁶

Metal	Fórmula	K_f
Cadmio	CdY^{2-}	1.35×10^{16}
Mercurio	HgY^{2-}	6.30×10^{21}
Plomo	PbY^{2-}	1.10×10^{18}

Por su parte el *ácido clorhídrico*, HCl, es un ácido fuerte que en disolución acuosa se encuentra completamente dissociado, por lo tanto, es una fuente de protones que lo hace adecuado como agente regenerador del sensor. En ambos casos, el esquema 3.1B describe el proceso químico mediante el cual se lleva a cabo la regeneración del sensor. Además de lo anterior, también se hace necesario considerar la naturaleza ácido base de los cromóforos empleados. Como ya se mencionó, la formación de complejos con ambos cromóforos es dependiente del valor de pH experimental, ya que, a valores de pH ácidos ambos cromóforos se encuentran protonados, lo cual limita la formación de los complejos con los metales trabajados. Así, el pH también es un factor íntimamente ligado a las diferentes especies en las que se puedan encontrar los metales en disolución, este punto se ampliará en la sección 3.2.4. Por ahora, es necesario mencionar que, así como el valor de pH influye en la

forma como se encuentra el cromóforo, también da cuenta de la forma en que se encuentra la especie metálica en disolución. Dicho esto, y con base a las constantes de formación de los complejos con EDTA reportadas en la literatura, se realizó el cálculo de las constantes condicionales a los valores de pH y concentración trabajados experimentalmente, los valores de estas constantes y todas las implicaciones matemáticas se amplían en la sección de anexos (A.2.2). A partir de estos valores se graficaron los diagramas de especiación para explicar los resultados de la reversibilidad de los sensores.

En términos generales, la capacidad de regeneración se evalúa considerando la formación del complejo $MEDTA^{2-}$ o del complejo MCl_2 , según sea el caso. Sin embargo, la recuperación de la señal en los ciclos subsecuentes se mide según la capacidad del sistema de recuperar el complejo ML_2 (siendo L = PAN o Dz, según el caso). A medida que los complejos $MEDTA^{2-}$ o MCl_2 sean estables, la capacidad de detección de la membrana se perderá en función a su uso.

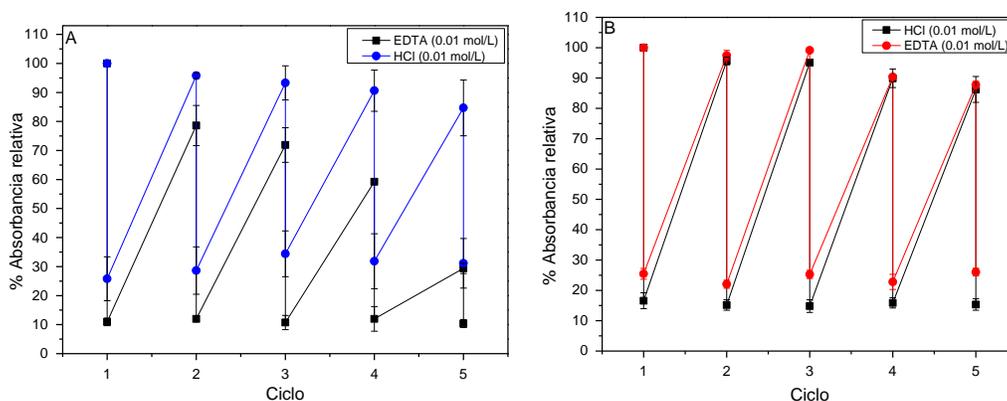


Figura 3.7. Gráfico de la reversibilidad de la señal analítica (% Absorbancia relativa) para el sistema A: PAN-Pb y B: Dz-Pb, empleado EDTA y HCl (0.01 mol/L)

Para los sistemas PAN-Pb y Dz-Pb, en la figura 3.7 A y B respectivamente, se muestran los ciclos de detección-recuperación del sensor empleando ambos agentes regeneradores. Se observa que para el sistema PAN-Pb empleando EDTA, se logra una regeneración promedio del sensor del 88.8 ± 0.43 % sin embargo, su capacidad de detección se pierde a medida que se avanza en los ciclos.

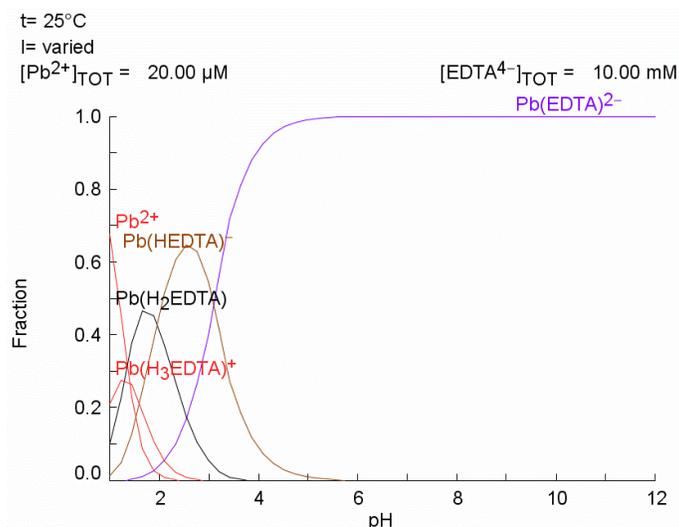
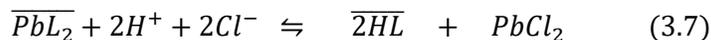


Figura 3.8. Diagrama de fracción de especie para el sistema $\text{Pb}^{2+}/\text{EDTA}$ en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Pb, $[\text{EDTA}] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[\text{Pb}^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Según el diagrama de especiación (figura 3.8), al valor de pH trabajado experimentalmente, 6.5, la especie predominante es el complejo de plomo con el EDTA, PbEDTA^{2-} , siendo un indicativo de que la regeneración del cromóforo en la membrana sí se está llevando a cabo, lo cual explica que los puntos de recuperación en la gráfica 3.7 alcancen bajos valores

El pH de la disolución de HCl 0.01 mol/L, empleada en la reversibilidad, fue aproximadamente 2. Esto se debe justamente al hecho que a ese valor de pH se tendrá una fuente de iones H^+ que favorecen la regeneración del cromóforo, y de iones Cl^- que, al presentar equilibrios con el ion metálico, también favorece a la reversibilidad del sistema (ecuación 3.7). En este caso, y considerando también el diagrama de especiación (figura 3.9), el HCl se presenta como un regenerador adecuado para ambos sistemas.



Al emplear HCl, la capacidad de regeneración promedio del sensor es de aproximadamente $69.6 \pm 8.6 \%$ y se observa que hay una mejor capacidad de detección a lo largo de los ciclos de uso.

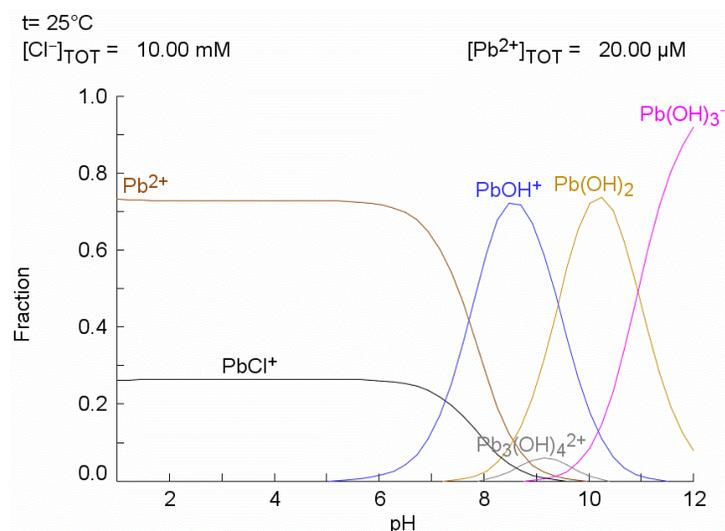


Figura 3.9. Diagrama de fracción de especie para el sistema $\text{Pb}^{2+}/\text{HCl}$ en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Pb, $[\text{HCl}] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[\text{Pb}^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Sin embargo, para el caso del sistema Dz-Pb, se alcanza una regeneración promedio del $93.7 \pm 5.5 \%$ y del 91.7 ± 4.5 empleando EDTA y HCl respectivamente. En este caso se observa que la regeneración se mantiene relativamente estable en cada ciclo.

Lo anterior puede ser respaldado por el análisis de varianza, ANOVA de dos vías, realizado sobre los valores de absorbancia relativa y considerando el número de ciclos como variable (Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) del % de absorbancia relativa promedio para la evaluación de la reversibilidad de los sensores para el sistema PAN-Pb, empleando EDTA y HCl (0.01 mol/L)

Origen de la variabilidad	PAN			
	EDTA		HCl	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Ciclo	11.15983974	0.000 < 0.05	200.358819	0.000 < 0.05
Sensor	6.296749603	0.000 < 0.05	22.8976209	0.000 < 0.05
Origen de la variabilidad	Ditizona			
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Ciclo	2633.02	0.000 < 0.05	1116.96	0.000 < 0.05
Sensor	2.8513	0.084 > 0.05	1.915	1.915 > 0.05

Dados los valores de probabilidad, se confirma que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los ciclos para ambos sistemas, no así en el caso de la diferencia entre sensores, donde se encontró que, para el sistema Dz-Pb no existen diferencias estadísticamente entre los mismos. Se observa en la gráfica que a medida que la membrana es reutilizada, la dispersión entre las medidas aumenta haciéndose más evidentes las diferencias entre las réplicas para el sistema PAN-Cd.

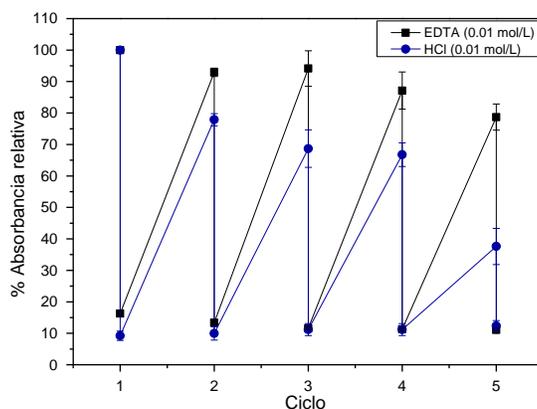


Figura 3.10. Gráfico de la reversibilidad de la señal analítica (% Absorbancia relativa) para el sistema PAN-Hg, empleado EDTA y HCl (0.01 mol/L)

En la figura 3.10 se representan los ciclos de detección-recuperación para el sistema PAN-Hg, con ambos regeneradores. Se observa que, la regeneración con EDTA alcanza el $87.3 \pm 4.8 \%$ y con HCl el $89.2 \pm 1.5 \%$. Sin embargo, respecto a la detección, a medida que avanzan los ciclos se observa que hay una disminución en su capacidad de detección, más pronunciada cuando se emplea HCl como regenerador. Al emplear EDTA como regenerador, se puede observar que a pH 6.5 predomina el complejo $HgEDTA^{2-}$ (ecuación 3.8), favoreciéndose la regeneración del sensor.



En cuanto al uso de HCl, si bien se alcanza una buena regeneración, la capacidad de detección del sistema disminuye a lo largo de los ciclos, probablemente debido a que quedan menos sitios disponibles en la membrana que permitan la complejación del mercurio con el cromóforo, o por la estabilidad del ión Hg^{2+} con los iones cloruro (figura 3.11).

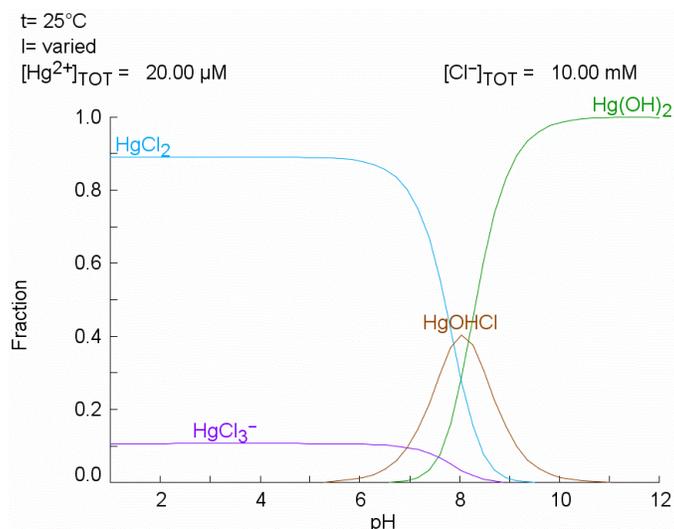


Figura 3.11. Diagrama de fracción de especie para el sistema Hg^{2+}/HCl en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Hg, $[HCl] = 0.01 \text{ mol/L}$, $[Hg^{2+}] = 2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Las diferencias se pueden evidenciar a través de los resultados del ANOVA (Tabla 3.12), donde se puede observar que para el caso de la regeneración con EDTA existen diferencias estadísticamente significativas tanto entre los sensores ($n = 3$), como entre los ciclos. En el caso del HCl, las diferencias existen únicamente entre ciclos. A medida que el sensor es reutilizado pierde su capacidad de detección en ambos casos, sin embargo, al emplear EDTA como regenerador, este puede ser empleado los primeros 3 ciclos, ya que el análisis de varianza realizado únicamente sobre estos puntos arrojó un valor-P $0.27 > 0.05$.

Tabla 3.12. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) del % de absorbancia relativa para la evaluación de la reversibilidad de los sensores para el sistema PAN-Hg, empleando EDTA y HCl (0.01 mol/L)

Origen de la variabilidad	EDTA		HCl	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Ciclo	470.1	$0.000 < 0.05$	162.9	$0.000 < 0.05$
Sensor	3.88	$0.04 < 0.05$	1.88	$0.181 > 0.05$

Dadas las constantes de formación de la ditizona ($K_f = 1.99 \times 10^{40}$)⁸⁹ y el EDTA ($K_f = 6.30 \times 10^{21}$) con mercurio, es de notar que los complejos con ditizona pueden llegar a ser más estables que este metal con EDTA, por tanto, es de esperar que éste último no funcione como regenerador para este sistema.

Además, está evidenciado a través de los experimentos de estabilidad para el sistema Dz-Hg (Figura 3.5B y tabla 3.5) su alta estabilidad, lo cual también da cuenta de que su regeneración, tanto con EDTA como con HCl, no sería químicamente viable bajo las condiciones planteadas.

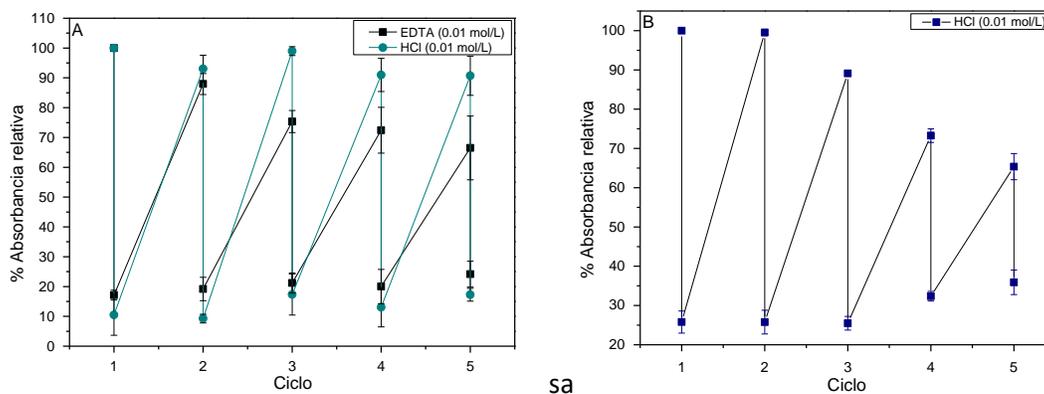


Figura 3.12. Gráfico de la reversibilidad de la señal analítica (% Absorbancia relativa) para los sistemas PAN-Cd y Dz-Cd, empleado EDTA y HCl (0.01 mol/L)

Respecto a la reversibilidad para los sistemas PAN-Cd y Dz-Cd, en la figura 3.12 se observa que, respecto al sistema PAN-Cd empleando EDTA como regenerador, hay pérdida en su capacidad tanto de regeneración como de detección a medida que avanzan los ciclos, alcanzando en promedio el 79.7 ± 6.7 % de la capacidad de regeneración.

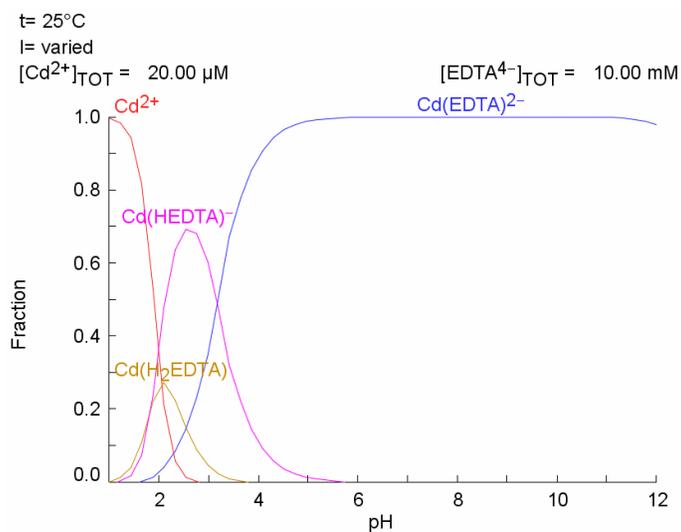


Figura 3.13. Diagrama de fracción de especie para el sistema $Cd^{2+}/EDTA$ en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Cd, $[EDTA] = 0.01 mol/L$, $[Cd^{2+}] = 2 \times 10^{-5} mol/L$.

A pesar de la pérdida de detección, al valor de pH trabajado, el Cd^{2+} se compleja con el EDTA formando la especie $CdEDTA^{2-}$ (figura 3.13), sin embargo, es posible que a medida que se reutiliza la membrana, se acaben los sitios disponibles para la formación del complejo. Respecto al uso de HCl

como regenerador, se alcanzó una recuperación del $(86.5 \pm 13.5) \%$, observándose un mejor comportamiento de este frente al uso del EDTA.

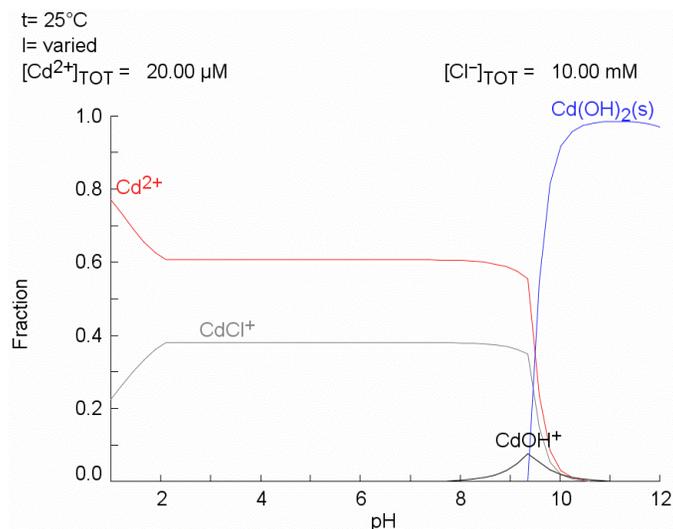


Figura 3.14. Diagrama de fracción de especie para el sistema Cd^{2+}/HCl en la evaluación de la reversibilidad del sistema PAN-Cd, $[HCl] = 0.01 mol/L$, $[Cd^{2+}] = 2 \times 10^{-5} mol/L$.

Para el sistema Dz-Cd se observa un comportamiento similar al explicado en el apartado anterior para el sistema Dz-Hg. Considerando la constante de formación de la ditizona con el cadmio ($K_f = 1.44 \times 10^{14}$)⁸⁹ frente a la constante de formación del EDTA con el mismo metal ($K_f = 2.88 \times 10^{16}$), se puede observar que la estabilidad del sistema Dz-Cd frente al uso del EDTA como regenerador, va a ser mayor y por lo tanto los iones cadmio no van a ceder frente a la presencia de éste y van a tender a permanecer complejados con la ditizona.

Por otro lado, al emplear HCl como regenerador, para ambos sistemas se alcanzó una recuperación del $86.5 \pm 13.5 \%$ para el sistema PAN-Cd y del $81.82 \pm 15.4 \%$ para el sistema Dz-Cd. Sin embargo, la capacidad de regeneración del sistema PAN-Cd es mejor en comparación con el sistema Dz-Cd, para este último sistema, como se observa en la figura 3.9B, hay una disminución en la capacidad de detección del sensor para el ciclo 4.

Para ambos sistemas, empleando cada regenerador, se realizó el ANOVA de dos vías con un 95 % de confianza; los resultados de este análisis se presentan en la tabla 3.13.

Tabla 3.13. Parámetros estadísticos (Valor-P y Razón-F) del % de absorbancia relativa para la evaluación de la reversibilidad de los sensores para el sistema PAN-Cd, empleando EDTA y HCl (0.01 mol/L)

Origen de la variabilidad	EDTA		HCl	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Ciclo	33.4	0.000 < 0.05	214.8	0.000 < 0.05
Sensor	0.87	0.44 > 0.05	0.31	0.73 > 0.05
Ditizona				
Origen de la variabilidad	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
Ciclo	-	-	648.96	0.000 < 0.05
Sensor	-	-	1.045	0.372 > 0.05

Según estos resultados, para todos casos existen diferencias estadísticamente significativas entre cada ciclo, no así entre los sensores.

Si bien existen otro tipo de sensores para el monitoreo de metales pesados en cuerpos de agua, por lo general estos requieren de altos costos de preparación y ejecución, y se han encontrado que son de un solo uso^{84,127,128}, desventaja superada por los dispositivos aquí desarrollados, que minimizan el impacto ambiental al poder ser reutilizados.

3.2.4. Efecto del pH y la concentración de las disoluciones metálicas

Una vez ejecutado el diseño experimental, se procedió a aplicar la estrategia de optimización 3 (M3 del capítulo anterior), en la cual se restan los espectros de las membranas antes y después de la complejación y posteriormente se calculan sus valores de PCs, empleando los valores de PC1 y PC2 como respuesta en el diseño experimental. La tabla 3.14 muestra el porcentaje de variabilidad de los datos explicados por los primeros dos PCs, como se observa en la figura 3.15.

Tabla 3.14. Porcentaje de varianza explicada por los primeros dos componentes principales (PCs), para cada sistema

Sistema	Varianza explicada
PAN-Pb	99 %
PAN-Hg	96 %
PAN-Cd	98 %
Dz-Pb	97 %
Dz-Hg	93 %
Dz-Cd	92 %

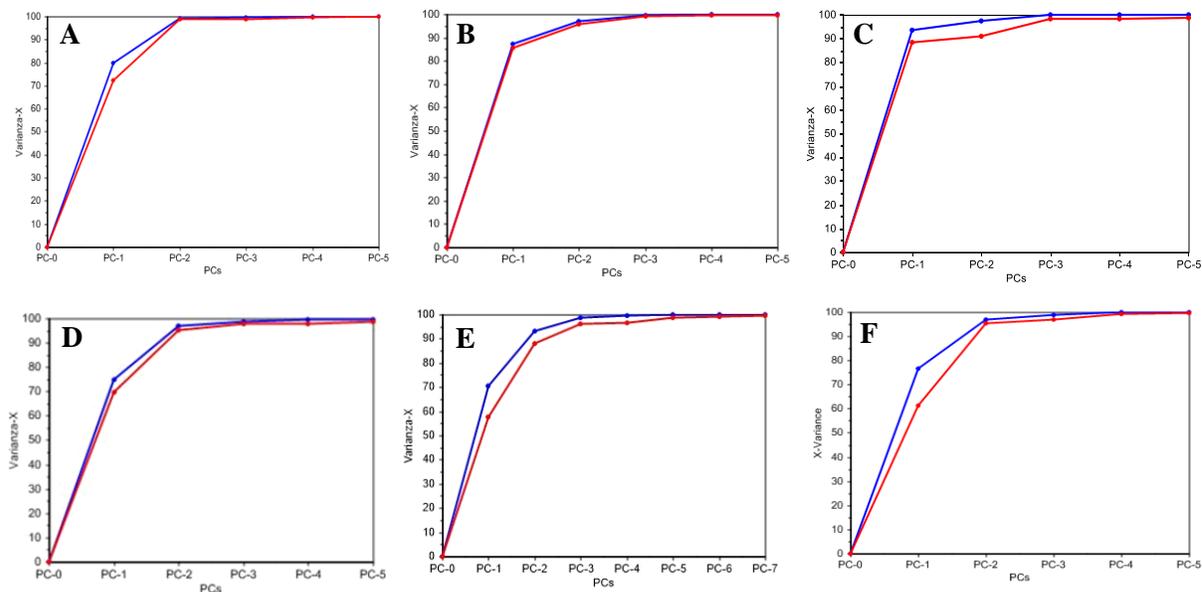


Figura 3.15. Análisis de componentes principales para la optimización del pH y la concentración los sistemas A: PAN-Pb²⁺, B: PAN-Hg²⁺, C: PAN-Cd²⁺, D: Dz- Pb²⁺, E: Dz- Hg²⁺, F: Cd²⁺.

Las tablas 3.15 y 3.16 resumen los valores de PCs obtenidos para los sistemas con PAN y Ditzona, respectivamente; a partir de la combinación de esos valores de PC se obtienen los valores de la función deseabilidad (tabla 3.17) empleados como respuesta en el diseño experimental.

Tabla 3.15. Respuestas (PC1 y PC2) para la optimización del pH y la concentración de los sistemas PAN-Me²⁺

Exp.	Factor		PAN-Pb		PAN-Hg		PAN-Cd	
	pH	[Me ²⁺]	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
1	-β	0.0	0,3418	-0,6698	1,3407	-0,9267	5,4279	-1,255
2	+β	0.0	-0,5339	-0,3144	1,3274	0,5236	-17,382	1,5325
3	-1.0	+1.0	0,1321	-0,7643	-1,7332	-0,2899	5,5700	-1,1372
4	-1.0	-1.0	-1,898	0,1037	-6,4015	-0,0920	5,4111	-1,2744
5	0.0	-β	-2,1237	-0,2125	6,9492	-0,7795	2,9504	0,0743
6	+1.0	-1.0	-1,6375	-0,07491	-2,4129	-0,7119	-3,0263	2,4043
7	0.0	+β	-1,5768	0,62911	-1,5241	-0,4514	5,4646	-0,6189
8	0.0	0.0	2,5906	-0,2230	0,3674	-0,8267	2,2348	0,9441
9	+1.0	+1.0	0,5151	-0,4594	-1,6594	-0,6201	-14,669	-3,4589
10	0.0	0.0	-0,0176	0,8209	0,05502	2,5359	1,7015	0,9855
11	0.0	0.0	2,4070	1,8278	0,6721	-0,5526	1,1484	1,2031
12	0.0	0.0	-0,3669	0,53427	-0,6108	1,4103	2,4647	0,2059
13	0.0	0.0	2,1694	-1,1974	3,6302	0,7809	2,8842	0,3951

Tabla 3.16. Respuestas (PC1 y PC2) para la optimización del pH y la concentración de los sistemas Dz-Me²⁺

Exp.	Factor		Dz-Pb		Dz-Hg		Dz-Cd	
	pH	[Me ²⁺]	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2
1	-β	0.0	1.8917	-2.0554	2.9730	-1.1128	3,5495	-0,2427
2	+β	0.0	-2.9630	0.8138	1.5674	0.5255	4,8331	-0,9986
3	-1.0	+1.0	-2.1820	-2.9712	-0.9056	2.2146	-0,3541	0,4618
4	-1.0	-1.0	-1.6501	-1.8335	-5.1483	-4.2556	0,5773	0,6877
5	0.0	-β	5.8301	3.1589	6.9119	-2.1899	-4,8593	-2,4246
6	+1.0	-1.0	-3.267	5.0898	5.2936	-1.1955	0,6664	-1,4218
7	0.0	+β	-2.9982	-1.8299	-0.7079	0.38030	-1,4156	-0,3064
8	0.0	0.0	-3.5828	0.7782	-1.8083	0.6290	-0,4884	0,5809
9	+1.0	+1.0	0.28470	0.48525	-0.4508	1.6359	0,8719	-0,9432
10	0.0	0.0	1.1084	-0.11921	0.8792	3.5247	-1,2019	1,7224
11	0.0	0.0	-4.3298	0.66465	-1.1649	0.9027	-0,4885	0,5809
12	0.0	0.0	10.0858	-0.11482	-3.4910	-0.0812	-0,4885	0,5809
13	0.0	0.0	1.7729	-2.0664	-3.9483	-0.9775	-1,2019	1,7224

3.17. Valores de la función deseabilidad obtenidos a partir de las respuestas PC1 y PC2.

Exp.	PAN-Pb	PAN-Hg	PAN-Cd	Dz-Hg	Dz-Pb	Dz-Cd
1	0.262267	0,55941	0,841956	0.435127	0.411691	0.213338
2	0.262267	0,55941	0,333306	0.435127	0.237232	0.213338
3	0.475912	0,47854	0,703352	0.718727	0.51632	0.472066
4	0.475912	0,534716	0,715924	0.302774	0.418454	0.472066
5	0.689458	0,367857	0,679575	0.392407	0.352569	0.730778
6	0.475912	0,534716	0,656066	0.481757	0.51632	0.472066
7	0.689458	0,390114	0,512021	0.715341	0.568527	0.730778
8	0.418422	0,936643	0,812649	0.435127	0.473037	0.305896
9	0.475912	0,47854	0,325802	0.451705	0.401926	0.472066
10	0.418422	0,936643	0,812649	0.435127	0.473037	0.305896
11	0.418422	0,936643	0,812649	0.435127	0.473037	0.305896
12	0.418422	0,936643	0,812649	0.435127	0.473037	0.305896
13	0.418422	0,936643	0,812649	0.435127	0.473037	0.305896

Una vez ejecutado el diseño empleando la función deseabilidad como respuesta, se obtuvo con el 95% de confianza, que los factores estadísticamente significativos fueron las interacciones $pH:pH$ y la interacción $[Me^{2+}]:[Me^{2+}]$, para los sistemas PAN-Pb y PAN-Hg, y el factor pH y la interacción $pH:[Me^{2+}]$ para el sistema PAN-Cd, como se observa en los diagramas de Pareto (figura 3.16).

Además, el modelo obtenido se redujo, considerando únicamente los factores estadísticamente significativos y de esta manera se obtuvieron las ecuaciones ajustadas para la respuesta de todos los sensores, como se observa en la tabla 3.18 (los resultados del ANOVA al 95% de confianza, para todos los sistemas se presentan en Anexos (A2.1).

Tabla 3.18. Ecuaciones ajustadas para la respuesta deseabilidad en cada sistema

Metal	PAN	Ditizona
Pb	$D = 0.418422 - 0.0780656 \times pH^2 + 0.135531 \times [Pb]^2$	$D = 0.480997 - 0.0580929 \times pH^2$
Hg	$D = 0.936643 - 0.179259 \times pH^2 - 0.269472 \times [Hg]^2$	$D = 0.434125 + 0.105325 \times [Hg] - 0.111501 \times pH \times [Hg] + 0.0581216 \times [Hg]^2$
Cd	$D = 0.8126 - 0.145 \times pH - 0.072 \times [Cd] - 0.110 pH^2 - 0.079 \times pH \times [Cd] - 0.106 \times [Cd]^2$	$D = 0.305896 - 0.0462774 \times pH^2 + 0.212444[Cd]^2$

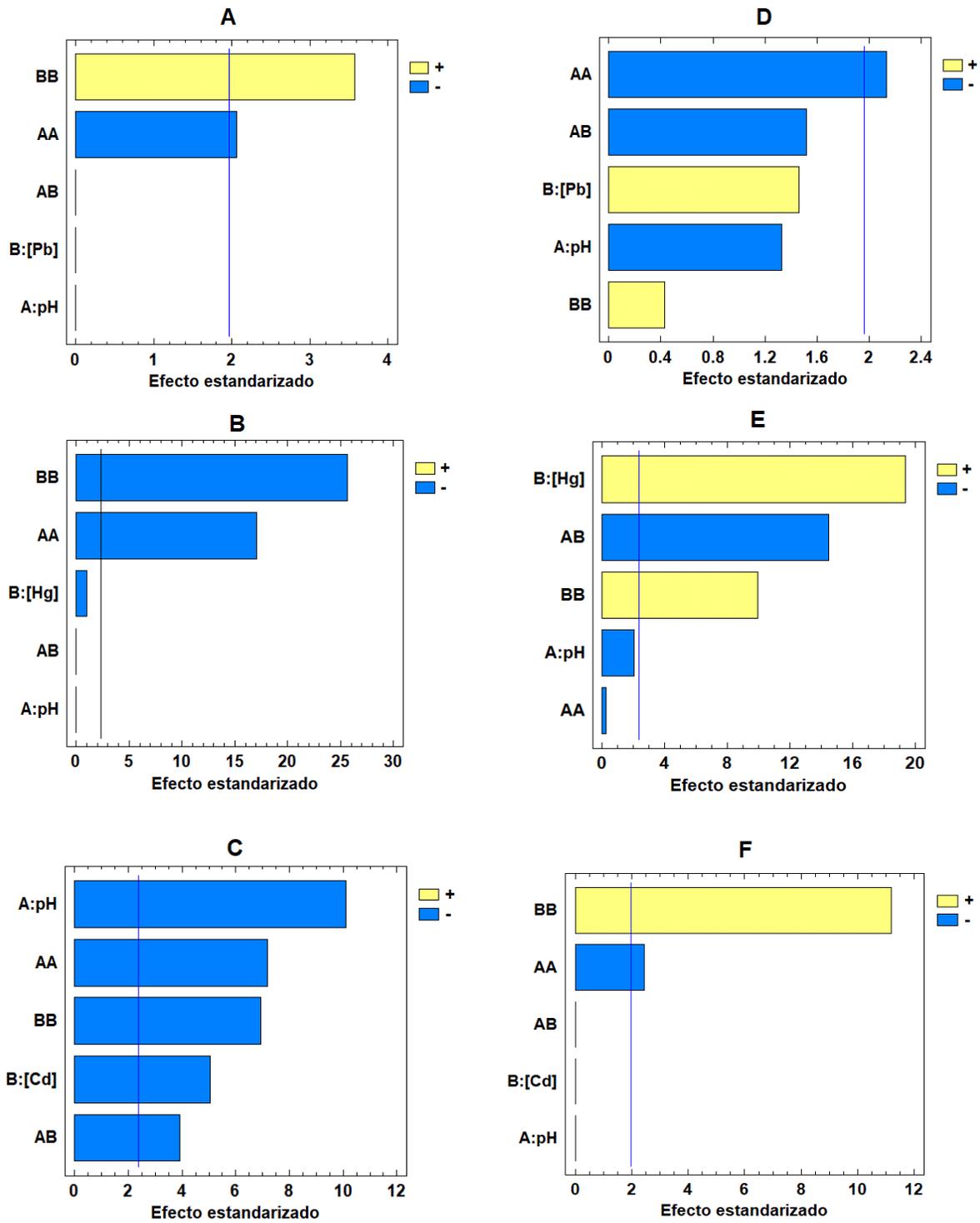


Figura 3.16. Diagramas de Pareto para la respuesta *función deseabilidad* de los sistemas A: PAN-Pb, B: PAN-Hg, C: PAN-Cd, D:Dz-Pb, E:Dz:Hg, F:Dz-Cd.

A partir del análisis estadístico se obtuvieron tanto los diagramas de superficie de respuesta como los gráficos de efectos principales para cada sistema (Figuras 3.17 y 3.18). Observando ambos gráficos es claro que, entre los factores estadísticamente significativos, las interacciones cuadráticas de la concentración como el pH, influyen en la respuesta en todos los sistemas empleando PAN como cromóforo. En el caso del sistema PAN-Pb, la interacción cuadrática de la concentración influye de manera positiva en la respuesta, no así para los sistemas PAN-Hg y PAN-Cd, donde la influencia de esta interacción es negativa.

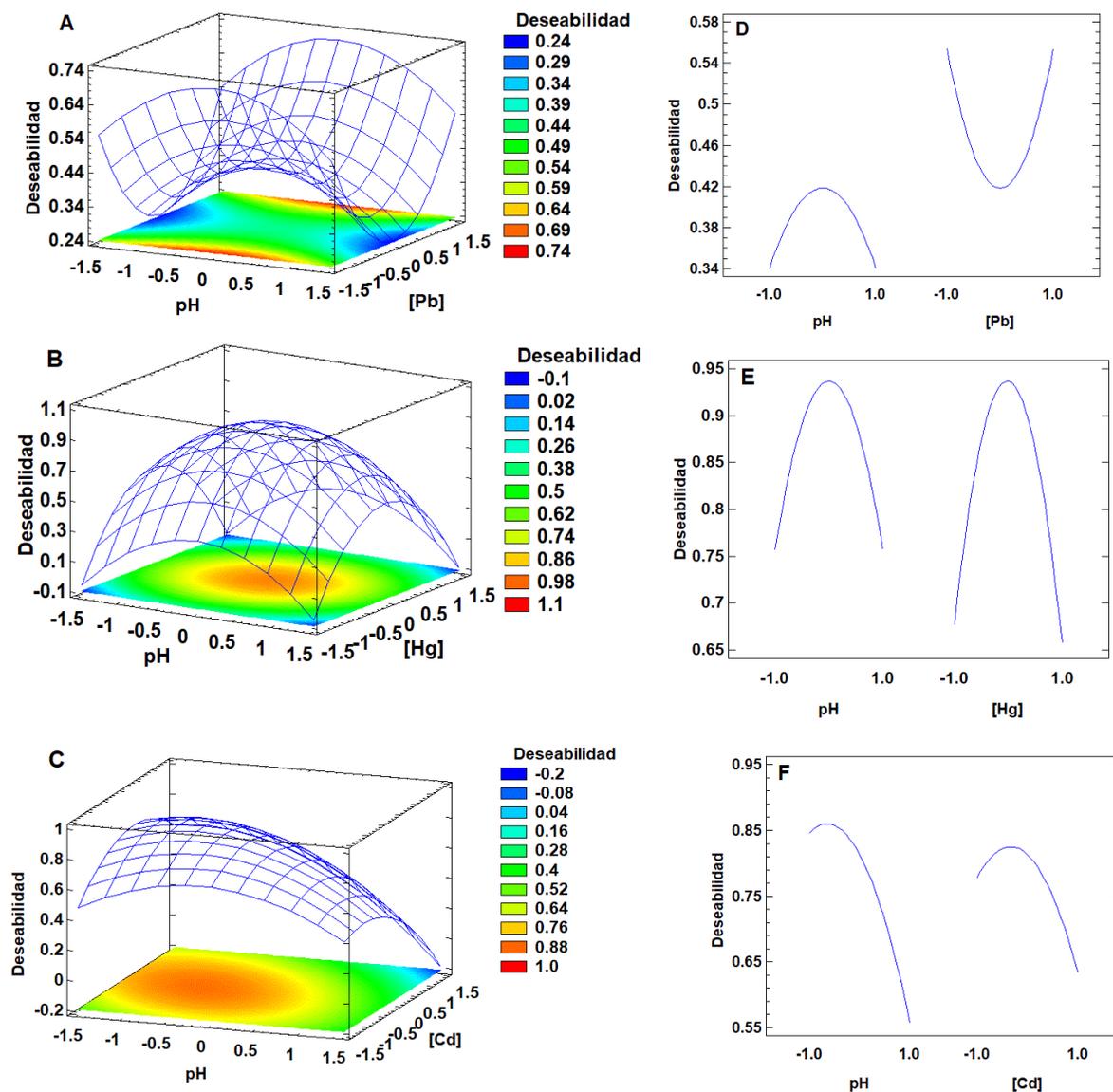


Figura 3.17. Gráficos de superficie respuesta función *deseabilidad* (A-C) y efectos principales (D-F) para los sistemas A y D: PAN-Pb, B y E: PAN-Hg, C y F: PAN-Cd.

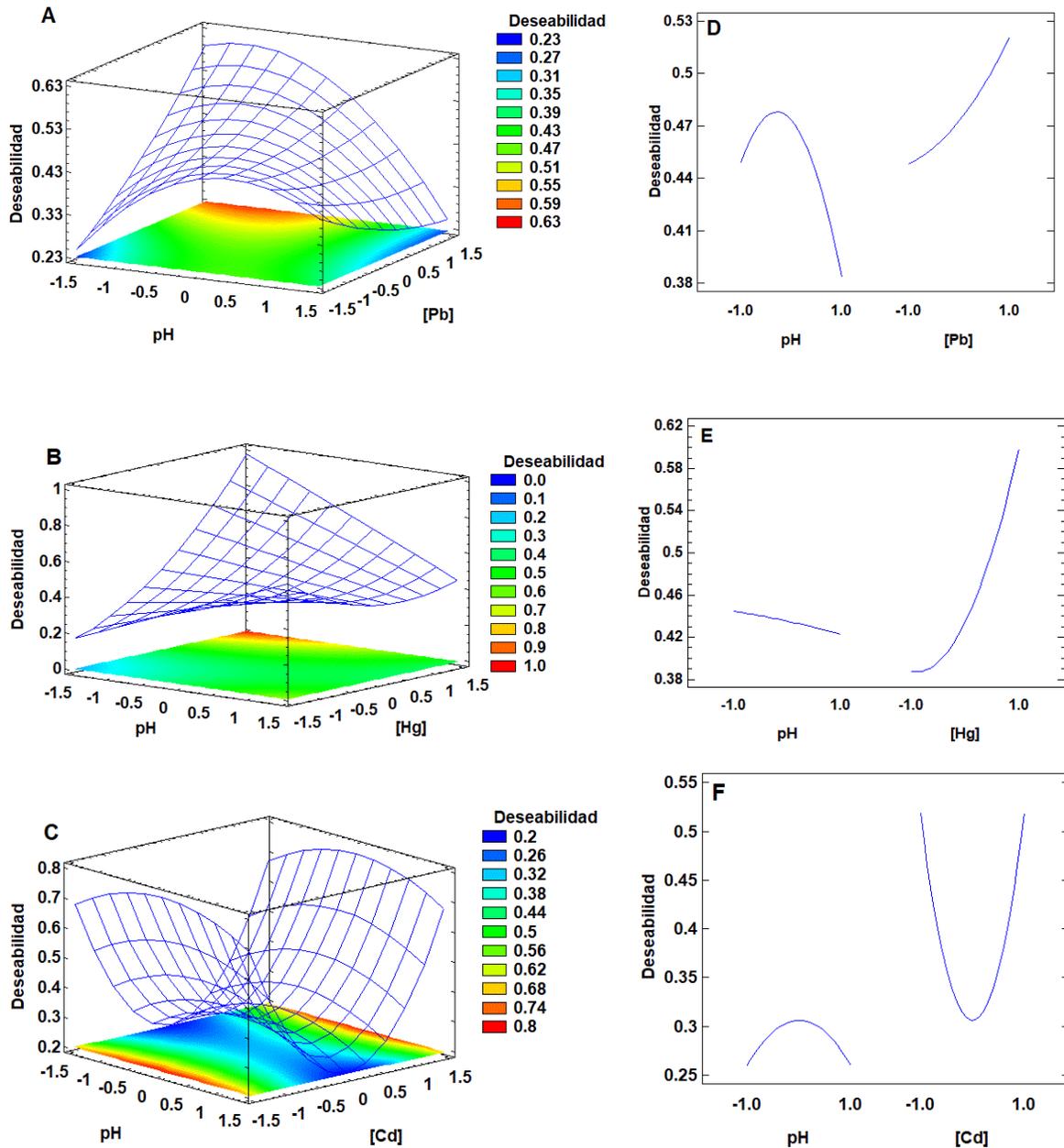


Figura 3.18. Gráficos de superficie respuesta función *deseabilidad* (A-C) y efectos principales (D-F) para los sistemas A y D: Dz-Pb, B y E: Dz-Hg, C y F: Dz-Cd.

Lo anterior se refleja en los gráficos de efectos principales, donde se observa que para el sistema PAN-Pb (Figura 3.12D) se encuentra un valor de respuesta mayor cuando la concentración alcanza valores altos o bajos del factor [Pb]; sin embargo, para los sistemas PAN-Hg y PAN-Cd, se observa que la forma de la interacción cuadrática de la concentración es negativa, alcanzando un máximo en la respuesta a valores centrales del factor concentración.

En el caso de los sistemas con Ditizona, observamos que para el sistema Dz-Pb, la concentración del metal no es un factor estadísticamente significativo, sin embargo, al observar el gráfico de efectos principales (Figura 3.13D), es claro que la respuesta alcanza mayores valores a una concentración alta de este metal. En el caso de los sistemas Dz con mercurio y cadmio se observa que tanto la concentración de los metales, como el pH de la disolución tienen una influencia en la respuesta, ya sea de manera individual o como interacción. Es preciso mencionar que la importancia de la evaluación del pH disolución y la concentración de los iones metálicos estudiados es debido a que son factores que determinan las especies presentes y disponibles para su complejación con los cromóforos empleados, por lo tanto, también se hace necesario considerar la naturaleza y química de estos.

3.2.4.1. Sistemas con PAN

Para el sistema PAN-Pb, se observa que dos niveles de concentración maximizan la respuesta, en este caso es necesario evaluar el comportamiento de cada condición de manera individual comparando los espectros antes y después de la complejación para ambas condiciones (figura 3.19). Se observa que a bajos niveles de concentración de plomo (2×10^{-7} mol/L), una pequeña banda (debida al complejo) en 556 nm, ésta es considerablemente pequeña, y en comparación con el experimento 7 la apariencia de la membrana no evidencia la formación del complejo. Por lo tanto, la composición de factores que maximiza la respuesta corresponde al experimento 7, siendo esta composición la que favorece la formación del complejo.

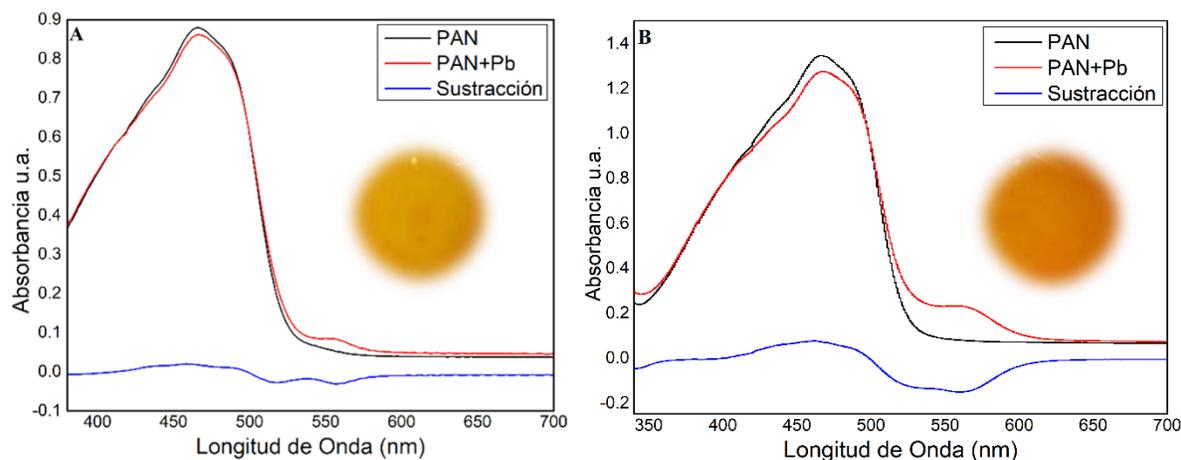


Figura 3.19. Espectros visibles para el sistema PAN-Pb, para los experimentos A: 5 y B: 7

De lo anterior, el hecho que el pH óptimo sea 6.5 va en acuerdo con la naturaleza del cromóforo empleado; recordando, el PAN es un anfolito orgánico con dos valores de pKa, que según su estructura (Esquema 1.1) a pH ácido el nitrógeno del anillo de la piridina se va a protonar, por lo tanto, a bajos valores de pH los iones metálicos entran a competir por los sitios de complejación con

los iones H^+ . Por el contrario, a pH básico, las posiciones de estos grupos funcionales estarán más disponibles para complejarse con el ion metálico, sin embargo, según el diagrama de especiación para los tres metales, presentados en Anexos (A2.1.2) a esos valores de pH las especies predominantes no son extraíbles por la membrana en el caso del plomo y el cadmio. La tabla 3.19 resume las condiciones de pH y concentración óptimas para cada sistema, empleando PAN como cromóforo.

Tabla. 3.19 Condiciones de pH y concentración óptimas para todos los sistemas empleando PAN como cromóforo.

Sistema	pH óptimo	Concentración (mol/L) óptima
PAN-Pb	6.5	2×10^{-5}
PAN-Hg		1×10^{-4}
PAN-Cd		1×10^{-4}

Los espectros y las apariencias de las membranas, bajo las condiciones óptimas se presentan en Anexos (A2.1.3).

3.2.4.2. Sistemas con Ditizona

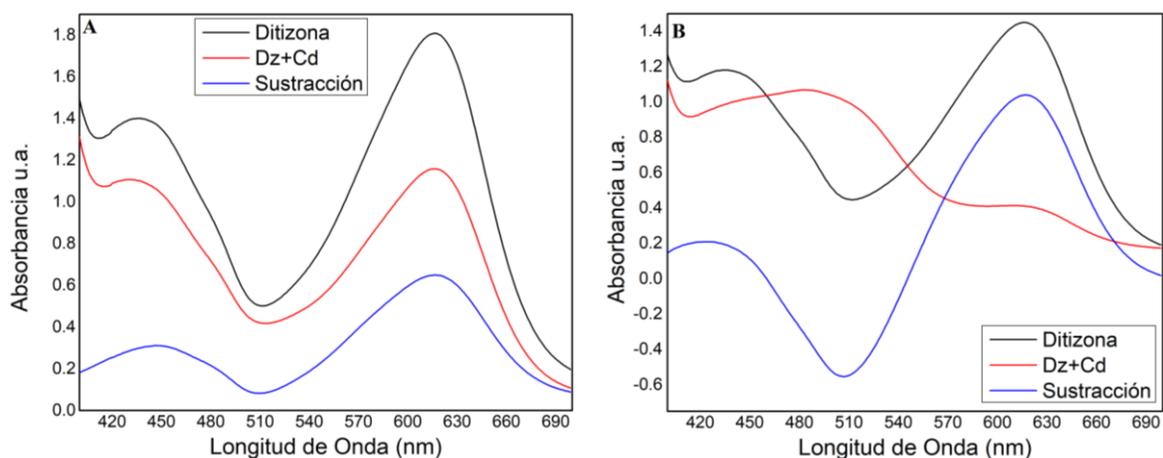


Figura 3.20. Espectros visibles para el sistema Dz-Cd, para los experimentos A: 5 y B: 7

En este caso, el sistema Dz-Cd presenta un comportamiento similar al sistema PAN-Pb, donde tanto a niveles bajos como a niveles altos de concentración de este metal, la respuesta alcanza máximos valores. Los experimentos que cumplen con este requisito a un valor de pH óptimo (6.5), son nuevamente los experimentos 5 y 7. De manera similar al caso del PAN-Pb, se escogieron como condiciones óptimas valores de pH 6.5 y una concentración de cadmio de 2×10^{-4} mol/L, de acuerdo

con los espectros visibles de ambos experimentos (Figura 3.20, A y B), donde se observa que en el experimento 5 (pH 6.5 y 2×10^{-7} mol/L) no hay formación del complejo.

Al analizar el diagrama de efectos principales para este sistema (Figura 3.13F), al igual que los coeficientes en las ecuaciones ajustada (Tabla 3.13), es de notar que el factor pH no es demasiado influyente en la respuesta al comparar tanto la forma de la gráfica de efectos principales como el coeficiente en la ecuación ajustada, a diferencia del factor concentración que tiene una mayor influencia. Aun así, según los resultados espectrales (figura 3.14) se escogió como óptimos altos valores de concentración y valores de pH medios, considerando nuevamente la naturaleza de la ditizona, que según su estructura a pH ácido tiende a protonarse, entrando en competencia los iones H^+ con los iones metálicos, por los sitios de complejación de la ditizona (átomos de nitrógeno y azufre).

Un comportamiento similar ocurre para el sistema Dz-Hg, en este caso, según la ecuación ajustada (Tabla 3.18), la interacción entre pH y concentración de este metal tiene una mayor influencia sobre la respuesta, observándose en el gráfico de efectos principales que se alcanza una mayor respuesta a altas concentraciones de mercurio y a niveles de pH bajos, es decir a pH 4.0. Sin embargo, se debe considerar la naturaleza química de la ditizona, que como se mencionó anteriormente, a pH ácidos la competencia entre los iones H^+ y los iones metálicos, no permite que la complejación se lleve a cabo de forma completa. Dicho esto, la tabla 3.20 resume las condiciones de pH y concentración que se recomiendan como óptimas en la determinación individual de los iones trabajados empleando ditizona como cromóforo.

Tabla. 3.20 Condiciones de pH y concentración óptimas para todos los sistemas empleando Ditizona como cromóforo.

Sistema	pH óptimo	Concentración (mol/L) óptima
Dz-Pb		
Dz -Hg	6.5	2×10^{-4}
Dz -Cd		

Conclusiones

- Todos los sistemas son reproducibles en cuanto a su preparación, es decir antes de la complejación. Una vez se lleva a cabo la complejación la reproducibilidad disminuye, debido a que la complejación no se realiza de manera homogénea en toda la membrana considerando que los espectros mostrados y los valores de absorbancia empleados como

respuesta en el análisis de varianza son un promedio de $n = 4$ mediciones en diferentes puntos de la membrana.

- Todos los sensores, excepto PAN-Hg, pueden ser conservados tanto en buffer como en condiciones normales hasta por lo menos 13 días, sin que se observe una disminución considerable en la señal analítica (absorbancia), por lo que se recomienda emplear condiciones normales para mantener a las membranas conservadas con buena respuesta durante al menos 13 días.
- Los sensores resultaron ser reversibles, bajo diferentes condiciones para cada sistema. El HCl (0.1 mol/L) se recomienda como regenerador para los sistemas PAN-Pb, PAN-Cd, Dz-Pb y Dz-Cd, mientras que el EDTA (0.1 mol/L) se recomienda como regenerador para los sistemas PAN-Hg. Los sistemas Dz-Hg no se encontraron reversibles con el uso de los regeneradores evaluados, dado que la constante de formación de este complejo es mayor en comparación con, por ejemplo, la constante de formación del complejo Hg-EDTA.
- Si bien el uso de un diseño experimental para la optimización de parámetros como pH de la disolución y concentración de los iones metálicos es recomendable dado que permite evaluar los factores de manera rápida y con el menor número de experimentos, arrojando resultados químicamente lógicos, no se debe dejar de lado la naturaleza química de los sistemas, dado que esto puede mejorar de manera considerable los resultados obtenidos. Por ejemplo, para el sistema PAN-Pb, el diseño experimental arrojó que tanto a valores altos y bajos del factor concentración, se obtenía una mayor respuesta de la función deseabilidad, sin embargo, el análisis químico (comportamiento espectral) y las observaciones experimentales (aspectos de las membranas), dieron cuenta que el valor de concentración óptima es a niveles altos.

Capítulo 4. Determinación simultánea de los iones metálicos empleando herramientas quimiométricas, una primera aproximación

4



En lo tocante a la ciencia, la autoridad de un millar no es superior al humilde razonamiento de una sola persona.

— Galileo Galilei

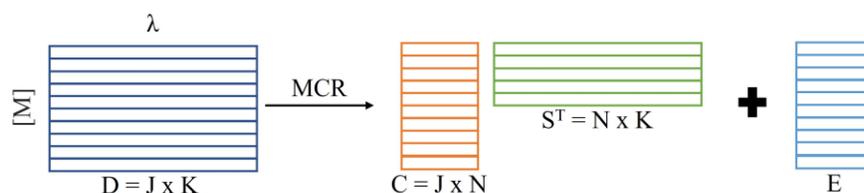
La importancia del presente capítulo radica en tener un mayor acercamiento al uso de los sensores en la determinación *in situ* de los iones metálicos considerando la complejidad de las muestras reales, como pueden ser aguas residuales contaminadas con pesticidas y fertilizantes inorgánicos, en las cuales se han encontrado concentraciones de los metales aquí trabajados entre 0.1 a 286 ppm^{129,130}s. Como primer paso para lograr este objetivo se debe considerar la presencia de los tres metales en la misma disolución y a partir de estos resultados ir armando un conjunto de sistema/condiciones adecuadas para el uso de estos dispositivos como sensores en la determinación de Hg²⁺, Cd²⁺ y Pb²⁺ en cuerpos de agua. Por lo tanto, en este capítulo se propone emplear una herramienta quimiométrica conocida como Resolución Multivariante de Curvas, MCR por sus siglas en inglés, con el fin de determinar la presencia simultánea de los iones metálicos trabajados, en la misma disolución acuosa.

Introducción

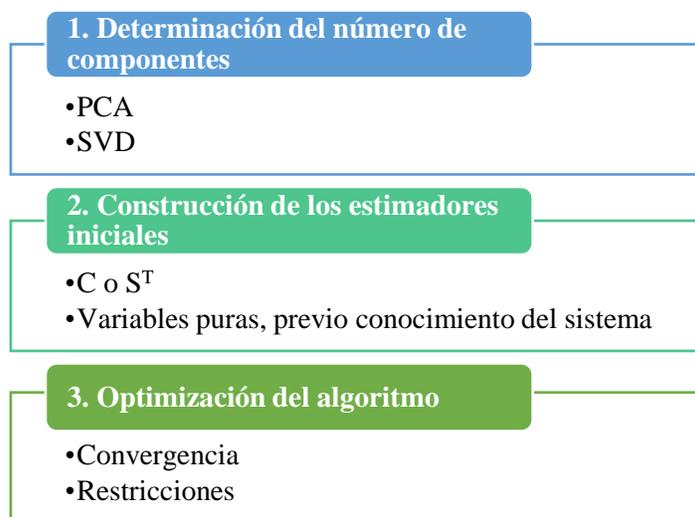
La resolución multivariante de curvas, MCR por sus siglas en inglés, consiste en un conjunto de técnicas que tienen como objetivo la descomposición bilineal, con significado químico, de un conjunto de datos complejos en perfiles de concentración y respuesta de sus componentes puros¹³¹. Esto lo hace a través de un mínimo de supuestos sobre la naturaleza y composición de la matriz de datos iniciales, descomponiéndola en las contribuciones individuales de cada uno de los componentes puros¹³². Al tratarse, en este caso particular, de medidas espectrofotométricas (espectros visibles), se considera que la suma de las contribuciones de cada componente del sistema corresponde a la absorbancia total a cada longitud de onda. Así, los espectros visibles a diferentes composiciones de cada metal corresponden a la matriz de trabajo sobre la cual el algoritmo MCR trabajará para descomponerla en las contribuciones de sus componentes individuales. Matemáticamente, esto se puede describir según la ecuación 4.1¹³¹⁻¹³⁴.

$$D = CS^T + E \quad (4.1)$$

Donde, D ($J \times K$) corresponde a la matriz de datos originales, contiene las absorbancias individuales de las diferentes J correspondientes a cada muestra (20 experimentos) a K diferentes longitudes de onda. La matriz C ($J \times N$) contiene las concentraciones de los N diferentes componentes presentes en la matriz original y S^T ($N \times K$) es la matriz que describe la respuesta instrumental de los N componentes, es decir los perfiles espectrales, y E representa las variaciones que no pueden ser explicadas por el modelo (residuales).



Esquema 4.1. Descomposición matricial de la matriz de datos original (D).



Esquema 4.2. Pasos requeridos en la descomposición de la matriz original de los datos (D).

MCR utiliza el algoritmo de mínimos cuadrados alternos (ALS), teniendo en consideración algunas restricciones según la naturaleza de los datos originales. La convergencia se consigue teniendo en cuenta la diferencia entre los residuales experimentales y los calculados mediante el algoritmo (ALS), que debe ser menor a un valor predeterminado. El análisis MCR-ALS se puede llevar a cabo a través de una serie de pasos representados por el esquema 4.1 y explicados a continuación^{131,133,135}.

- **Determinación del número de componentes (factores).** En MCR no se puede seleccionar el número de componentes o factores computados, justamente a través del análisis se estima

el número óptimo de factores que se necesitan para descomponer los datos iniciales. Según la información previa que se tenga del sistema, el número de componentes iniciales se puede tener una idea del número de factores, o se puede obtener empleando métodos auxiliares como Análisis de Componentes Principales (PCA) o descomposición en valores singulares (SVD). En el caso particular, es conocido que la mayor fuente de variabilidad puede ser debida a que en cada experimento se encuentra la presencia de tres iones metálicos, que por supuesto contribuirán de forma diferente a la respuesta (absorbancia total), por lo cual el número de factores esperados en este caso es 3.

- **Construcción de los estimadores iniciales.** En MCR-ALS un estimador inicial puede ser los perfiles de concentración o espectros de los componentes puros. Sin embargo, es importante comenzar con estimadores confiables, es decir, que obedezcan a las restricciones a las que va a someter el modelo. Dichas estimaciones pueden determinarse, al igual que el número de componentes, del conocimiento previo del sistema, no obstante, de no estar disponible esta información, existen métodos que pueden ayudar a obtener esta información inicial a partir de los datos originales, como el Análisis Factorial Evolutiva (EFA) o el Análisis de Automodelado Fácil de Usar (SIMPLISIMA). En el caso particular, conocer el número de componentes (es decir la contribución de los metales individuales sobre la respuesta), da un indicio de que es posible emplear los espectros puros de los metales individuales como estimadores iniciales en este paso del proceso.
- **Optimización del algoritmo.** MCR-ALS trabaja sobre una matriz de datos optimizando los estimadores iniciales (perfiles de concentración o espectros) empleando un algoritmo iterativo bajo restricciones adecuadas hasta que se alcanza el criterio de convergencia, como se mencionó, este criterio puede ser alcanzar un valor de ajuste definido por la diferencia entre residuales experimentales y calculados por el modelo. Los resultados obtenidos, una vez se alcanza la convergencia, serán *i.* el conjunto de perfiles de concentración, *ii.* los espectros puros, *iii.* los parámetros de calidad relacionados con el modelo (residuales). Así, para obtener resultados adecuados es importante controlar la selección de los estimadores iniciales y de **restricciones**, éstas últimas se refieren a propiedades que tanto los perfiles (matriz original) como los estimadores iniciales, deben obedecer. Estas propiedades dan forma a las filas y columnas del modelo bilineal del conjunto de datos y se implementan como condiciones matemáticas que ayudan a optimizar el proceso de MCR hacia una solución final. Dentro de las restricciones más conocidas se encuentran: No-negatividad, unimodalidad, cierre, entre otras.

Se han adelantado estudios en los que emplean el análisis MCR en la detección y cuantificación de adulterantes en leche en polvo¹³⁶, en el análisis de datos espectroscópicos EPR a partir de mezclas complejas¹³⁷, en el monitoreo de procesos de reacciones químicas¹³⁸, y en sus inicios, este algoritmo se empleó en el análisis quimiométrico de datos cromatográficos con detección UV-Vis y fluorescencia¹³⁹. En todos los casos, el algoritmo arrojó resultados prometedores en cuanto a la recuperación de los espectros puros y, en el caso de los estudios cromatográficos, los perfiles de elución, empleados en la estimación cuantitativa precisa de las concentraciones¹⁴⁰. Con base a lo anterior y dada la naturaleza de los sistemas estudiados en el presente trabajo, se propone emplear el análisis MCR-ALS sobre los espectros visibles de las membranas complejadas con el fin de recuperar los espectros puros y las concentraciones relativas de los tres metales a determinar.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Reactivos

Para la preparación de las membranas se empleó triacetato de celulosa (CTA, Aldrich) como polímero base, se emplearon como plastificantes 2-nitrofenil,octiléter (2NPOE, Aldrich, 99%) y tris(2-etilhexil)fosfato (TEHP, Aldrich, 97%,). Como cromóforos se emplearon 1,5-difeniltiocarbazona (Ditizona A.C.S grado reactivo, Aldrich) y 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN grado indicador, Aldrich); los disolventes empleados fueron diclorometano (CH_2Cl_2 , J.T. Baker, 99.99%) y etanol (Analyka, 99.9%).

Se preparó una disolución madre para cada ion metálico, a una concentración de 300 ppm, empleando las siguientes sales metálicas: nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, reactivo A.C.S 99.5%, Fermont), nitrato de cadmio tetrahidratado ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, J. T. Baker 99.1%) y nitrato de mercurio monohidratado ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Reactivo A.C.S 99.5%, Fermont). Como sistema buffer, pH: 6.5, se empleó una disolución de ácido 2-(N-morfolin)etanosulfónico (MES hydrate, >99.5% Sigma-Aldrich) a una concentración de $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$. Todas las disoluciones se prepararon empleando agua desionizada. De cada disolución madre se midió una alícuota y se llevó a 100 mL para preparar disoluciones con diferentes concentraciones de cada metal, según lo indicado por la matriz de diseño (Tabla 4.2), como se explicará más adelante.

4.1.2. Equipos

Las mediciones de pH se realizaron usando un pH-metro SevenCompact S220 con un electrodo combinado de vidrio Cole-Palmer 62014, Mettler Toledo. Para las mediciones de los espectros de absorbancia (400 nm – 700 nm) se empleó un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 2 y la agitación del sistema disolución metálica/membrana se realizó en un agitador mecánico Burrel 75.

El análisis estadístico se realizó empleando el software The Unscrambler para el análisis MCR, todos los espectros visibles se graficaron con el software OriginPro 8.

4.1.3. Determinación del rango dinámico de los sensores

Se prepararon 5 membranas óptimas para cada sistema (Tabla 2.17), es decir 15 membranas con PAN y 15 membranas con Dz, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 2.5, Capítulo 2. Cada grupo de 5 membranas se sometió a agitación con 30 mL de la disolución de cada ion metálico, de manera individual, a diferentes concentraciones como se indica en la tabla 4.1, a pH 6.5. La agitación se realizó durante el tiempo óptimo para cada sensor, y posteriormente se midió su espectro de absorbancia visible.

Tabla 4.1. Concentraciones de cada ión metálico, empleadas en la determinación del rango lineal de cada sensor.

Disoluciones	[Hg] mol/L	[Cd] mol/L	[Pb] mol/L
1	1×10^{-3}	1×10^{-3}	1×10^{-3}
2	6×10^{-4}	6×10^{-4}	6×10^{-4}
3	3×10^{-4}	3×10^{-4}	3×10^{-4}
4	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}
5	2×10^{-5}	2×10^{-5}	2×10^{-6}

Según la literatura, existe un parámetro, denominado α , que correlaciona la señal analítica del sensor con la concentración del analito. Si este parámetro es graficado frente al logaritmo de la concentración, se obtendrá una curva sigmoide, a través de la cual se establecen los límites superior e inferior que dan cuenta de la ocupación completa o nula de los sitios activos en la membrana. En la parte central de la curva se podrá asumir una relación lineal de la respuesta con la concentración siempre que la pendiente no se desvíe más del 1 % del valor máximo.

Así, el parámetro α se puede calcular empleando la ecuación 4.1:

$$\alpha = \frac{A - A_0}{A_1 - A_0} \quad (4.1)$$

Donde A_0 y A_1 representan la absorbancia del cromóforo complejoado y sin complejar, respectivamente. Esto es válido siempre que la absorbancia A , para un valor de longitud de onda particular, se correlacione con el valor de α a través de la ley de Lambert-Beer⁸⁸.

4.1.4. Determinación simultánea

Teniendo en cuenta los resultados en la determinación del rango dinámico de los sensores, se escogió un rango de concentraciones de $3 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ a $3 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ de cada metal con el fin de evaluar su determinación simultánea. Para esto se empleó un diseño central compuesto para tres factores (la

concentración de los tres metales), cada uno a 5 niveles de concentración que abarcan el rango dinámico de desempeño seleccionado (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Región experimental escogida en la determinación simultánea de los iones metálicos.

Variables Codificadas	Niveles				
	$-\beta$	-1	0	1	$+\beta$
DoE (mol/L)	3×10^{-5}	8.5×10^{-5}	1.65×10^{-4}	2.45×10^{-4}	3×10^{-4}
Pb (ppm)	6.22	17.56	34.19	50.82	62.16
Cd (ppm)	3.37	9.52	18.55	27.57	33.72
Hg (ppm)	6.02	17.00	33.10	49.20	60.18

Tabla 4.3. Matriz del diseño central compuesto usada para estudiar la determinación simultánea de los iones metálicos.

Experimento	Variables codificadas			Variables reales		
	[Pb]	[Cd]	[Hg]	[Pb]	[Cd]	[Hg]
1	0.0	0.0	0.0	34.188	18.546	33.099
2	0.0	0.0	0.0	34.188	18.546	33.099
3	0.0	0.0	0.0	34.188	18.546	33.099
4	0.0	0.0	0.0	34.188	18.546	33.099
5	0.0	0.0	0.0	34.188	18.546	33.099
6	0.0	0.0	0.0	34.188	18.546	33.099
7	1.0	-1.0	-1.0	50.818	9.525	16.999
8	0.0	0.0	1.682	34.188	18.546	60.18
9	1.0	1.0	-1.0	50.818	27.567	16.999
10	-1.0	1.0	1.0	17.558	27.567	49.199
11	-1.0	1.0	-1.0	17.558	27.567	16.999
12	0.0	1.682	0.0	34.188	33.72	33.099
13	1.0	1.0	1.0	50.818	27.567	49.199
14	-1.0	-1.0	-1.0	17.558	9.525	16.999
15	0.0	-1.682	0.0	34.188	3.372	33.099
16	-1.682	0.0	0.0	6.216	18.546	33.099
17	1.682	0.0	0.0	62.16	18.546	33.099
18	-1.0	-1.0	1.0	17.558	9.525	49.199
19	0.0	0.0	-1.682	34.188	18.546	6.018
20	1.0	-1.0	1.0	50.818	9.525	49.199

El número de experimentos fue determinado según la ecuación 3.1, en este caso particular, al tratarse de 3 variables a evaluar, ($k = 3$), el número de puntos centrales recomendados es 6, por lo cual el número total de experimentos es 20. Al tratarse del mismo diseño experimental (*central compuesto*)

empleado en la optimización de pH y concentración (Capítulo 3), los niveles intermedios de cada variable (-1, 0 y +1) se calcularon empleando las ecuaciones 3.2 a la 3.6.

La matriz de diseño se presenta en la tabla 4.3; cabe mencionar que se realizó un diseño experimental para cada cromóforo, empleando 0.68 mg de cromóforo, 62.5 mg de plastificante y 62.5 mg de polímero base. A partir de lo anterior, se prepararon 20 sensores con cada cromóforo tal como se describió en la sección 2.5, se sometieron a las disoluciones que contenían a los tres metales a diferente composición tal como lo indica la matriz de diseño experimental (tabla 4.2). El tiempo de agitación fue de 30 minutos y se midió su espectro de absorbancia visible antes y después de la agitación.

4.2. Resultados y discusión

4.2.1. Determinación del rango dinámico

Como se mencionó, el intervalo lineal de los sensores está determinado, según algunos autores, por el parámetro α , que relaciona la respuesta del sensor con la concentración de los iones metálicos. La figura 4.1 muestra los valores de α en función del logaritmo de la concentración para los tres metales, indicada en la tabla 4.1, cuando se empleó Ditizona (Figura 4.1 A) y PAN (figura 4.1B) como cromóforos.

Es de notar que, más allá del comportamiento individual de los iones metálicos frente a cada cromóforo, la región central de las curvas, donde se podría asumir una relación lineal de la absorbancia con la concentración, no es idéntica para cada sistema. Lo anterior va en acuerdo con la naturaleza del sensor que, al ser una película sólida, va a presentar fenómenos de luz como dispersión, radiación, etc. Según la teoría de la radiación de Maxwell, la interacción de la radiación y la materia se ve afectada por fenómenos de polarización de las moléculas, que a su vez depende del tamaño de las partículas involucradas.

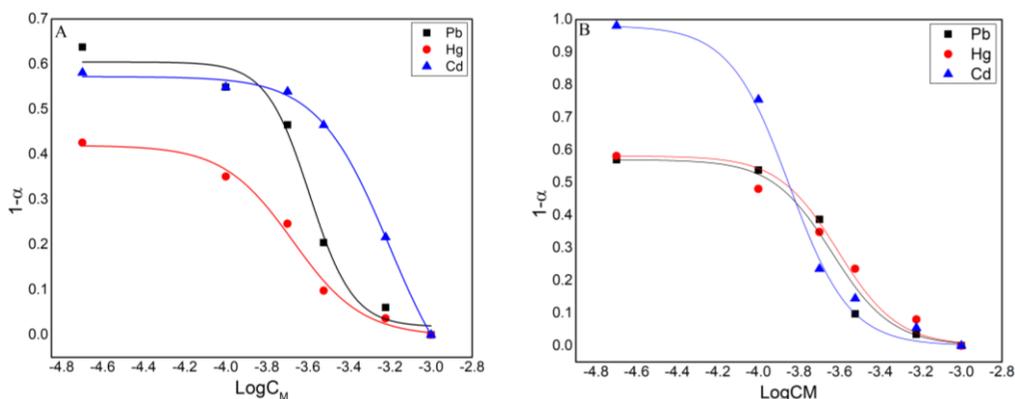


Figura 4.1. Respuesta de los sensores frente a diferentes concentraciones de iones metálicos, pH: 6.5. Ditizona (A); PAN (B)

Dentro de los fenómenos de dispersión que se pueden presentar de acuerdo con el tamaño de las partículas se encuentran el efecto Rayleigh, el efecto Rayleigh-Gans y el efecto Mie¹⁴¹, estos fenómenos pueden influir en el desempeño del sensor y por lo tanto afectar la relación de la señal analítica con la concentración del analito, llevando a considerar comportamientos no lineales al momento realizar la determinación.

4.2.2. Determinación simultánea de los iones metálicos

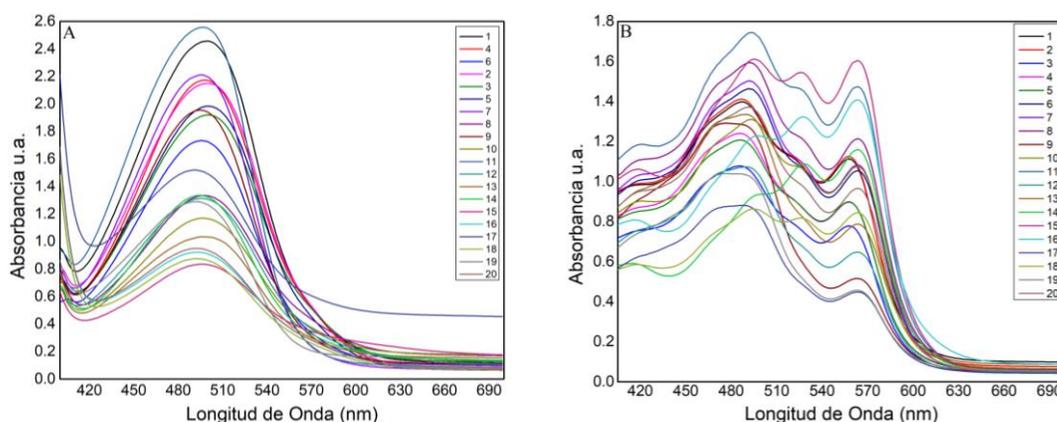


Figura 4.2. Espectros visibles de los sensores después de la complejación para los sensores preparados con A: Ditizona y B: PAN, empleando 0.68 mg de cromóforo, 62.5 mg de plastificante y 62.5 mg de polímero base, pH: 6.5.

De acuerdo con los resultados de la determinación del rango dinámico de los sensores, se decidió escoger un rango de concentraciones de $3 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ a $3 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ de cada metal. Como se mencionó en la sección 4.1.4., la determinación simultánea se realizó empleando nuevamente como herramienta de obtención de datos, un diseño experimental central compuesto. En las gráficas 4.2A y 4.2B se presentan los espectros después de la complejación para las membranas, empleando ditizona y PAN como cromóforos, respectivamente.

4.2.2.1. Descripción del conjunto de datos

Como matriz de datos se tienen dos conjuntos de espectros de 20 filas que corresponden, cada una a los 20 experimentos del diseño experimental central compuesto, cada uno con concentraciones diferentes de los tres metales, y 303 columnas que corresponden a las longitudes de onda de los espectros visibles de cada experimento (400 a 700 nm). En el caso de los sistemas empleando ditizona,

se realizó corrección de línea base y se empleó una región del espectro a partir de 430 nm hasta 700 nm.

Recordando que son dos conjuntos de datos debido a que se empleó ditizona y PAN como cromóforos de manera separada, por lo que, de igual manera, son analizados de manera separada.

Como se mencionó en la introducción del presente capítulo, debido al conocimiento previo de los sistemas, se conocen los componentes puros de la mezcla indicada en el diseño experimental, estos son los espectros individuales de cada metal (Figura 4.3). Estos espectros se utilizarán como estimadores iniciales en el análisis MCR.

Además, al tratarse de espectros visibles y concentraciones, se debe tener en consideración que por la naturaleza de estos datos no se permiten elementos negativos, por lo tanto, se aplica la restricción de no-negatividad.

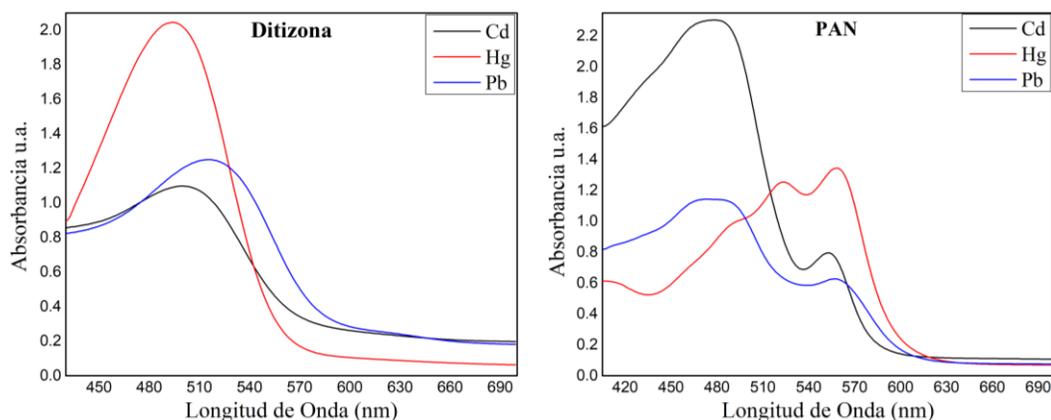


Figura 4.3. Espectros puros de los sistemas Ditizona (izquierda) y PAN (derecha), empleados como estimadores iniciales en el análisis MCR. $[M^{2+}]$: 1×10^{-3} mol/L, pH: 6.5.

La interfaz utilizada, así como la matriz de datos sobre la cual se hizo cada análisis, se presentan en anexos (A3.1).

4.2.2.2. Resultados empleando Ditizona como cromóforo

Una vez llevado a cabo el análisis MCR, se obtienen diferentes tipos de gráficas que dan cuenta tanto del número de componentes, como de la naturaleza de estos, y su relación con la matriz de datos inicial. La figura 4.4 muestra de lado izquierdo los perfiles de concentración, presentándose el perfil de cada factor estimado en el análisis, que en este caso fue 3 como se esperaba, para cada uno de los experimentos incluidos en el modelo MCR. En la gráfica de la derecha, se observan los espectros resueltos para cada componente hallado. Ambas gráficas se pueden correlacionar con las variables reales empleadas en el análisis; la gráfica de los perfiles de concentraciones es comparable con la matriz del diseño experimental que da cuentas de la concentración de cada metal en los 20

experimentos realizados y, por otro lado, la gráfica de los espectros resueltos puede ser comparada con los espectros de los componentes puros.

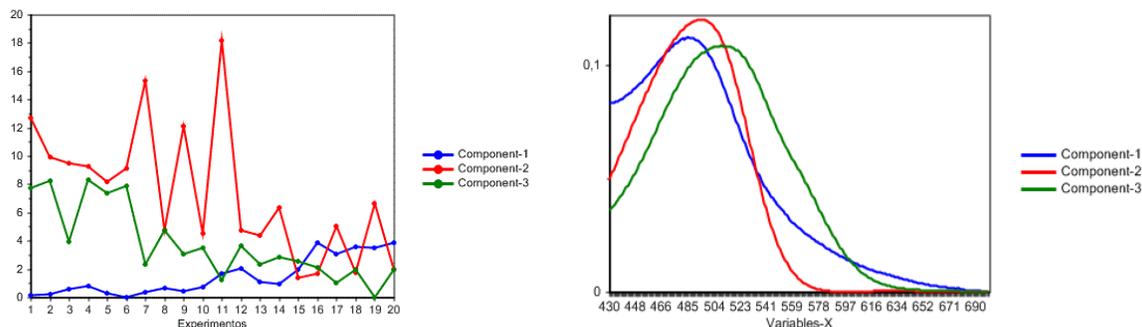


Figura 4.4. Gráfica de la concentración (izquierda) y espectros (derecha) de los componentes resueltos por MCR, para los sistemas Ditizona/Metales

Antes de analizar las concentraciones alcanzadas con la MCR, es pertinente comparar los perfiles de concentración puros y los espectros de los factores arrojados por la MCR. Para esto se normalizaron y se graficaron ambos conjuntos de espectros en la misma gráfica, con el fin de hacerlos comparables (figura 4.5), de esta forma se puede correlacionar a que metal se correlaciona cada uno de los componentes encontrados por el algoritmo. En la gráfica los espectros de las líneas sólidas corresponden a los espectros puros y las líneas punteadas a los componentes encontrados por el algoritmo. En este sentido, se puede observar que existe una similitud entre los perfiles de Cd, Hg y Pb con los componentes C1, C2 y C3 respectivamente.

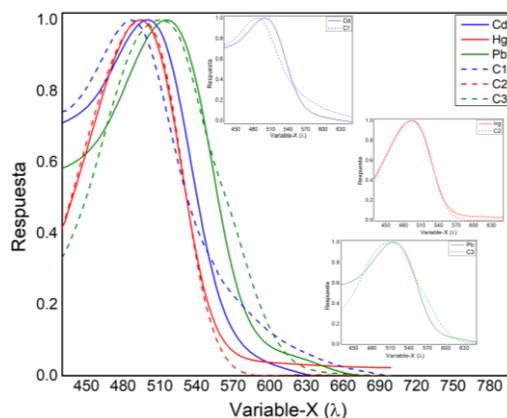


Figura 4.5. Comparación de los espectros visibles de los componentes puros y factores calculados mediante la MCR, para los sistemas Ditizona/Metales.

En las gráficas adjuntas a la figura 4.5 encontramos los perfiles individuales para observar la correlación entre los espectros puros y los teóricos. Aquí se puede observar que el algoritmo fue capaz

de diferenciar las contribuciones de los perfiles independientes sobre el conjunto de datos total, principalmente en los casos de Hg y Pb. Con respecto al cadmio se observa que, si bien hay una similitud en la forma del espectro, la longitud de onda máxima aparece corrida hacia longitudes de onda más bajas. Con la anterior comparación es posible observar que el algoritmo fue capaz de encontrar las contribuciones de los tres metales de manera individual sobre la matriz espectral de los datos originales, a partir de los cual es posible extraer información química referida a las concentraciones de los iones metálicos en el sensor.

Al analizar las concentraciones arrojadas por el análisis MCR, es preciso mencionar que estas concentraciones están en unidades relativas, es decir, no corresponden a las concentraciones reales, por lo que previamente se debe realizar una correlación entre las concentraciones indicadas por el DoE (concentraciones iniciales de los metales en disolución), con las concentraciones arrojadas por el algoritmo, que corresponden a las concentraciones de los metales en los sensores, esto anterior considerando que el análisis MCR está alimentado con los espectros de los sensores. Por lo cual es necesario considerar el volumen de la membrana con el fin de corregir la concentración hallada, y una vez realizada esta corrección es posible calcular la concentración relativa en cada experimento considerando que las concentraciones iniciales en el DoE corresponden al 100 % de las concentraciones de los metales para cada experimento.

De esta manera, se graficó la concentración de los componentes encontrados en el análisis, posterior a su corrección y correlación, con respecto a las concentraciones originales indicadas por el DoE, para cada experimento, figura 4.6.

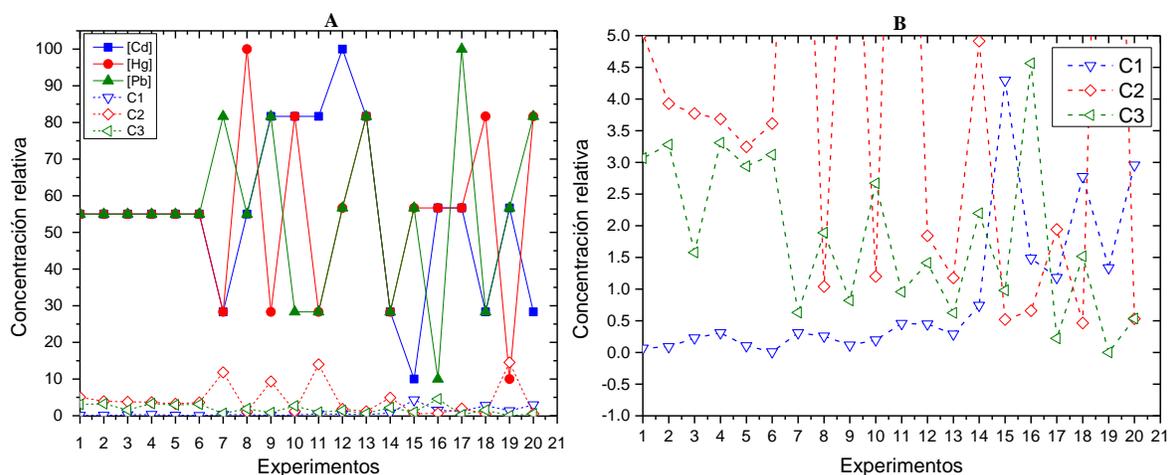


Figura 4.6. A: Comparación de las concentraciones empleadas en DoE y las concentraciones calculadas luego de la MCR, para los sistemas Ditizona/Metales. B: Ampliación eje y, de -1.0 a 5.0.

En la figura 4.6 se observan las concentraciones iniciales indicadas por el DoE, que corresponden a las líneas sólidas y las concentraciones encontradas por el algoritmo para cada componente individual, que corresponden a las líneas puntuadas. Aquí se observa que las concentraciones alcanzadas por el algoritmo, ya corregidas, son más pequeñas en comparación a las concentraciones iniciales indicadas por el DoE, recordando que estas últimas corresponden a las concentraciones iniciales en la disolución a la que se expuso cada sensor. Por lo tanto, las concentraciones indicadas por el algoritmo se pueden relacionar con la concentración que hay de cada metal en los sensores, y para efectos del presente trabajo reflejan una buena aproximación hacia la determinación simultánea de estos iones, ya que, a pesar de desconocer la cantidad de metal atrapado en la membrana, el modelo hace posible su diferenciación.

4.2.2.3. Resultados empleando PAN como cromóforo

Un análisis similar se llevó a cabo para el sistema metales/PAN. Nuevamente las gráficas encontradas a través del análisis MCR revelan que la matriz original de los datos (espectros visibles), se pueden descomponer en 3 factores, tal como se observa en la figura 4.7, donde nuevamente se presenta en la gráfica de la izquierda los perfiles de concentración y en la gráfica de la derecha los espectros resueltos para cada componente hallado.

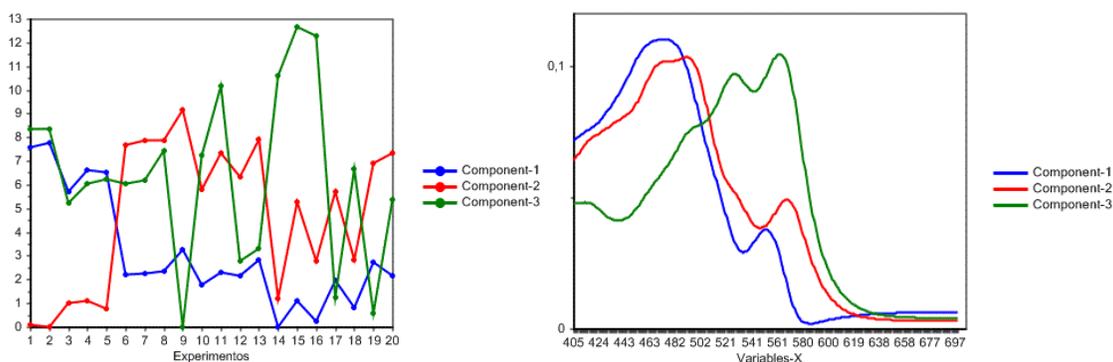


Figura 4.7. Gráfica de la concentración (izquierda) y espectros (derecha) de los componentes resueltos por MCR, para los sistemas PAN/Metales.

Una vez más, con el fin de comparar los perfiles de concentración puros y los espectros de los factores arrojados por la MCR, se normalizaron y se graficaron ambos conjuntos de espectros en la misma gráfica, con el fin de hacerlos comparables (figura 4.8), correlacionando cada metal con cada uno de los componentes encontrados por el logaritmo. En la gráfica los espectros de las líneas sólidas corresponden a los espectros puros y las líneas punteadas a los componentes encontrados por el algoritmo. En este sentido, se puede observar que existe una similitud entre los perfiles de Cd, Hg y Pb con los componentes C1, C3 y C2 respectivamente.

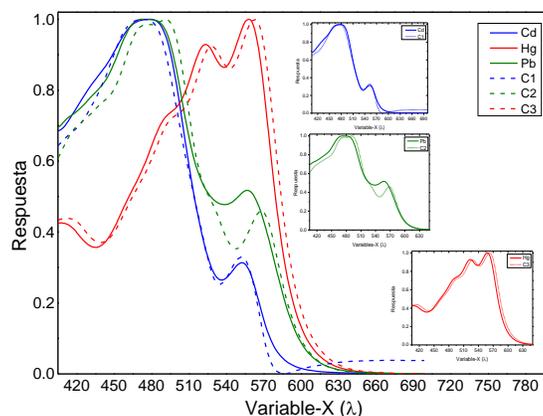


Figura 4.8. Comparación de los espectros visibles de los componentes puros y factores calculados mediante la MCR, para los sistemas PAN/Metales.

En las gráficas adjuntas a la figura 4.8, se presenta la correlación de cada componente con los perfiles de los metales puros, de forma individual, observando una buena correlación para los sistemas PAN/Cd y PAN/Hg, no así para el sistema PAN/Pb, donde se observa que la banda debida al complejo se encuentra ligeramente movida hacia mayores longitudes de onda, con una diferencia de 10 nm, aproximadamente. No obstante, una vez más es posible observar que el algoritmo fue capaz de encontrar las contribuciones de los tres metales de manera individual sobre la matriz espectral de los datos originales, a partir de los cual es posible, nuevamente, extraer información química referida a las concentraciones de los iones metálicos en el sensor, cuando se emplea PAN como cromóforo.

Nuevamente, es posible obtener información respecto a la concentración de los metales en el sensor empleando las concentraciones calculadas por el algoritmo, considerando el volumen de la membrana y correlacionando estas concentraciones respecto a las indicadas por el DoE. De esta manera, se obtuvo la gráfica 4.9, donde se observan las concentraciones de los componentes encontrados en el análisis, posterior a su corrección y correlación, con respecto a las concentraciones originales indicadas por el DoE, para cada experimento.

Para este sistema, también se observa que las concentraciones alcanzadas por el algoritmo son mucho menores que las concentraciones iniciales, lo cual es indicativo de buena aproximación hacia la determinación simultánea de estos iones, ya que, de manera similar al sistema Ditizona/Metales, a pesar de la poca cantidad de metal atrapado en la membrana, el modelo hace posible su diferenciación.

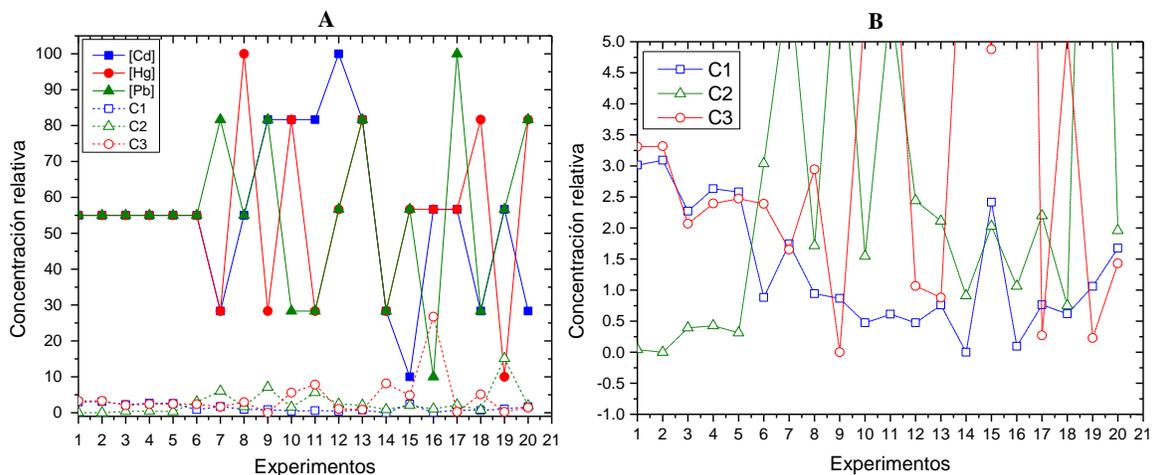


Figura 4.9. A: Comparación de las concentraciones empleadas en DoE y las concentraciones calculadas luego de la MCR, para los sistemas PAN/Metales. B: Ampliación eje y, de -1.0 a 5.0.

Conclusiones

Con base a la congruencia entre los datos experimentales y los teóricos, es posible concluir que a través del análisis MCR es posible determinar el número de componentes presentes en un sistema químico, haciendo posible además la identificación de los 3 metales presentes en cada experimento a través del perfil de los componentes puros y sus correspondientes contribuciones espectrales. A pesar de ser una primera aproximación en este tipo de análisis y considerando la naturaleza de los datos, es decir espectros visibles de una matriz sólida, se logró determinar cada metal de manera simultánea, lo cual permite comprender de manera más amplia el comportamiento de cada sistema con el fin de seguir modificando el modelo en vías a la determinación de dichos metales en matrices más complejas.

”

Lo que más amo de la ciencia es que a medida que aprendes, realmente no obtienes respuestas, solo tienes mejores preguntas.

— John Green

Se logró implementar el uso de membranas poliméricas de inclusión como sensores óptico-químicos en la determinación cualitativa de iones metálicos de manera simultánea. El empleo de herramientas quimiométricas a lo largo de la planeación y ejecución del trabajo permitió obtener las condiciones adecuadas para lograr un funcionamiento adecuado de los sensores. En la etapa inicial del trabajo (capítulo 1) se evidenció que el uso de un diseño de experimentos constituyó un pilar fundamental en la optimización de la composición y tiempo de las membranas, encontrando sensores fáciles de preparar y de implementar, lo cual dio un sólido punto de inicio en la determinación de los parámetros de desempeño (capítulo 2), que dio como resultado sensores reproducibles, estables y reversibles, excepto para el sistema Dz-Hg, el cual no es reversible dada su alta estabilidad como complejo. Además, se determinaron condiciones de pH 6.0 y concentración de las disoluciones metálicas entre 1×10^{-4} mol/L y 2×10^{-5} mol/L, a las cuales los sensores funcionan de manera satisfactoria. Como parte cúlmine del trabajo, y conociendo las condiciones óptimas en la determinación individual de los iones, se encontraron las condiciones experimentales iniciales en la determinación cualitativa de los iones metálicos de manera simultánea (capítulo 3), objetivo que se logró de manera satisfactoria mediante el uso de otra herramienta quimiométrica como lo es la resolución multivariada de curvas, estableciendo una primera aproximación de lo que sería la cuantificación de los iones metálicos trabajados.

La tabla 5.1 resume las condiciones experimentales alcanzadas en el presente trabajo, que representan un excelente punto de partida para una eventual aplicación de estos sensores, destacando ventajas como bajo costo, fácil preparación e implementación, y la posibilidad de ser reutilizados, lo cual minimiza el impacto ambiental.

Tabla 5.1. Resumen de las condiciones experimentales en la determinación de los iones metálicos empleando PIMs como sensores óptico-químicos.

Sistema	Optimización inicial				Reproducibilidad		Estabilidad (13 días)	Reversibilidad	pH	Concentración mol/L	Determinación simultánea
	Cromóforo	Plastificante	TAC	Tiempo	Sin complejar	Complejada					
PAN	<i>Pb</i>	0.68 mg	62.5 mg	62.5 mg	35 min	Sí	No	Sí	Sí, en HCl 0.1 mol/L	2x10 ⁻⁵	Lograda, empleando MCR-ALS con restricción de no-negatividad
	<i>Hg</i>	0.53 mg	34.36 mg	100 mg	50 min	Sí	No	No	Sí, en EDTA 0.1 mol/L	1x10 ⁻⁴	
	<i>Cd</i>	1.0 mg	62.5 mg	62.5 mg	35 min	Sí	No	Sí	Sí, en HCl 0.1 mol/L	1x10 ⁻⁴	
Dz	<i>Pb</i>	0.68 mg	71.86 mg	100 mg	65 min	Sí	No	Sí	Sí, en ambas condiciones	2x10 ⁻⁵	
	<i>Hg</i>	0.68 mg	71.86 mg	100 mg	65 min	Sí	No	Sí	No	2x10 ⁻⁴	
	<i>Cd</i>	0.68 mg	62.5 mg	62.5 mg	35 min	Sí	Sí	Sí	Sí, en HCl 0.1 mol/L	2x10 ⁻⁴	

1. Almeida, M. I. G. S., Cattrall, R. W. & Kolev, S. D. Polymer inclusion membranes (PIMs) in chemical analysis - A review. *Anal. Chim. Acta* **987**, 1–14 (2017).
2. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. & Sutton, D. J. *Molecular, clinical and environmental toxicology Volume 3: Environmental Toxicology. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* vol. 101 (2012).
3. Kuswandi, B., Nitti, F., Almeida, M. I. G. S. & Kolev, S. D. Water monitoring using polymer inclusion membranes: a review. *Environ. Chem. Lett.* **18**, 129–150 (2020).
4. Ratnarathorn, N., Chailapakul, O., Henry, C. S. & Dungchai, W. Simple silver nanoparticle colorimetric sensing for copper by paper-based devices. *Talanta* **99**, 552–557 (2012).
5. Oehme, I. & Wolfbeis, O. S. Optical sensors for determination of heavy metal ions. *Microchim. Acta* **126**, 177–192 (1997).
6. Hisamoto, H. & Suzuki, K. Ion-selective optodes: Current developments and future prospects. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **18**, 513–524 (1999).
7. Aziz, A. A. A., Mohammed, S. F. & El Gamel, M. M. Development of an optode for detection of trace amounts of Hg²⁺ in different real samples based on immobilization of novel tetradentate schiff bases bearing two thiol groups in PVC membrane. *J. Fluoresc.* **24**, 859–874 (2014).
8. Almeida, M. I. G. S., Jayawardane, B. M., Kolev, S. D. & McKelvie, I. D. Developments of microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) for water analysis: A review. *Talanta* **177**, 176–190 (2018).
9. Andreas Luch. *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*. (2012).
10. Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B. & Beeregowda, K. N. Toxicity , mechanism and health effects of some heavy metals. **7**, 60–72 (2014).

11. Jan, A. T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A. & Choi, I. Heavy Metals and Human Health : Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants. 29592–29630 (2015) doi:10.3390/ijms161226183.
12. Alabyadh, Mokhtar, Al-qadasy MKO, Babaqi AS, A.-A. M. and A. A. The Effects of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic on Fish and Seawater in Red Sea and the Gulf of Aden at Three Different Locations in Yemen. *SF J. Pharm. Anal. Chem.* **1**, 0–13 (2018).
13. Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. NOM-001-SEMARNAR-2021 LÍMITES DE CONTAMINANTES EN DESCARGAS DE AGUAS. *D. Of. la Fed.* 6 (2021).
14. Secretaria de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación* (2021).
15. Environmental Agency Protection. National Primary Drinking Water Regulations. (2009).
16. Goyer, R. A. Lead Toxicity : Current Concerns. **100**, 177–187 (2000).
17. Goldman, L. R., Schlag, R. D., Haan, M. & Kizer, K. W. Preventing lead poisoning in children. *West. J. Med.* **152**, 289–290 (1990).
18. Abadin, H. *et al.* Toxicological profile for lead. 582 (2020).
19. Kaul, B., Sandhu, R. S., Depratt, C. & Reyes, F. Follow-Up Screening of Lead-Poisoned Children Near an Auto Battery Recycling Plant, Haina, Dominican Republic. **107**, 917–920 (1999).
20. Flora, S. J. S., Mittal, M. & Mehta, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* **128**, 501–523 (2008).
21. McGeer, J. C., Niyogi, S. & Scott Smith, D. Cadmium. *Fish Physiol.* **31**, 125–184 (2011).
22. OSPAR Commission. Hazardous Substances Series Cadmium. **2002**, (2002).
23. EPA. Cadmium compounds hazard Summary. *Technol. Transf. Netw. Air Toxics Web Site* (2000).
24. Stohs, S. J. & Bagchi, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic.*

- Biol. Med.* **18**, 321–336 (1995).
25. Clarkson, T. W., Magos, L. & Myers, G. J. The Toxicology of Mercury — Current Exposures and Clinical Manifestations. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1731–1737 (2003).
 26. Guzzi, G. P. & La Porta, C. A. M. Molecular mechanisms triggered by mercury. *Toxicology* **244**, 1–12 (2008).
 27. Tchounwou, P. B., Ayensu, W. K., Ninashvili, N. & Sutton, D. Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health. *Environ. Toxicol.* **18**, 149–175 (2003).
 28. Dopp, E., Hartmann, L. M., Florea, A. M., Rettenmeier, A. W. & Hirner, A. V. *Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal(loid) compounds. Critical Reviews in Toxicology* vol. 34 (2004).
 29. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. & Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* **160**, 1–40 (2006).
 30. Alothman, Z. A., Yilmaz, E., Habila, M., Shabaka, A. & Soylak, M. Ligandless temperature-controlled ionic liquid-phase microextraction of lead(II) ion prior to its determination by FAAS. *Microchim. Acta* **180**, 669–674 (2013).
 31. Erdem, A. & Eroğlu, A. E. Speciation and preconcentration of inorganic antimony in waters by Duolite GT-73 microcolumn and determination by segmented flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometry (SFI-HGAAS). *Talanta* **68**, 86–92 (2005).
 32. Zeini Jahromi, E., Bidari, A., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R. & Jamali, M. R. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry. Ultra trace determination of cadmium in water samples. *Anal. Chim. Acta* **585**, 305–311 (2007).
 33. Saitoh, T. *et al.* Polymer-mediated extraction of 8-quinolinolato metal chelates for the determination of metal ions in water with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* **46**, 541–550 (1998).
 34. Sturgeon, R. E., Berman, S. S., Desaulniers, A. & Russell, D. S. Pre-concentration of trace metals from sea-water for determination by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry. *Talanta* **27**, 85–94 (1980).

35. Pal, P. & Banat, F. *Removal of metal ions and heat stable salts from industrial lean amine solvent using polymeric hydrogels from gas sweetening unit. Proceedings of the 4th International Gas Processing Symposium* (Elsevier, 2015). doi:10.1016/b978-0-444-63461-0.50018-3.
36. Sitko, R. *et al.* Green Approach for Ultratrace Determination of Divalent Metal Ions and Arsenic Species Using Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry and Mercapto-Modified Graphene Oxide Nanosheets as a Novel Adsorbent. *Anal. Chem.* **87**, 3535–3542 (2015).
37. Kocot, K. *et al.* Dispersive micro solid-phase extraction using multiwalled carbon nanotubes combined with portable total-reflection X-ray fluorescence spectrometry for the determination of trace amounts of Pb and Cd in water samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **28**, 736–742 (2013).
38. Barón-Jaimez, J., Joya, M. R. & Barba-Ortega, J. Anodic stripping voltammetry - ASV for determination of heavy metals. *J. Phys. Conf. Ser.* **466**, (2013).
39. Spichiger-keller, U. E. *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications.* (1998). doi:10.1002/9783527612284.
40. Kene, A. P. & Choudhury, S. K. Analytical modeling of tool health monitoring system using multiple sensor data fusion approach in hard machining. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **145**, 118–129 (2019).
41. Beitollahi, H. *et al.* A novel electrochemical sensor based on graphene nanosheets and ethyl 2-(4-ferrocenyl-[1,2,3]triazol-1-yl) acetate for electrocatalytic oxidation of cysteine and tyrosine. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **152**, 107302 (2020).
42. Ullah, N., Mansha, M., Khan, I. & Qurashi, A. Nanomaterial-based optical chemical sensors for the detection of heavy metals in water: Recent advances and challenges. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **100**, 155–166 (2018).
43. Abdul, S. Application of Sensors in the Detection of Heavy Metals Ions in the Environment. **3**, 1–2 (2016).
44. Qazi, H., Mohammad, A. & Akram, M. Recent Progress in Optical Chemical Sensors. *Sensors* **12**, 16522–16556 (2012).
45. Ge, Y., Zhu, J., Zhao, W. & Qin, Y. Ion-selective optodes based on near infrared fluorescent

- chromoionophores for pH and metal ion measurements. *Sensors Actuators, B Chem.* **166–167**, 480–484 (2012).
46. Thakur, N. *et al.* Development of a visual optode sensor for onsite determination of Hg(II). *Sensors Actuators, B Chem.* **211**, 346–353 (2015).
47. Wolfbeis, O. S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* **78**, 3859–3873 (2006).
48. McDonagh, C., Burke, C. S. & MacCraith, B. D. Optical chemical sensors. *Chem. Rev.* **108**, 400–422 (2008).
49. Parson, W. W. *Modern Optical Spectroscopy. Modern Optical Spectroscopy* (2015). doi:10.1007/978-3-662-46777-0.
50. Bracco, G. & Holst, B. Surface science techniques. in *Springer Series in Surface Sciences* vol. 51 (2013).
51. Korent Urek, Š., Francič, N., Turel, M. & Lobnik, A. Sensing heavy metals using mesoporous-based optical chemical sensors. *J. Nanomater.* **2013**, (2013).
52. Mulder, M. *Basic Principles of Membrane Technology. Kluwer Academic Publishers* vol. 72 (1996).
53. Parhi, P. K. Supported Liquid Membrane Principle and Its Practices: A Short Review, Supported Liquid Membrane Principle and Its Practices: A Short Review. *J. Chem. J. Chem.* **2013, 2013**, e618236 (2012).
54. Guerrero, E. R. de S. M. Extracción de Cationes Metálicos de Medios Concentrados en Ácido con Membranas Líquidas Soportadas. (Universidad Nacional Autónoma de México, 1998).
55. Nghiem, L. D. *et al.* Extraction and transport of metal ions and small organic compounds using polymer inclusion membranes (PIMs). *J. Memb. Sci.* **281**, 7–41 (2006).
56. Almeida, M. I. G. S., Cattrall, R. W. & Kolev, S. D. Recent trends in extraction and transport of metal ions using polymer inclusion membranes (PIMs). *J. Memb. Sci.* **415–416**, 9–23 (2012).
57. Rodríguez de San Miguel, E., Aguilar, J. C. & de Gyves, J. Structural effects on metal ion migration across polymer inclusion membranes: Dependence of transport profiles on nature

- of active plasticizer. *J. Memb. Sci.* **307**, 105–116 (2008).
58. Scindia, Y. M., Pandey, A. K. & Reddy, A. V. R. Coupled-diffusion transport of Cr(VI) across anion-exchange membranes prepared by physical and chemical immobilization methods. *J. Memb. Sci.* **249**, 143–152 (2005).
 59. Bakker, E., Bühlmann, P. & Pretsch, E. Carrier-based ion-selective electrodes and bulk optodes. 1. General characteristics. *Chem. Rev.* **97**, 3083–3132 (1997).
 60. Safari, Z., Gholivand, M. B. & Hosseinzadeh, L. Spectrophotometric study of complex formations between 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN) and some metal ions in organic solvents and the determination of thermodynamic parameters. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **78**, 1606–1610 (2011).
 61. Cheng, K. L. & Bray, R. H. 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol as a Possible Analytical Reagent. *Anal. Chem.* **27**, 782–785 (1955).
 62. Shamsipur, M. *et al.* Novel fluorimetric bulk optode membrane based on 5,8-bis((5'-chloro-8'-hydroxy-7'-quinolinyl)methyl)-2,11-dithia-5,8-diaza-2,6-pyridinophane for selective detection of lead(II) ions. *Talanta* **80**, 2023–2033 (2010).
 63. Coo, L. D., Cardwell, T. J., Cattrall, R. W. & Kolev, S. D. Spectrophotometric study of the solubility and the protolytic properties of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol in different ethanol-water solutions. *Anal. Chim. Acta* **360**, 153–159 (1998).
 64. Dines, T. J. & Wu, H. Surface-enhanced resonance Raman spectroscopic studies of the Cd(II) and Hg(II) complexes of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol adsorbed on silver sol. *J. Phys. Chem. B* **108**, 13456–13467 (2004).
 65. Irving, H. M. N. H. The Analytical Applications Of Dithizone. *C R C Crit. Rev. Anal. Chem.* **8**, 321–366 (1980).
 66. Tuzen, M. & Soylak, M. Evaluation of metal levels of drinking waters from the Tokat-black sea region of Turkey. *Polish J. Environ. Stud.* **15**, 915–919 (2006).
 67. Thomas, F. G. Duncan and Thomas: 569. Metal Dithixone Complexes of Mercury and Cobalt. **111**, 2814–2824 (1957).
 68. Romberg, B. & Müller, H. Photometric screening-test for heavy metals under flow injection

- conditions using extractive determination with dithizone. *Anal. Chim. Acta* **353**, 165–172 (1997).
69. Jamshid L. Manzoori*, M. H. S. and A. M. H. S. Determination of lead in different samples by atomic absorption spectrometry after preconcentration with dithizone immobilized on surfactant-coated alumina. *J. Anal. At. Spectrom.* **13**, 305–308 (1998).
 70. L. A. Ntoi, L. Multiple Chromisms Associated with Dithizone. 104 (2016).
 71. Ensafi, A. A., Meghdadi, S. & Fooladgar, E. Development of a new selective optical sensor for Cd(II) ions based on 4-hydroxy salophen. *IEEE Sens. J.* **8**, 1794–1800 (2008).
 72. Ensafi, A. A. & Isfahani, Z. N. A simple optical sensor for cadmium ions assay in water samples using spectrophotometry. *J. Anal. Chem.* **66**, 151–157 (2011).
 73. Klimant, I. & Otto, M. A fiber optical sensor for heavy metal ions based on immobilized xylenol orange. *Microchim. Acta* **108**, 11–17 (1992).
 74. Aksuner, N. Development of a new fluorescent sensor based on a triazolo-thiadiazin derivative immobilized in polyvinyl chloride membrane for sensitive detection of lead(II) ions. *Sensors Actuators, B Chem.* **157**, 162–168 (2011).
 75. Turull, M., Elias, G., Fontàs, C. & Díez, S. Exploring new DGT samplers containing a polymer inclusion membrane for mercury monitoring. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24**, 10919–10928 (2017).
 76. Pont, N., Salvadó, V. & Fontàs, C. Selective transport and removal of Cd from chloride solutions by polymer inclusion membranes. *J. Memb. Sci.* **318**, 340–345 (2008).
 77. Koulouridakis, P. E. & Kallithrakas-Kontos, N. G. Selective mercury determination after membrane complexation and total reflection X-ray fluorescence analysis. *Anal. Chem.* **76**, 4315–4319 (2004).
 78. Ensafi, A. A., Far, A. K. & Meghdadi, S. Highly selective optical-sensing film for lead(II) determination in water samples. *J. Hazard. Mater.* **172**, 1069–1075 (2009).
 79. Minhas, F. T., Memon, S. & Bhangar, M. I. Hg(II) transport through modified supported liquid membrane. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* **50**, 215–220 (2013).
 80. Oberta, A., Wasilewski, J. & Wódzki, R. Structure and transport properties of polymer

- inclusion membranes for Pb(II) separation. *Desalination* **271**, 132–138 (2011).
81. Sedghi, R., Heidari, B., Javadi, H. & Sayyari, N. Design and synthesis of colorimetric sensor based on dithizone@TiO₂/poly (tert-butyl acrylate-acrylic acid) nanocomposite for fast visual detection of mercury, lead and cadmium ions in aqueous media. *Environ. Nanotechnology, Monit. Manag.* **18**, 100670 (2022).
 82. Meng, X. *et al.* Optical sensing membrane for determination of trace cadmium(II), zinc(II) and copper(II) based on immobilization of 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol on polymer inclusion membrane. *Microchem. J.* **162**, 105767 (2021).
 83. Safavi, A. & Bagheri, M. Design and characteristics of a mercury (II) optode based on immobilization of dithizone on a triacetylcellulose membrane. *Sensors Actuators, B Chem.* **99**, 608–612 (2004).
 84. Sanchez-Pedreño, C., Ortuño, J. A., Albero, M. I., Garcia, M. S. & Valero, M. V. Development of a new bulk optode membrane for the determination of mercury(II). *Anal. Chim. Acta* **414**, 195–203 (2000).
 85. Alizadeh, N., Moemeni, A. & Shamsipur, M. Poly(vinyl chloride)-membrane ion-selective bulk optode based on 1,10-dibenzyl-1,10-diaza-18-crown-6 and 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol for Cu²⁺ and Pb²⁺ ions. *Anal. Chim. Acta* **464**, 187–196 (2002).
 86. Zargoosh, K. & Babadi, F. F. Highly selective and sensitive optical sensor for determination of Pb²⁺ and Hg²⁺ ions based on the covalent immobilization of dithizone on agarose membrane. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **137**, 105–110 (2015).
 87. Spichiger-Keller, U. E. Ion- and substrate-selective optode membranes and optical detection modes. *Sensors Actuators B Chem.* **38**, 68–77 (1997).
 88. Seiler, K. & Simon, W. Theoretical aspects of bulk optode membranes. *Anal. Chim. Acta* **266**, 73–87 (1992).
 89. B W Budesinsky, M. S. STABILITY CONSTANTS OF SOME METAL DITHIZONATES. *Talanta* **20**, 228–232 (1973).
 90. Santos, M. C. *et al.* Chemometrics in analytical chemistry - An overview of applications from 2014 to 2018. *Eclat. Quim.* **44**, 11–25 (2019).

91. Olsson, I.-M. *Experimental Designs at the Crossroads of Drug Discovery*. (Umeå University, 2006).
92. Hopke, P. K. The evolution of chemometrics. *Anal. Chim. Acta* **500**, 365–377 (2003).
93. Wold, S. Special Feature on Chemometrics Chemometrics ; what do we mean with it , and what do we want from it ? 32–38 (2012).
94. Kumar, N., Bansal, A., Sarma, G. S. & Rawal, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. *Talanta* **123**, 186–199 (2014).
95. Raymond H. Myers, Douglas C. Montgomery, C. M. A.-C. Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. in 856 (2016).
96. Montgomery, D. C. *Design and Analysis of Experiments*. (2012). doi:10.1016/S0141-3910(01)00005-2.
97. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. & Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965–977 (2008).
98. Kuehl, R. O. Principios estadísticos de diseño.
99. Box, G. E. P., Hunter, J. S. & Hunter, W. G. *Statistics for Experimenters. Design, Innovation, and Discovery*. (2005).
100. Sankha Bhattacharya. Central Composite Design for Response Surface Methodology and Its Application in Pharmacy. in *Response Surface Methodology in Engineering Science design* 13 (2016).
101. Souza, A. S., Dos Santos, W. N. L. & Ferreira, S. L. C. Application of Box-Behnken design in the optimisation of an on-line pre-concentration system using knotted reactor for cadmium determination by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **60**, 737–742 (2005).
102. Ferreira, S. L. C., Dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., Neto, B. B. & Bosque-Sendra, J. M. Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry - Review. *Talanta* **63**, 1061–1067 (2004).
103. Rodríguez de San Miguel, E., Liu*, J., Mayer, P. & Jönsson, J. Å. Multivariate Analysis of

- Selected Metal Ion Transport through a Hollow-Fiber Supported Liquid Membrane Device used for Passive Sampling Monitoring. *Solvent Extr. Ion Exch.* **26**, 602–623 (2008).
104. Yetilmezsoy, K., Demirel, S. & Vanderbei, R. J. Response surface modeling of Pb(II) removal from aqueous solution by Pistacia vera L.: Box-Behnken experimental design. *J. Hazard. Mater.* **171**, 551–562 (2009).
 105. Hu, Y. & Massart, D. L. Uniform shell designs for optimization in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **485**, 311–323 (1989).
 106. Trabelsi, S., Oturan, N., Bellakhal, N. & Oturan, M. A. Application of doehlert matrix to determine the optimal conditions for landfill leachate treatment by electro-fenton process. *J. Mater. Environ. Sci.* **3**, 426–433 (2012).
 107. Derringer, G. & Suich, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* **12**, 214–219 (1980).
 108. STATGRAPHICS. Diseño de Experimentos - Optimización de Múltiples respuestas. *Manual del Usuario. StatPoint, Inc* 1–16 at <http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/DDE - Optimizacion de Multiples Respuestas.pdf> (2006).
 109. Jolliffe, I. T. & Cadima, J. Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **374**, (2016).
 110. Massart, D. L. *et al.* Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A. in *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A.* (ed. Elsevier) vol. 20 701–738 (2003).
 111. Ngarisan, N. I., Ngah, C. W. Z. C. W., Ahmad, M. & Kuswandi, B. Optimization of polymer inclusion membranes (PIMs) preparation for immobilization of Chrome Azurol S for optical sensing of aluminum(III). *Sensors Actuators, B Chem.* **203**, 465–470 (2014).
 112. Jayawardane, B. M., Coo, L. D. L. C., Cattrall, R. W. & Kolev, S. D. The use of a polymer inclusion membrane in a paper-based sensor for the selective determination of Cu(II). *Anal. Chim. Acta* **803**, 106–112 (2013).
 113. Rezaei, B., Hadadzadeh, H. & Azimi, A. Fabrication of an optical sensor based on the immobilization of qsal on the plasticized PVC membrane for the determination of copper(II). *J. Anal. Chem.* **67**, 687–693 (2012).

114. Vuković, J., Avidad, M. A. & Capitán-Vallvey, L. F. Characterization of disposable optical sensors for heavy metal determination. *Talanta* **94**, 123–132 (2012).
115. Abdel Aziz, A. A. A novel highly sensitive and selective optical sensor based on a symmetric tetradentate Schiff-base embedded in PVC polymeric film for determination of Zn²⁺ ion in real samples. *J. Lumin.* **143**, 663–669 (2013).
116. Kalyan, Y. *et al.* Membrane optode for mercury(II) determination in aqueous samples. *J. Hazard. Mater.* **166**, 377–382 (2009).
117. Abdelaal, M. Y., Sobahi, T. R. & El-Shishtawy, R. M. Chromophoric thin film based on cellulose triacetate blends for sensing metal ions. *Comptes Rendus Chim.* **17**, 557–562 (2014).
118. Almeida, M. I. G. S., Cattrall, R. W. & Kolev, S. D. Polymer inclusion membranes (PIMs) in chemical analysis - A review. *Anal. Chim. Acta* **987**, 1–14 (2017).
119. Tharakeswar, Y., Kalyan, Y., Gangadhar, B., Kumar, K. S. & Naidu, G. R. Optical Chemical Sensor for Screening Cadmium (II) in Natural Waters. *J. Sens. Technol.* **02**, 68–74 (2012).
120. Tavallali, H., Shaabanpur, E. & Vahdati, P. A highly selective optode for determination of Hg (II) by a modified immobilization of indigo carmine on a triacetylcellulose membrane. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **89**, 216–221 (2012).
121. Casanueva-Marenco, M. J., Díaz-de-Alba, M., Herrera-Armario, A., Galindo-Riaño, M. D. & Granado-Castro, M. D. Design and optimization of a single-use optical sensor based on a polymer inclusion membrane for zinc determination in drinks, food supplement and foot health care products. *Mater. Sci. Eng. C* **110**, 110680 (2020).
122. Neill, S. O. *et al.* Ion-selective optode membranes using 9- (4-diethylamino-2-octadecanoatestyryl) -acridine acidochromic dye. *Anal. Chim. Acta* **398**, 1–11 (1999).
123. G.K., M. S., Rounaghi, G. H. & Chamsaz, M. A selective and sensitive optode for determination of Hg²⁺ ion based on covalent immobilization of thiazole yellow on triacetyl cellulose films. *Sensors Actuators, B Chem.* **256**, 968–975 (2018).
124. Pourbasheer, E., Morsali, S., Azari, Z., Karimi, M. A. & Ganjali, M. R. Design of a novel optical sensor for determination of trace amounts of copper by UV–visible spectrophotometry in real samples. *Appl. Organomet. Chem.* **32**, 1–8 (2018).

125. Box, G. E. P. & Hunter, J. S. Multi-Factor Experimental Designs for Exploring Response Surfaces. *Ann. Math. Stat.* **28**, 195–241 (1957).
126. Dean, J. A. *LANGE'S HANDBOOK OF CHEMISTRY*. McGraw-Hill, Inc (1999).
127. Alberti, G., Zanoni, C., Magnaghi, L. R. & Biesuz, R. Low-cost , disposable colourimetric sensors for metal ions detection. (2020).
128. Duarte, K. *et al.* Disposable sensors for environmental monitoring of lead, cadmium and mercury. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **64**, 183–190 (2015).
129. Sharma, M. K., Sinhababu, S., Mukherjee, G., Rajaraman, G. & Nagendran, S. A cationic aluminium complex: an efficient mononuclear main-group catalyst for the cyanosilylation of carbonyl compounds. *Dalt. Trans.* **46**, 7672–7676 (2017).
130. Khiari, L., Karam, A., Joseph, C. & Hebert, M. Concentrations of some metallic trace elements in twelve sludge incineration ashes. *Int. Sci. Index Conf. Proc.* **14**, 6–8 (2016).
131. De Juan, A., Jaumot, J. & Tauler, R. Multivariate Curve Resolution (MCR). Solving the mixture analysis problem. *Anal. Methods* **6**, 4964–4976 (2014).
132. de Juan, A. & Tauler, R. Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in concepts and applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **36**, 163–176 (2006).
133. Rutan, S. C., de Juan, A. & Tauler, R. Introduction to Multivariate Curve Resolution. *Compr. Chemom.* **2**, 85–94 (2020).
134. Ruckebusch, C. & Blanchet, L. Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges. *Anal. Chim. Acta* **765**, 28–36 (2013).
135. Tauler, R. & Maeder, M. *Multivariate Curve Resolution—Error in Curve Resolution*. *Comprehensive Chemometrics* vol. 2 (Elsevier, 2020).
136. Forchetti, D. A. P. & Poppi, R. J. Use of NIR hyperspectral imaging and multivariate curve resolution (MCR) for detection and quantification of adulterants in milk powder. *LWT - Food Sci. Technol.* **76**, 337–343 (2017).
137. Fadel, M. A., De Juan, A., Touati, N., Vezin, H. & Duponchel, L. New chemometric approach MCR-ALS to unmix EPR spectroscopic data from complex mixtures. *J. Magn. Reson.* **248**, 27–35 (2014).

138. Garrido, M., Rius, F. X. & Larrechi, M. S. Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) applied to spectroscopic data from monitoring chemical reactions processes. *Anal. Bioanal. Chem.* **390**, 2059–2066 (2008).
139. Tauler, R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **30**, 133–146 (1995).
140. Bortolato, S. A. & Olivieri, A. C. Chemometric processing of second-order liquid chromatographic data with UV-vis and fluorescence detection. A comparison of multivariate curve resolution and parallel factor analysis 2. *Anal. Chim. Acta* **842**, 11–19 (2014).
141. Worners, S. & Optic, F. Optochemical Sensors. in *Sensors: A Comprehensive Survey* 573–646 (1991).

ANEXOS

A1. Capítulo 2.

A1.1. M1: Análisis de componentes principales de los espectros complejados

Tabla A1. Valores de deseabilidad predicha del análisis multivariable realizado con el método de procesamiento M1, usando Dz como cromóforo.

Experimento	Respuesta		
	Deseabilidad		
	Dz – Hg(II)	Dz – Cd(II)	Dz – Pb(II)
1	0.587493	0.412899	0.583719
2	0.587493	0.412899	0.583719
3	0.47074	0.239581	0.0
4	0.557221	0.351363	0.494072
5	0.467964	0.384996	0.447025
6	0.587493	0.412899	0.583719
7	0.639942	0.614606	0.583512
8	0.61091	0.451523	0.580387
9	0.498601	0.550099	0.515556
10	0.639942	0.462867	0.476102
11	0.61091	0.469964	0.548087
12	0.705562	0.526763	0.444928
13	0.47074	0.180432	0.313694
14	0.519043	0.294723	0.535386
15	0.519043	0.242642	0.609567
16	0.557221	0.365713	0.482335
17	0.628188	0.504092	0.655115
18	0.587493	0.440114	0.583719
19	0.634034	0.364699	0.39621
20	0.628188	0.320985	0.799071
21	0.587493	0.383758	0.583719
22	0.587493	0.412899	0.583719

Para el sistema Dz-Cd el modelo reducido es:

$$D = 0.400003 - 0.177793*Dz - 0.0481715*CTA + 0.12176*Time*Dz + 0.251488*Dz*CTA - (A1)$$

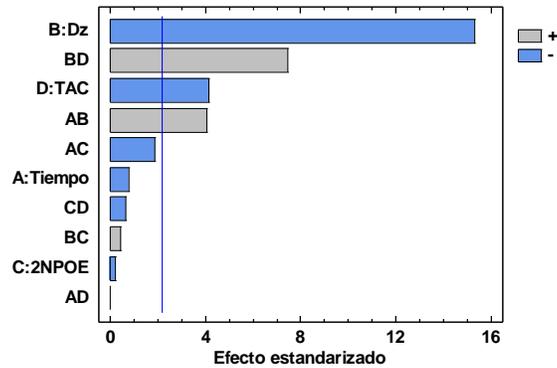


Figura A1. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M1 para el sistema Dz-Cd(II)

Tabla A2. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M1 para el sistema Dz-Cd(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,00041896	1	0,00041896	0,62	0,4469
B:Dz	0,158043	1	0,158043	234,68	0,0000
C:2NPOE	0,0000281747	1	0,0000281747	0,04	0,8417
D:TAC	0,0116151	1	0,0116151	17,25	0,0016
AB	0,0111184	1	0,0111184	16,51	0,0019
AC	0,00239427	1	0,00239427	3,56	0,0860
AD	2,15028E-7	1	2,15028E-7	0,00	0,9861
BC	0,00013992	1	0,00013992	0,21	0,6574
BD	0,0372474	1	0,0372474	55,31	0,0000
CD	0,000279159	1	0,000279159	0,41	0,5329
Error total	0,00740776	11	0,000673432		
Total (corregido)	0,230575	21			

Para el Sistema Dz-Pb(II), el modelo reducido es:

$$D = 0.517454 - 0.180459 * Dz \quad (A2)$$

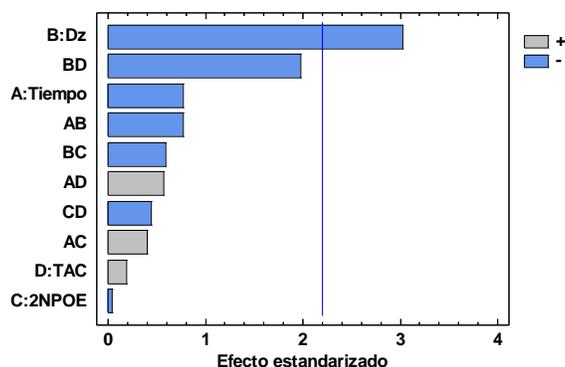


Figura A2. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M1 para el sistema Dz-Pb(II).

Tabla A3. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M1 para el sistema Dz-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0106482	1	0,0106482	0,60	0,4558
B:Dz	0,162817	1	0,162817	9,14	0,0116
C:2NPOE	0,0000254771	1	0,0000254771	0,00	0,9705
D:TAC	0,000659052	1	0,000659052	0,04	0,8510
AB	0,0106383	1	0,0106383	0,60	0,4560
AC	0,00286615	1	0,00286615	0,16	0,6960
AD	0,0058389	1	0,0058389	0,33	0,5785
BC	0,00634343	1	0,00634343	0,36	0,5628
BD	0,0699709	1	0,0699709	3,93	0,0731
CD	0,00349611	1	0,00349611	0,20	0,6664
Error total	0,195983	11	0,0178166		
Total (corregido)	0,480365	21			

Tabla A4. Valores de deseabilidad predicha del análisis multivariable realizado con el método de procesamiento M1, usando PAN como cromóforo.

Experimento	Respuesta		
	Deseabilidad		
	PAN – Cd(II)	PAN – Pb(II)	PAN – Hg(II)
1	0.412899	0.706786	0.554163
2	0.412899	0.706786	0.554163
3	0.239581	0.791831	0.531357
4	0.351363	0.770515	0.554544
5	0.384996	0.628514	0.568758
6	0.412899	0.706786	0.554163
7	0.614606	0.489938	0.503729
8	0.451523	0.663153	0.545871
9	0.550099	0.491027	0.367459
10	0.462867	0.343253	0.503729
11	0.469964	0.61407	0.545871
12	0.526763	0.454684	0.367459
13	0.180432	0.554761	0.531357
14	0.294723	0.739257	0.547071
15	0.242642	0.620121	0.475916
16	0.365713	0.713486	0.554544
17	0.504092	0.544041	0.52937
18	0.440114	0.554518	0.442246
19	0.364699	0.581995	0.568758
20	0.320985	0.3661	0.800616
21	0.383758	0.554518	0.647003
22	0.412899	0.706786	0.554163

Para el sistema PAN-Cd(II), el modelo reducido es:

$$D = 0.3001 + 0.0740457 * \text{Time} - 0.146713 * \text{PAN} + 0.235293 * \text{Time} * \text{PAN} \quad (\text{A3})$$

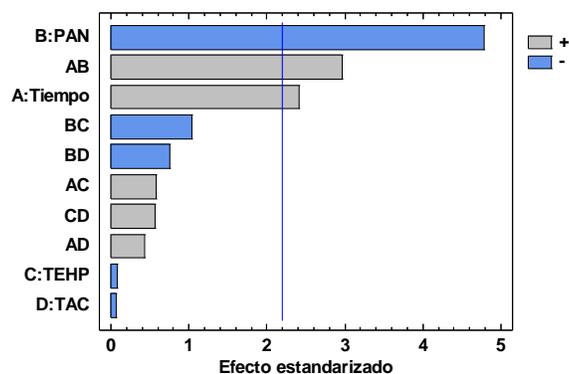


Figura A3. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M1 para el sistema PAN-Cd(II).

Tabla A5. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M1 para el sistema PAN-Cd(II).

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-p
A:Tiempo	0,0274138	1	0,0274138	5,82	0,0344
B: PAN	0,107617	1	0,107617	22,86	0,0006
C: TEHP	0,0000307475	1	0,0000307475	0,01	0,9370
D: TAC	0,0000184635	1	0,0000184635	0,00	0,9512
AB	0,0415196	1	0,0415196	8,82	0,0127
AC	0,0015598	1	0,0015598	0,33	0,5764
AD	0,000867428	1	0,000867428	0,18	0,6760
BC	0,00509963	1	0,00509963	1,08	0,3203
BD	0,00270399	1	0,00270399	0,57	0,4644
CD	0,00150323	1	0,00150323	0,32	0,5833
Error total	0,0517731	11	0,00470665		
Total (corregido)	0,264118	21			

Para el sistema PAN-Pb(II), el modelo reducido es:

$$D = 0.604665 + 0.168028 * \text{PAN (A3)}$$

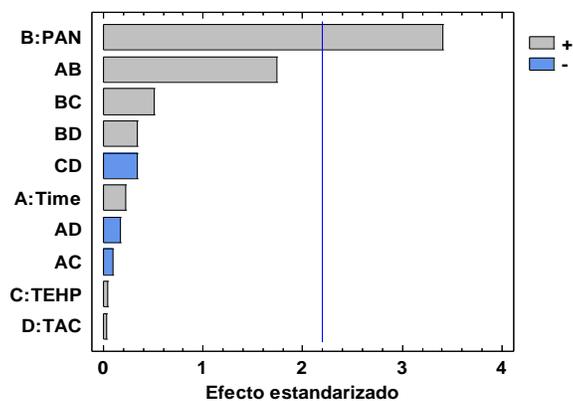


Figura A4. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M1 para el sistema PAN-Pb(II).

Tabla A6. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M1 para el sistema PAN-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,000588688	1	0,000588688	0,05	0,8297
B: PAN	0,14116	1	0,14116	11,63	0,0058
C: TEHP	0,0000255253	1	0,0000255253	0,00	0,9642
D: TAC	0,0000136384	1	0,0000136384	0,00	0,9739
AB	0,036817	1	0,036817	3,03	0,1095
AC	0,00010842	1	0,00010842	0,01	0,9264
AD	0,000350622	1	0,000350622	0,03	0,8681
BC	0,00317229	1	0,00317229	0,26	0,6193
BD	0,00142016	1	0,00142016	0,12	0,7388
CD	0,00141152	1	0,00141152	0,12	0,7395
Error total	0,133535	11	0,0121396		
Total (corregido)	0,324055	21			

Para el sistema PAN-Hg, el modelo reducido es:

$$D = 0.536483 + 0.147293 * TAC - 0.252795 * PAN * TAC \quad (A4)$$

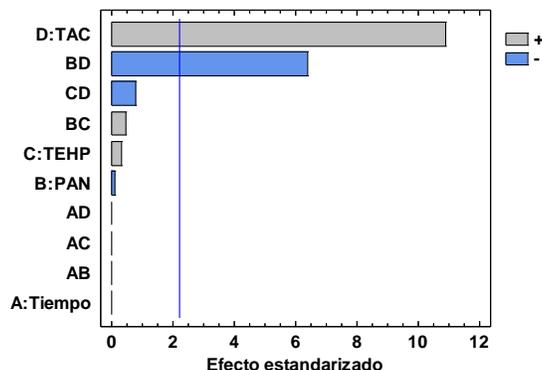
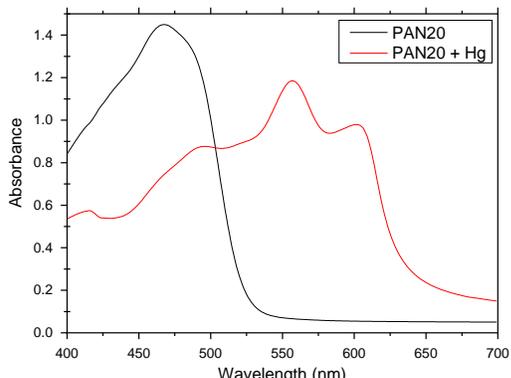
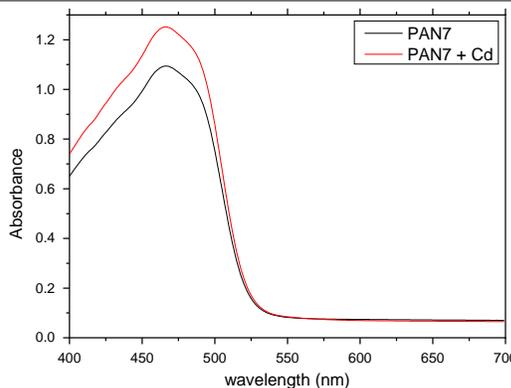
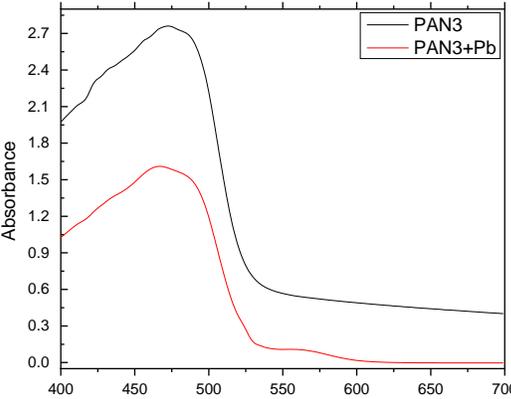


Figura A5. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M1 para el sistema PAN-Hg(II).

Tabla A7. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M1 para el sistema PAN-Hg(II).

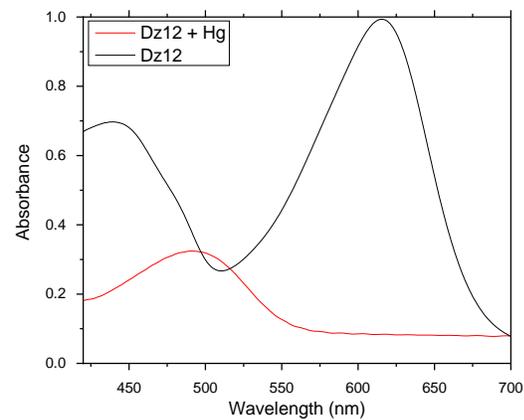
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B:PAN	0,000013335	1	0,000013335	0,01	0,9062
C:TEHP	0,000103831	1	0,000103831	0,11	0,7429
D:TAC	0,108594	1	0,108594	118,34	0,0000
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AD	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BC	0,000192123	1	0,000192123	0,21	0,6562
BD	0,0376356	1	0,0376356	41,01	0,0001
CD	0,000583345	1	0,000583345	0,64	0,4421
Error total	0,010094	11	0,00091764		
Total (corregido)	0,158191	21			

Tabla A8. Resultados de la optimización, utilizando los valores de los dos primeros componentes principales después de la complejación.

	Experimento óptimo	Apariencia de la membrana		Espectro
		Antes	Después	
PAN + Hg	20			
PAN + Cd	7			
PAN + Pb	3			

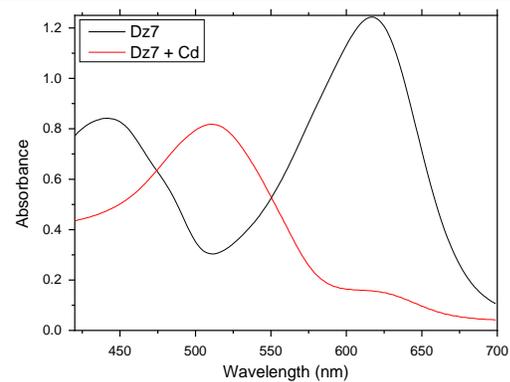
Dz + Hg

12



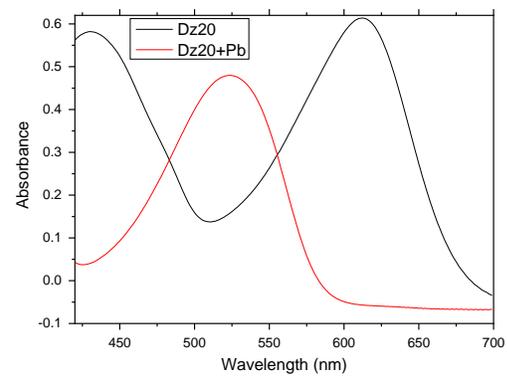
Dz + Cd

7



Dz + Pb

20



A1.2. M2: Uso de las absorbancias del cromóforo libre y del complejo formado

Tabla A9. Valores de deseabilidad predicha del análisis multivariable realizado con el método de procesamiento M2, usando Ditizona como cromóforo.

Experimento	Respuesta		
	Deseabilidad		
	Dz – Cd(II)	Dz – Pb(II)	Dz – Hg(II)
1	0.51468	0.393941	0.424206
2	0.51468	0.393941	0.424206
3	0.463657	0.421779	0.469021
4	0.523088	0.504251	0.396784
5	0.523088	0.471888	0.638758
6	0.51468	0.393941	0.424206
7	0.61753	0.618092	0.469021
8	0.553152	0.491403	0.45976
9	0.553152	0.509909	0.658187
10	0.294094	0.058451	0.469021
11	0.480357	0.385322	0.45976
12	0.480357	0.352591	0.172919
13	0.358429	0.51855	0.469021
14	0.465424	0.403001	0.474017
15	0.465424	0.415281	0.494842
16	0.470733	0.46169	0.396784
17	0.507994	0.160018	0.41322
18	0.51468	0.424416	0.447355
19	0.470733	0.417626	0.167815
20	0.507994	0.284859	0.48104
21	0.51468	0.360902	0.490509
22	0.51468	0.393941	0.424206

Para el sistema Dz-Pb(II), el modelo reducido es:

$$D = 0,401601 + 0,0955195*Dz + 0,267246*Time*Dz + 0,253216*Dz* \quad (A5)$$

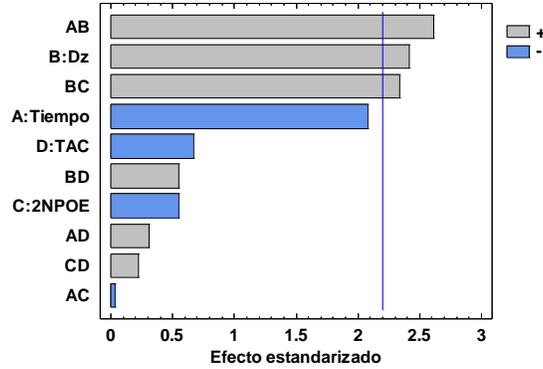


Figura A6. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M2 para el sistema Dz-Pb(II).

Tabla A10. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M2 para el sistema Dz-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Df</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0338655	1	0,0338655	4,33	0,0616
B:Dz	0,0456172	1	0,0456172	5,83	0,0343
C:2NPOE	0,00233103	1	0,00233103	0,30	0,5960
D:TAC	0,00349265	1	0,00349265	0,45	0,5178
AB	0,0535622	1	0,0535622	6,85	0,0240
AC	0,00000763568	1	0,00000763568	0,00	0,9756
AD	0,000762204	1	0,000762204	0,10	0,7608
BC	0,0427957	1	0,0427957	5,47	0,0392
BD	0,0023428	1	0,0023428	0,30	0,5951
CD	0,000383735	1	0,000383735	0,05	0,8288
Error total	0,0860455	11	0,00782232		
Total (corregido)	0,295103	21			

Para el sistema Dz-Cd(II), el modelo reducido es:

$$D = 0,491962 + 0,247497 * \text{Time} * \text{Dz} \quad (\text{A6})$$

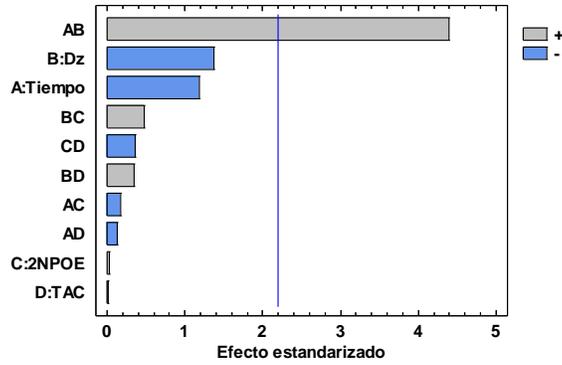


Figura A7. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M2 para el sistema Dz-Cd(II).

Tabla 11. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M2 para el sistema Dz-Cd(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,00335633	1	0,00335633	1,41	0,2599
B:Dz	0,00447673	1	0,00447673	1,88	0,1974
C:2NPOE	0,00000180301	1	0,00000180301	0,00	0,9785
D:TAC	0,00000108269	1	0,00000108269	0,00	0,9834
AB	0,0459382	1	0,0459382	19,32	0,0011
AC	0,0000720997	1	0,0000720997	0,03	0,8649
AD	0,0000400958	1	0,0000400958	0,02	0,8990
BC	0,000540699	1	0,000540699	0,23	0,6428
BD	0,000286766	1	0,000286766	0,12	0,7350
CD	0,000318967	1	0,000318967	0,13	0,7212
Error total	0,0261616	11	0,00237833		
Total (corregido)	0,0891673	21			

Para el sistema Dz-Hg(II), el modelo reducido es:

$$D = 0.442036 - 0.0373232 * 2NPOE + 0.604432 * Time * CTA - 0.109024 * Dz * CTA$$

(A7)

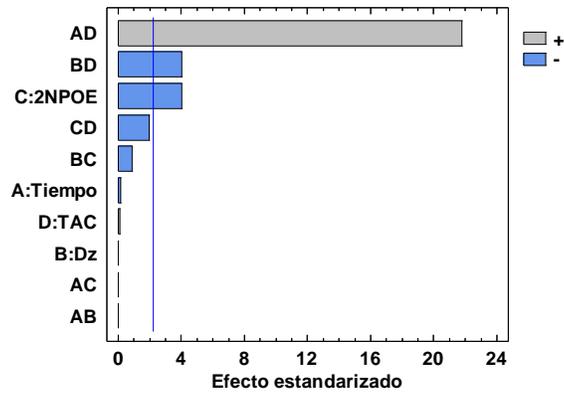


Figura A8. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M2 para el sistema Dz-Hg(II).

Tabla A12. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M2 para el sistema Dz-Hg(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0000102603	1	0,0000102603	0,02	0,8799
B:Dz	2,76061E-8	1	2,76061E-8	0,00	0,9937
C:2NPOE	0,00697371	1	0,00697371	16,26	0,0020
D:TAC	0,00000281379	1	0,00000281379	0,01	0,9369
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AD	0,203179	1	0,203179	473,82	0,0000
BC	0,000314633	1	0,000314633	0,73	0,4099
BD	0,00700015	1	0,00700015	16,32	0,0019
CD	0,00166447	1	0,00166447	3,88	0,0745
Error total	0,00471694	11	0,000428812		
Total (corregido)	0,250491	21			

Tabla A13. Valores de deseabilidad predicha del análisis multivariable realizado con el método de procesamiento M2, usando PAN como cromóforo.

Experimento	Respuesta		
	Deseabilidad		
	PAN – Hg(II)	PAN – Pb(II)	PAN – Cd(II)
1	0.543436	0.548901	0.271829
2	0.543436	0.548901	0.271829
3	0.41037	0.613708	0.278323
4	0.521259	0.578848	0.317035
5	0.521259	0.578848	0.317035
6	0.543436	0.548901	0.271829
7	0.503639	0.309131	0.260751
8	0.547868	0.473295	0.312326
9	0.547868	0.473295	0.312326
10	0.503639	0.358989	0.0
11	0.547868	0.505125	0.147643
12	0.547868	0.505125	0.147643
13	0.41037	0.71269	0.135137
14	0.479064	0.64868	0.390385
15	0.479064	0.64868	0.260751
16	0.521259	0.617777	0.229745
17	0.535071	0.426379	0.184666
18	0.543436	0.548901	0.271829
19	0.521259	0.617777	0.229745
20	0.535071	0.426379	0.184666
21	0.543436	0.548901	0.271829
22	0.543436	0.548901	0.271829

Para el sistema PAN-Hg, el modelo reducido es:

$$D = 0.517875 - 0.0513902 * \text{PAN} \quad (\text{A8})$$

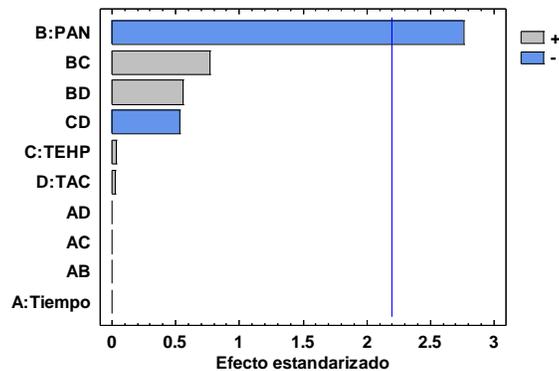


Figura A9. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M2 para el sistema PAN-Hg(II).

Tabla A14. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M2 para el sistema pan-Hg(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B:PAN	0,013204	1	0,013204	7,65	0,0183
C:TEHP	0,00000174217	1	0,0000017421	0,00	0,9752
D:TAC	0,00000104615	1	0,0000010461	0,00	0,9808
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AD	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BC	0,00100899	1	0,00100899	0,58	0,4605
BD	0,000535092	1	0,000535092	0,31	0,5887
CD	0,000489681	1	0,000489681	0,28	0,6048
Error total	0,018974	11	0,00172491		
Total (corregido)	0,0346883	21			

Para el sistema PAN-Cd, el modelo reducido es:

$$D = 0.242679 + 0.308066 * \text{Time} * Dz \quad (A9)$$

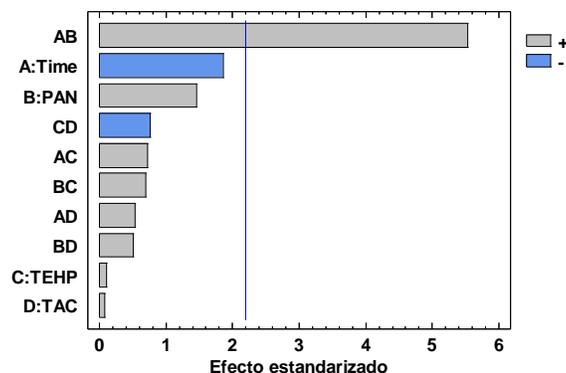
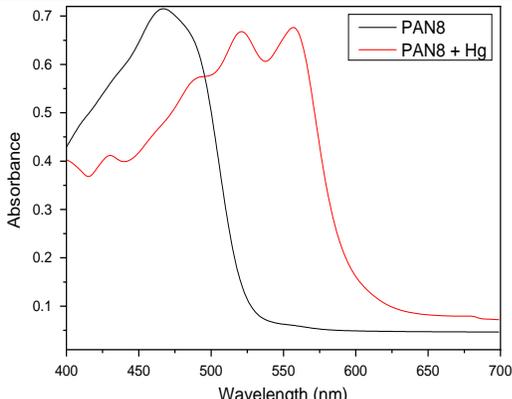
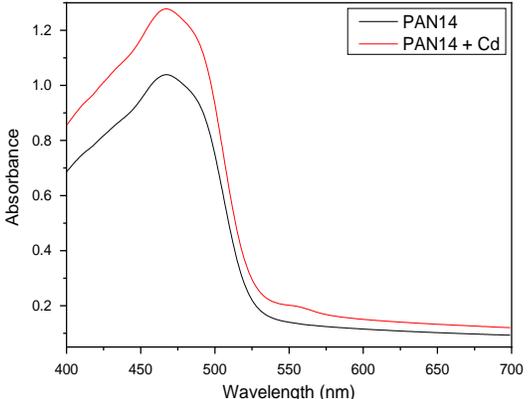
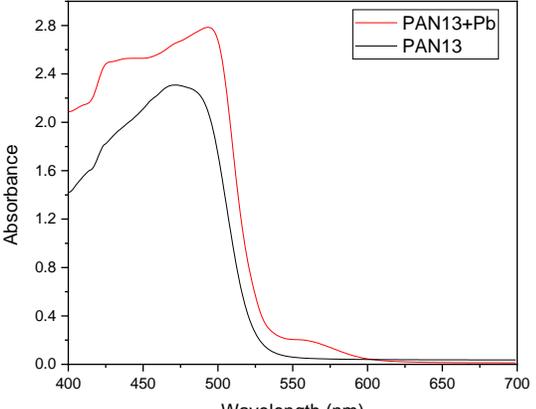


Figura A10. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M2 para el sistema PAN-Cd(II).

Tabla A15. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M2 para el sistema PAN-Cd(II).

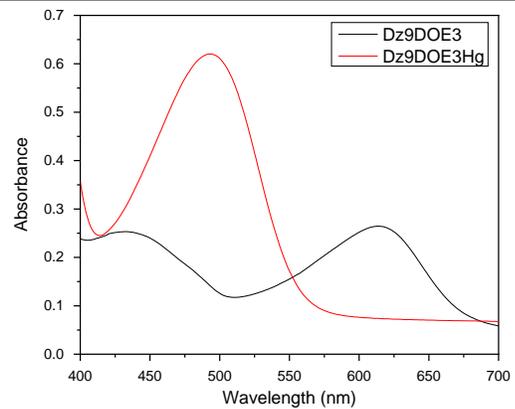
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0080796	1	0,0080796	3,47	0,0892
B: PAN	0,00499023	1	0,00499023	2,15	0,1710
C: TEHP	0,0000236866	1	0,0000236866	0,01	0,9214
D: TAC	0,0000142235	1	0,0000142235	0,01	0,9391
AB	0,0711745	1	0,0711745	30,60	0,0002
AC	0,00122884	1	0,00122884	0,53	0,4825
AD	0,000683379	1	0,000683379	0,29	0,5986
BC	0,0011196	1	0,0011196	0,48	0,5022
BD	0,000594004	1	0,000594004	0,26	0,6233
CD	0,00133417	1	0,00133417	0,57	0,4647
Error total	0,0255845	11	0,00232587		
Total (corregido)	0,145186	21			

Tabla A16. Resultados de la optimización, utilizando los valores de absorbancia antes y después de la complejación.

Experimento óptimo	Apariencia de la membrana		Espectro	
	Antes	Después		
PAN + Hg	8			
PAN + Cd	14			
PAN + Pb	13			

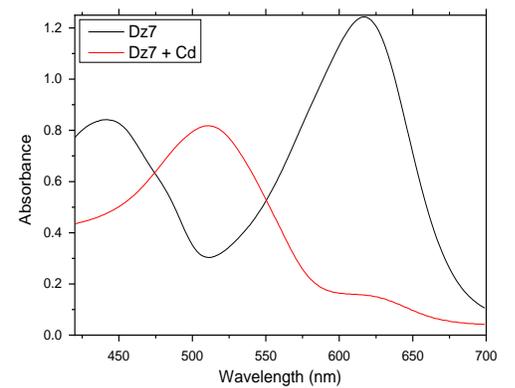
Dz + Hg

9



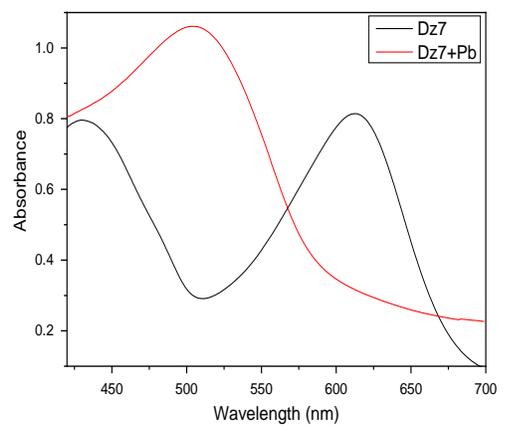
Dz + Cd

7



Dz + Pb

7



A1.3. M3: Análisis de componentes principales sobre la sustracción de los espectros normalizados antes y después de la complejación

Tabla A17. Valores de deseabilidad predicha del análisis multivariable realizado con el método de procesamiento M3, usando Dz como cromóforo.

Experimento	Respuesta		
	Deseabilidad		
	Dz – Cd(II)	Dz – Pb(II)	Dz – Hg(II)
1	0.179692	0.561281	0.685941
2	0.179692	0.561281	0.685941
3	0.269257	0.674154	0.667604
4	0.0	0.601309	0.597549
5	0.0	0.89867	0.896816
6	0.179692	0.561281	0.685941
7	0.494816	0.419034	0.667604
8	0.365697	0.51817	0.597549
9	0.260604	0.46735	0.896816
10	0.324142	0.419034	0.218987
11	0.319801	0.51817	0.708166
12	0.237532	0.194255	0.668952
13	0.176383	0.674154	0.218987
14	0.288784	0.638707	0.592996
15	0.0821848	0.477594	0.700103
16	0.0	0.601309	0.708166
17	0.230607	0.471302	0.592996
18	0.28994	0.401814	0.809836
19	0.0	0.592225	0.668952
20	0.173462	0.63269	0.700103
21	0.331309	0.720747	0.809836
22	0.179692	0.561281	0.685941

Para el sistema Dz-Cd, el modelo reducido es:

$$D = 0.207411 - 0.142974*2NPOE - 0.136824*Dz - 0.286167*2NPOE*CTA \quad (A10)$$

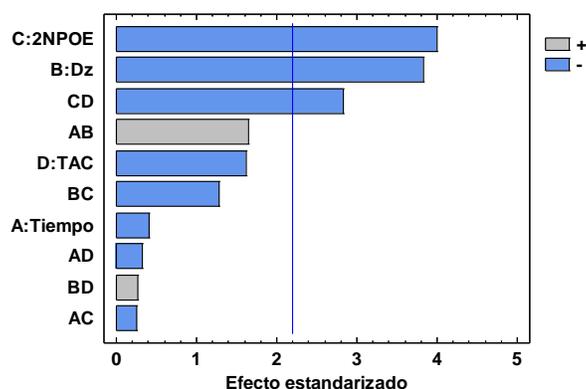


Figura A10. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M3 para el sistema Dz-Cd(II).

Tabla A18. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M3 para el sistema Dz-Cd(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,00107704	1	0,00107704	0,17	0,6891
B:Dz	0,0935983	1	0,0935983	14,66	0,0028
C:2NPOE	0,102334	1	0,102334	16,03	0,0021
D:TAC	0,016699	1	0,016699	2,62	0,1341
AB	0,0173644	1	0,0173644	2,72	0,1273
AC	0,000397844	1	0,000397844	0,06	0,8075
AD	0,000657078	1	0,000657078	0,10	0,7543
BC	0,0104035	1	0,0104035	1,63	0,2280
BD	0,000439125	1	0,000439125	0,07	0,7979
CD	0,0513013	1	0,0513013	8,04	0,0162
Error total	0,0702125	11	0,00638296		
Total (corregido)	0,363744	21			

Para el sistema Dz-Pb, el modelo reducido es:

$$D = 0.552991 + 0.147281 * Dz + 0.205914 * CTA + 0.366334 * Time * CTA \quad (A11)$$

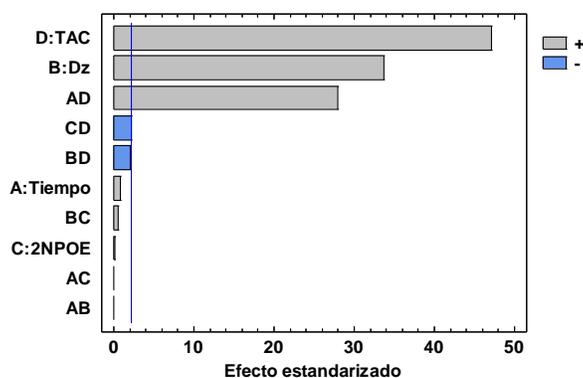


Figura A11. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M3 para el sistema Dz-Pb(II).

Tabla A19. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M3 para el sistema Dz-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0000556111	1	0,0000556111	0,58	0,4610
B:Dz	0,108452	1	0,108452	1137,88	0,0000
C:2NPOE	0,00000389023	1	0,00000389023	0,04	0,8436
D:TAC	0,212235	1	0,212235	2226,78	0,0000
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AD	0,0746342	1	0,0746342	783,07	0,0000
BC	0,0000300068	1	0,0000300068	0,31	0,5860
BD	0,000416186	1	0,000416186	4,37	0,0607
CD	0,000457735	1	0,000457735	4,80	0,0508
Error total	0,00104841	11	0,0000953102		
Total (corregido)	0,406732	21			

Para el sistema Dz-Hg, el modelo reducido es:

$$D = 0.657514 + 0.518033 * \text{Time} * \text{Dz} \quad (\text{A12})$$

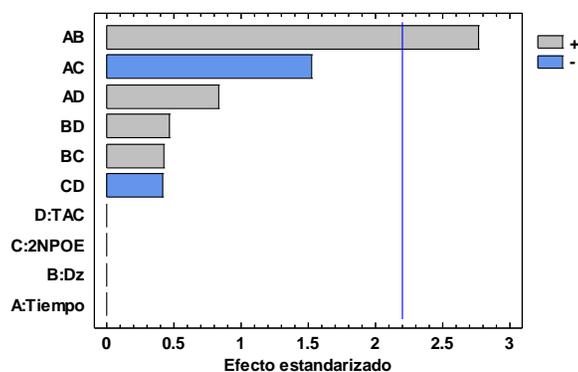


Figura A12. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M3 para el sistema Dz-Hg(II).

Tabla A20. Valores de ANOVA del análisis multivariable realizado con el método de optimización M3 para el sistema Dz-Hg(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
B:Dz	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
C:2NPOE	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
D:TAC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AB	0,201257	1	0,201257	7,64	0,0184
AC	0,0609798	1	0,0609798	2,32	0,1563
AD	0,0182156	1	0,0182156	0,69	0,4233
BC	0,00477106	1	0,00477106	0,18	0,6786
BD	0,00580992	1	0,00580992	0,22	0,6477
CD	0,00449788	1	0,00449788	0,17	0,6873
Error total	0,289661	11	0,0263329		
Total (corregido)	0,57352	21			

Tabla A21. Valores de deseabilidad predicha del análisis multivariable realizado con el método de procesamiento M3, usando PAN como cromóforo.

Experimento	Respuesta		
	Deseabilidad		
	PAN – Cd(II)	PAN – Pb(II)	PAN – Hg(II)
1	0.455591	0.465926	0.416836
2	0.455591	0.223915	0.416836
3	0.430268	0.563115	0.482499
4	0.454742	0.565705	0.401948
5	0.454742	0.392263	0.600185
6	0.455591	0.428557	0.416836
7	0.28149	0.671214	0.433985
8	0.397523	0.643515	0.485418
9	0.397523	0.482728	0.427605
10	0.411835	0.563115	0.433985
11	0.449011	0.565705	0.636049
12	0.449011	0.392263	0.460698
13	0.629506	0.671214	0.482499
14	0.512795	0.261285	0.612344
15	0.512795	0.596423	0.485578
16	0.513641	0.643515	0.574882
17	0.390087	0.261285	0.479722
18	0.455591	0.465926	0.460239
19	0.513641	0.482728	0.646768
20	0.390087	0.596423	0.606119
21	0.455591	0.465926	0.699678
22	0.455591	0.465926	0.416836

Para el sistema PAN-Hg, el modelo reducido es:

$$D = 0.503524 + 0.113536 \cdot \text{CTA} \quad (\text{A13})$$

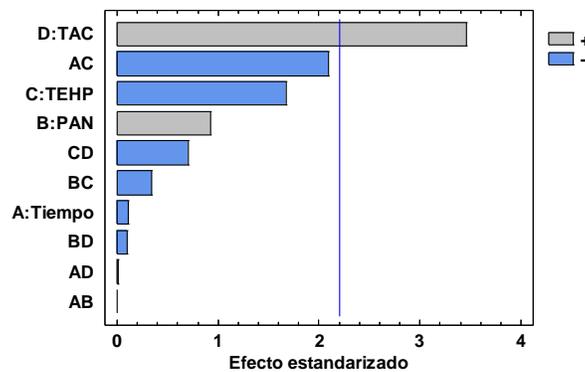


Figura A12. Diagrama de Pareto para el análisis multivariable realizado con el método de optimización M3 para el sistema PAN-Hg(II).

Tabla A22. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M3 para el sistema PAN-Hg(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0000640569	1	0,0000640569	0,01	0,9152
B:PAN	0,00466858	1	0,00466858	0,87	0,3721
C:TEHP	0,015153	1	0,015153	2,81	0,1218
D:TAC	0,0645229	1	0,0645229	11,97	0,0053
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	0,0235508	1	0,0235508	4,37	0,0607
AD	2,76877E-7	1	2,76877E-7	0,00	0,9944
BC	0,000611178	1	0,000611178	0,11	0,7427
BD	0,0000548522	1	0,0000548522	0,01	0,9215
CD	0,00267146	1	0,00267146	0,50	0,4961
Error total	0,0593142	11	0,0053922		
Total (corregido)	0,174981	21			

Para el Sistema PAN-Pb, el modelo reducido es:

$$D = 0.494014 + 0.48524 * \text{PAN} * \text{TEHP} - 0.357177 * \text{PAN} * \text{CTA} \quad (\text{A14})$$

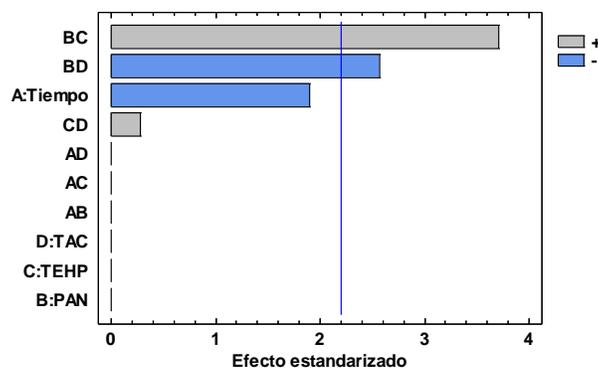


Figura A13. Diagrama de Pareto para el análisis multivariado realizado con el método de optimización M3 para el sistema PAN-Pb(II).

Tabla A23. Valores de ANOVA del análisis multivariado realizado con el método de optimización M3 para el sistema PAN-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Tiempo	0,0409743	1	0,0409743	3,60	0,0844
B: PAN	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
C: TEHP	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
D: TAC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AB	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AC	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
AD	0,0	1	0,0	0,00	1,0000
BC	0,157157	1	0,157157	13,80	0,0034
BD	0,0751327	1	0,0751327	6,60	0,0261
CD	0,000909381	1	0,000909381	0,08	0,7827
Error total	0,125266	11	0,0113878		
Total (corregido)	0,357986	21			

A2. Capítulo 3.

A2.1. Optimización del pH y la concentración de las disoluciones de los iones metálicos

Tabla A24. Resultados del ANOVA del análisis multivariado realizado en la optimización del pH y la concentración para el sistema PAN-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:pH	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
B:Concentración	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Pb					
AA	0.0423944	1	0.0423944	4.25	0.0393
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BB	0.127781	1	0.127781	12.80	0.0003
Error total	4.84335E-9	7	6.91907E-10	0.00	1.0000
Total (corr.)	0.192653	12			

Tabla A25. Resultados del ANOVA del análisis multivariado realizado en la optimización del pH y la concentración para el sistema PAN-Hg(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:pH	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
B:Concentración	0.000817617	1	0.000817617	1.06	0.3370
AA	0.223538	1	0.223538	290.41	0.0000
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BB	0.505145	1	0.505145	656.25	0.0000
Error total	0.0053882	7	0.000769743		
Total (corr.)	0.658324	12			

Tabla A26. Resultados del ANOVA del análisis multivariado realizado en la optimización del pH y la concentración para el sistema PAN-Cd(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:pH	0.167258	1	0.167258	101.95	0.0000
B:Concentration	0.04202	1	0.04202	25.61	0.0015
AA	0.084735	1	0.084735	51.65	0.0002
AB	0.0252321	1	0.0252321	15.38	0.0057
BB	0.0785806	1	0.0785806	47.90	0.0002
Error total	0.011484	7	0.00164058		
Total (corr.)	0.390481	12			

Tabla A27. Resultados del ANOVA del análisis multivariado realizado en la optimización del pH y la concentración para el sistema Dz-Pb(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:pH	0.00866257	1	0.00866257	1.77	0.1836
B:Conc. Pb	0.0104316	1	0.0104316	2.13	0.1445
AA	0.0222857	1	0.0222857	4.55	0.0330
AB	0.0112636	1	0.0112636	2.30	0.1295
BB	0.000910943	1	0.000910943	0.19	0.6663
Error total	0.0295906	7	0.00422722	0.86	0.5356
Total (corr.)	0.0847433	12			

Tabla A28. Resultados del ANOVA del análisis multivariado realizado en la optimización del pH y la concentración para el sistema Dz-Hg(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:pH	0.000968861	1	0.000968861	4.08	0.0831
B:Conc. Hg	0.0887465	1	0.0887465	373.84	0.0000
AA	0.0000144254	1	0.0000144254	0.06	0.8124
AB	0.0497301	1	0.0497301	209.48	0.0000
BB	0.0233482	1	0.0233482	98.35	0.0000
Error total	0.00166175	7	0.000237393		
Total (corr.)	0.165028	12			

Tabla 29. Resultados del ANOVA del análisis multivariado realizado en la optimización del pH y la concentración para el sistema Dz-Cd(II).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:pH	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
B:[Cd]	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AA	0.014898	1	0.014898	5.96	0.0146
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BB	0.313962	1	0.313962	125.58	0.0000
Error total	1.02613E-10	7	1.46591E-11	0.00	1.0000
Total (corr.)	0.352702	12			

A2.1.2. Diagramas de especiación para los tres metales estudiados

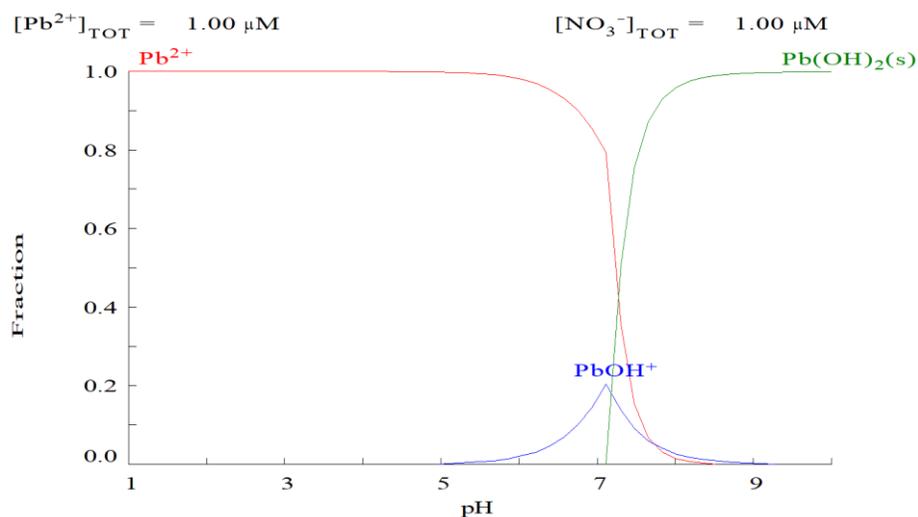


Figura A14. Diagrama de fracción de especie del Pb(II) en disolución acuosa, en función del pH, fuerza iónica = 0.0.

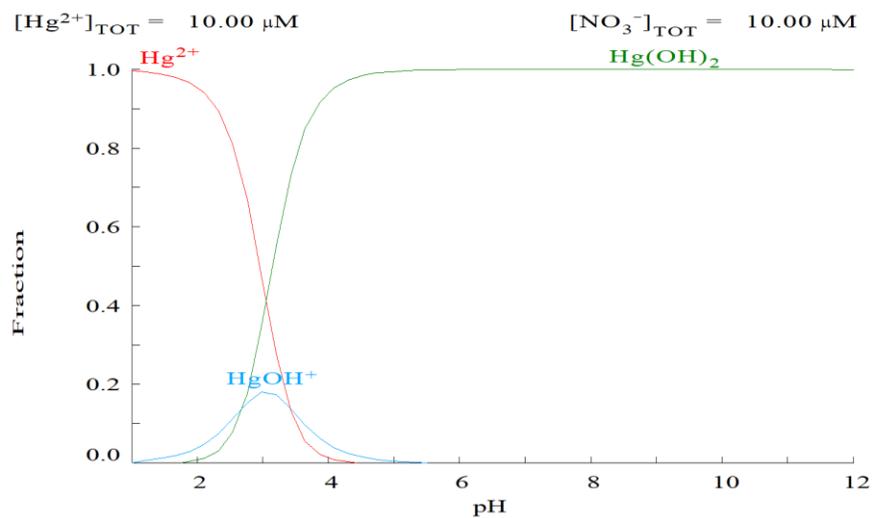


Figura A15. Diagrama de fracción de especie del Hg(II) en disolución acuosa, en función del pH, fuerza iónica = 0.0.

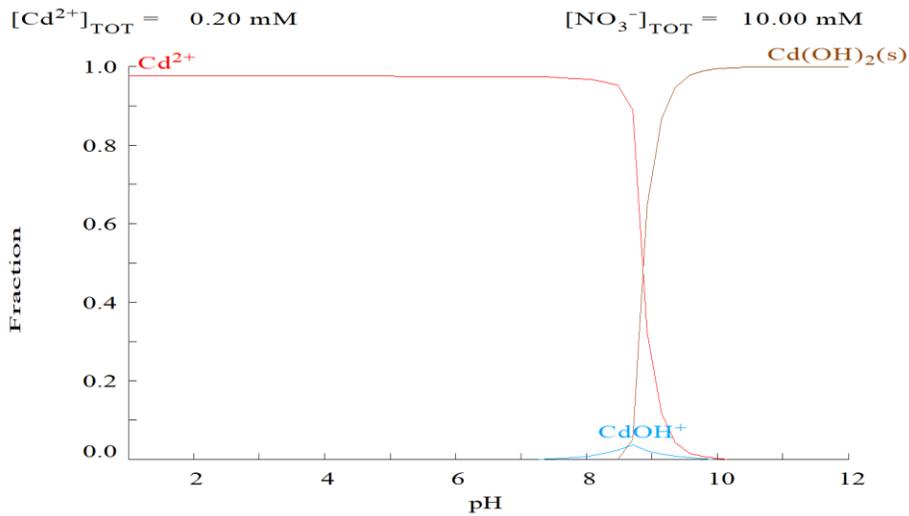


Figura A16. Diagrama de fracción de especie del Cd(II) en disolución acuosa, en función del pH, fuerza iónica = 0.0.

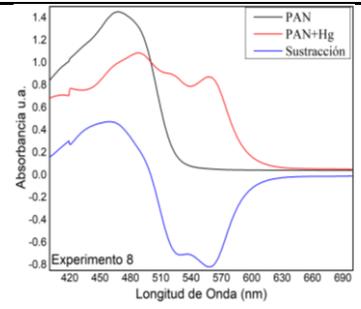
NOTA: Los anteriores gráficos de especiación se construyeron con el programa HYDRAMEDUSA

Tabla A30. Apariencia y espectros de las membranas bajo las condiciones de pH y concentración encontradas como óptimas según el DoE.

Sistema	Experimento óptimo	Apariencia de la membrana		Espectro
		Antes	Después	
PAN + Pb	7			

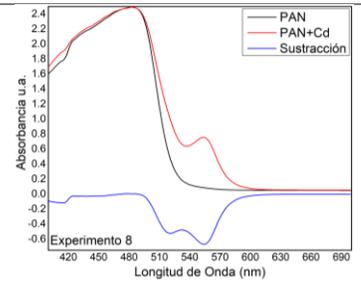
PAN + Hg

8



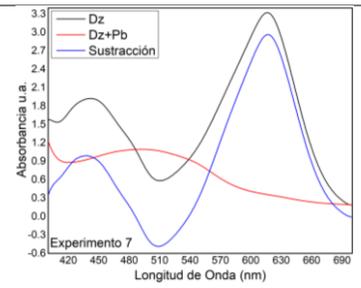
PAN + Cd

8



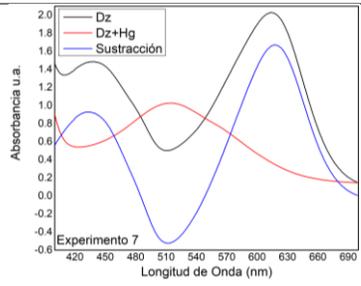
Dz + Pb

8



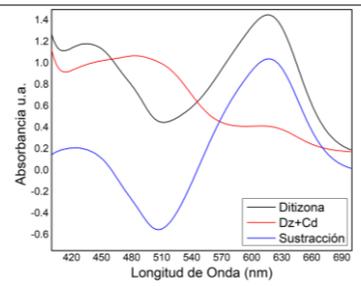
Dz + Hg

8



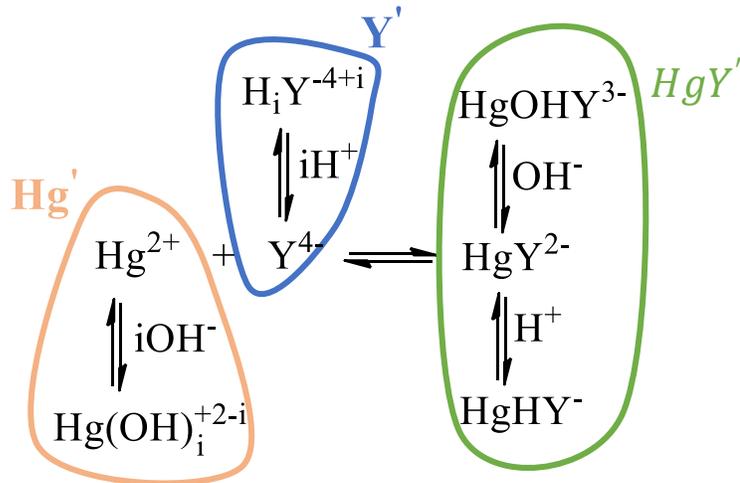
Dz + Cd

8



A2.2. Cálculos de las constantes condicionales de formación de la química en disolución en la reversibilidad de los sistemas

- *Equilibrios presentes en el proceso de regeneración de los sensores con EDTA:*



La concentración condicional y la concentración en el equilibrio se relacionan mediante el coeficiente de reacción lateral, α :

$$[Hg'] = [Hg^{2+}] \times \alpha_{Hg}$$

$$[Y'] = [Y^{4-}] \times \alpha_Y$$

$$[HgY'] = [HgY^{2-}] \times \alpha_{HgY}$$

Por lo que la constante condicional y la constante de equilibrio se relacionan de la siguiente forma:

$$Hg' + Y' \rightleftharpoons HgY' \quad K' = \frac{[HgY']}{[Hg'][Y']} = \frac{[HgY^{2-}]}{[Hg^{2+}][Y^{4-}]} \times \frac{\alpha_{HgY}}{\alpha_{Hg}\alpha_Y}$$

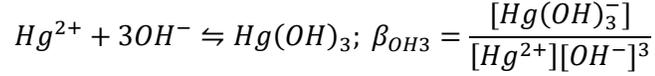
El cálculo de los coeficientes de reacción de reacción lateral se realiza planteando un balance de masas, donde se considera la especie libre y todas las especies producidas en las reacciones laterales en las que intervenga esa especie.

Para el metal:

1. Balance de masas:

$$[Hg'] = [Hg^{2+}] + [Hg(OH)^-] + [Hg(OH)_2] + [Hg(OH)_3^-]$$

2. Equilibrios de formación acumulados y relación de las concentraciones, ejemplo:



De donde:

$$[Hg(OH)_3^-] = \beta_{3OH}[Hg^{2+}][OH^-]^3$$

3. Sustituyendo en el balance de masas:

$$[Hg'] = [Hg^{2+}] + \beta_{OH1}[Hg^{2+}][OH^-] + \beta_{OH2}[Hg^{2+}][OH^-]^2 + \beta_{OH3}[Hg^{2+}][OH^-]^3$$

$$[Hg'] = [Hg^{2+}] \times (1 + \beta_{OH1}[OH^-] + \beta_{OH2}[OH^-]^2 + \beta_{OH3}[OH^-]^3)$$

$$\alpha_{Hg} = 1 + \beta_{OH1}[OH^-] + \beta_{OH2}[OH^-]^2 + \beta_{OH3}[OH^-]^3$$

α_{Hg} , a pH 6.5:

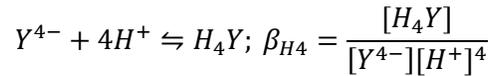
$$\alpha_{Hg} = 1 + (10^{11.3} \times 10^{-7.5}) + (10^{21.9} \times (10^{-7.5})^2) + (10^{30.1} \times (10^{-7.5})^3) = 4.77 \times 10^7$$

Para el ligando (Y):

1. Balance de masas:

$$[Y'] = [Y^{4-}] + [HY^{3-}] + [H_2Y^{2-}] + [H_3Y^-] + [H_4Y]$$

2. Equilibrios de protonación acumulados



De donde:

$$[H_4Y] = \beta_{H4}[Y^{4-}][H^+]^4$$

3. Sustituyendo en el balance de masas:

$$[Y'] = [Y^{4-}] + \beta_{H1}[Y^{4-}][H^+] + \beta_{H2}[Y^{4-}][H^+]^2 + \beta_{H3}[Y^{4-}][H^+]^3 + \beta_{H4}[Y^{4-}][H^+]^4$$

$$[Y'] = [Y^{4-}] \times (1 + \beta_{H1}[H^+] + \beta_{H2}[H^+]^2 + \beta_{H3}[H^+]^3 + \beta_{H4}[H^+]^4)$$

$$\alpha_Y = 1 + \beta_{H1}[H^+] + \beta_{H2}[H^+]^2 + \beta_{H3}[H^+]^3 + \beta_{H4}[H^+]^4$$

α_Y , a pH 6.5:

$$\alpha_Y = 1 + (10^{11} \times 10^{-6.5}) + (10^{17.3} \times (10^{-6.5})^2) + (10^{19.8} \times (10^{-6.5})^3) + (10^{21.7} \times (10^{-6.5})^4) \\ = 4.16 \times 10^4$$

Para el complejo (HgY^{2-}):

1. Balance de masas:

$$[HgY'] = [HgY^{2-}] + [HgHY^-] + [HgOHY^{3-}]$$

2. Equilibrios de formación

$$HgY^{2-} + H^+ \rightleftharpoons HgHY^-; K_{HgHY} = \frac{[HgHY^-]}{[HgY^{2-}][H^+]}$$

$$HgY^{2-} + OH^- \rightleftharpoons HgOHY^{3-}; K_{HgOHY} = \frac{[HgOHY^{3-}]}{[HgY^{2-}][OH^-]}$$

De donde:

$$[HgHY^-] = K_{HgHY}[HgY^{2-}][H^+]$$

$$[HgOHY^{3-}] = K_{HgOHY}[HgY^{2-}][OH^-]$$

3. Sustituyendo en el balance de masas:

$$[HgY'] = [HgY^{2-}] + K_{HgHY}[HgY^{2-}][H^+] + K_{HgOHY}[HgY^{2-}][OH^-]$$

$$[HgY'] = [HgY^{2-}] \times (1 + K_{HgHY}[H^+] + K_{HgOHY}[OH^-])$$

$$\alpha_{HgY} = 1 + K_{HgHY}[H^+] + K_{HgOHY}[OH^-]$$

α_{HgY} , a pH 6.5:

$$\alpha_Y = 1 + (10^{3.1} \times 10^{-6.5}) + (10^{4.9} \times 10^{-7.5}) = 1.003$$

Cálculo de la constante condicional:

Finalmente se calcula la constante condicional a partir de las constantes de equilibrio y los coeficientes de reacción lateral:

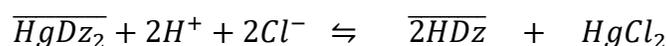
$$K' = \frac{[HgY']}{[Hg'][Y']} = \frac{[HgY^{2-}]}{[Hg^{2+}][Y^{4-}]} \times \frac{\alpha_{HgY}}{\alpha_{Hg}\alpha_Y} \\ = K_{HgY^{2-}} \times \frac{\alpha_{HgY}}{\alpha_{Hg}\alpha_Y}$$

$$K' = K_{HgY^{2-}} \times \frac{\alpha_{HgY}}{\alpha_{Hg}\alpha_Y} = 6.3 \times 10^{21} \times \frac{1.003}{(4.77 \times 10^7) \times (4.16 \times 10^4)} = 3.18 \times 10^9$$

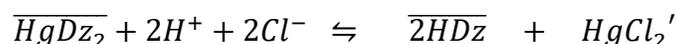
Un procedimiento similar al anterior se realizó para los equilibrios del EDTA con Pb^{2+} y Cd^{2+} , los valores de las constantes condicionales se muestran a continuación:

K'_{CdY}	K'_{PbY}
1.99×10^{11}	1.32×10^6

- *Equilibrios presentes en el proceso de regeneración de los sensores con HCl:*



$$K = \frac{[\overline{HDz}]^2 [HgCl_2]}{[\overline{HgDz_2}] [H^+]^2 [Cl^-]^2}$$

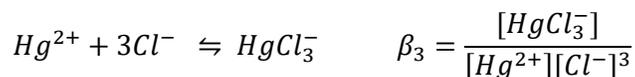
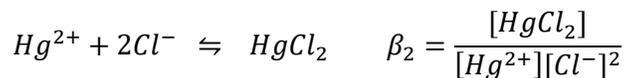
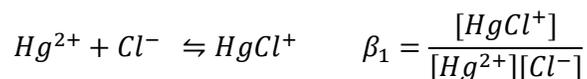


$$K' = \frac{[\overline{HDz}]^2 [HgCl_2]'}{[\overline{HgDz_2}] [H^+]^2 [Cl^-]^2} = K \times \alpha_{HgCl_2}$$

1. Balance de masas:

$$[HgCl_2]' = [Hg^{2+}] + [HgCl^+] + [HgCl_2] + [HgCl_3^-]$$

2. Equilibrios de formación:



De donde:

$$[Hg^{2+}] = \frac{[HgCl_2]}{\beta_2 [Cl^-]^2}$$

$$[HgCl^+] = \beta_1 [Hg^{2+}] [Cl^-]$$

$$[HgCl^+] = \beta_1 \frac{[HgCl_2]}{\beta_2 [Cl^-]^2} [Cl^-] = \beta_1 \frac{[HgCl_2]}{\beta_2 [Cl^-]}$$

$$[HgCl_3^-] = \beta_3 [Hg^{2+}] [Cl^-]^3$$

$$[HgCl_3^-] = \beta_3 \frac{[HgCl_2]}{\beta_2 [Cl^-]^2} [Cl^-]^3$$

$$[HgCl_3^-] = \beta_3 \frac{[HgCl_2]}{\beta_2} [Cl^-]$$

3. Sustituir en el balance de masas y sacar factor común:

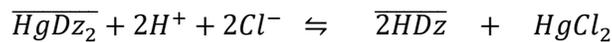
$$[HgCl_2]' = \frac{[HgCl_2]}{\beta_2 [Cl^-]^2} + \beta_1 \frac{[HgCl_2]}{\beta_2 [Cl^-]} + [HgCl_2] + \beta_3 \frac{[HgCl_2]}{\beta_2} [Cl^-]$$

$$[HgCl_2]' = [HgCl_2] \times \left(\frac{1}{\beta_2 [Cl^-]^2} + \beta_1 \frac{1}{\beta_2 [Cl^-]} + 1 + \beta_3 \frac{1}{\beta_2} [Cl^-] \right)$$

α_{HgCl_2} , a una concentración de Cl^- de 0.01 mol/L es:

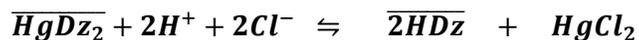
$$\alpha_{HgCl_2} = \frac{1}{10^{13.2} (0.01)^2} + \frac{10^{6.7}}{10^{13.2} (0.01)} + 1 + \frac{10^{14.1} (0.01)}{10^{13.2}} = 1.07$$

$$K' = K \times 1.07$$



$$K = \frac{[\overline{HDz}]^2 [HgCl_2]}{[\overline{HgDz_2}] [H^+]^2 [Cl^-]^2}$$

Aplicando la ley de Hess en el cálculo de K:

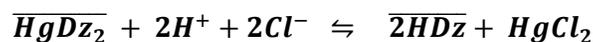


$$1) Hg^{2+} + \overline{2HDz} \rightleftharpoons \overline{HgDz_2} + 2H^+ \quad \log\beta_1 = 40.3$$

$$2) Hg^{2+} + 2Cl^- \rightleftharpoons HgCl_2 \quad \log\beta_2 = 13.2$$

$$1) \times -1 \quad \overline{HgDz_2} + 2H^+ \rightleftharpoons Hg^{2+} + \overline{2HDz} \quad \frac{1}{\log\beta_1}$$

$$2) Hg^{2+} + 2Cl^- \rightleftharpoons HgCl_2 \quad \log\beta_2$$



$$K = 10^{-40.3} \times 10^{13.2} = 10^{-27.1} = 7.9 \times 10^{-28}$$

$$K' = 7.9 \times 10^{-28} \times 1.07$$

$$K' = 8.4 \times 10^{-28}$$

Un procedimiento similar al anterior se realizó para los equilibrios del HCl con Pb^{2+} y Cd^{2+} , los valores de las constantes condicionales se muestran a continuación:

K'_{CdCl_2}	K'_{PbCl_2}
1.33×10^{-10}	1.15×10^{-11}

A4. Capítulo 4.

A3.1. Determinación simultánea de los iones metálicos

A3.1.1. Interfaz empleada en la ejecución del análisis MCR para el sistema con ditizona

The screenshot shows the 'Ditizona simultáneos' window in The Unscrambler X. The main area displays a data matrix with the following structure:

	[Cd]	[Pb]	[Hg]	430	431	432	433	434	435	436
1	0,0000	1,0000	0,0000	0,6328	0,6339	0,6354	0,6370	0,6382	0,6396	0,6408
2	1,0000	0,0000	0,0000	0,7997	0,8039	0,8161	0,8349	0,8579	0,8822	0,9080
3	0,0000	0,0000	1,0000	0,6166	0,6178	0,6161	0,6168	0,6170	0,6168	0,6168
4	0,1650	0,1650	0,1650	0,0336	0,0559	0,0786	1,0019	1,0256	1,0497	1,0740
5	0,1650	0,1650	0,1650	0,7851	0,8047	0,8248	0,8453	0,8662	0,8875	0,9090
6	0,1650	0,1650	0,1650	0,6535	0,6692	0,6851	0,7014	0,7180	0,7348	0,7518
7	0,1650	0,1650	0,1650	0,8272	0,8467	0,8666	0,8869	0,9076	0,9287	0,9500
8	0,1650	0,1650	0,1650	0,6980	0,7144	0,7311	0,7481	0,7655	0,7832	0,8010
9	0,1650	0,1650	0,1650	0,7712	0,7885	0,8061	0,8240	0,8422	0,8606	0,8791
10	0,2450	0,0850	0,0850	0,8772	0,8994	0,9219	0,9448	0,9681	0,9917	1,0154
11	0,1650	0,1650	0,3000	0,4543	0,4636	0,4729	0,4829	0,4934	0,5035	0,5133
12	0,2450	0,2450	0,0850	0,7300	0,7482	0,7668	0,7856	0,8049	0,8245	0,8440
13	0,0850	0,2450	0,2450	0,4081	0,4164	0,4247	0,4334	0,4424	0,4513	0,4600
14	0,0850	0,2450	0,0850	1,1058	1,1321	1,1590	1,1862	1,2139	1,2419	1,2699
15	0,1700	0,3000	0,1700	0,5246	0,5354	0,5463	0,5575	0,5688	0,5802	0,5916
16	0,2450	0,2450	0,2450	0,4035	0,4117	0,4200	0,4284	0,4370	0,4456	0,4541
17	0,0850	0,0850	0,0850	0,4703	0,4809	0,4918	0,5030	0,5144	0,5261	0,5377
18	0,1700	0,0300	0,1700	0,2905	0,2950	0,3001	0,3052	0,3107	0,3158	0,3209
19	0,0300	0,1700	0,1700	0,4934	0,4966	0,4999	0,5041	0,5084	0,5128	0,5171
20	0,3000	0,1700	0,1700	0,5357	0,5415	0,5487	0,5564	0,5642	0,5718	0,5794
21	0,0850	0,0850	0,2450	0,4667	0,4701	0,4736	0,4780	0,4821	0,4866	0,4910
22	0,1700	0,1700	0,0300	0,6228	0,6317	0,6415	0,6513	0,6612	0,6706	0,6800
23	0,2450	0,0850	0,2450	0,4985	0,5022	0,5058	0,5105	0,5150	0,5199	0,5246

Figura A17. Interfaz del programa The Unscrambler, empleado en la ejecución del análisis MCR para el sistema Ditizona/Metales, donde se muestra la matriz de datos originales sobre los cuales se llevó a cabo el análisis, para los sistemas con Ditizona.

En la figura A.17 se encuentra la imagen de la interfaz del programa The Unscrambler, tal como se muestra, ya se encuentran cargados los datos originales correspondientes a los valores de concentración dados por el diseño experimental en mM (primeras 3 columnas-recuadro azul), y los espectros visibles de cada uno de los experimentos realizados (columnas de la 4 a la 268). Las primeras tres filas corresponden a los espectros puros de los metales en su determinación individual, así como la concentración de estos en cada disolución. El recuadro verde contiene tanto la matriz de datos como cada tratamiento que se le dio o dará a la misma, en este caso aparece un ítem MCR con corrección, este es el nombre que se le ha dado al análisis realizado sobre los espectros corregidos por línea base y recortados a partir de 430, como se puede observar en la misma matriz de los datos. Una vez se completa el cálculo MCR, la interfaz toma la forma mostrada en la figura A18.

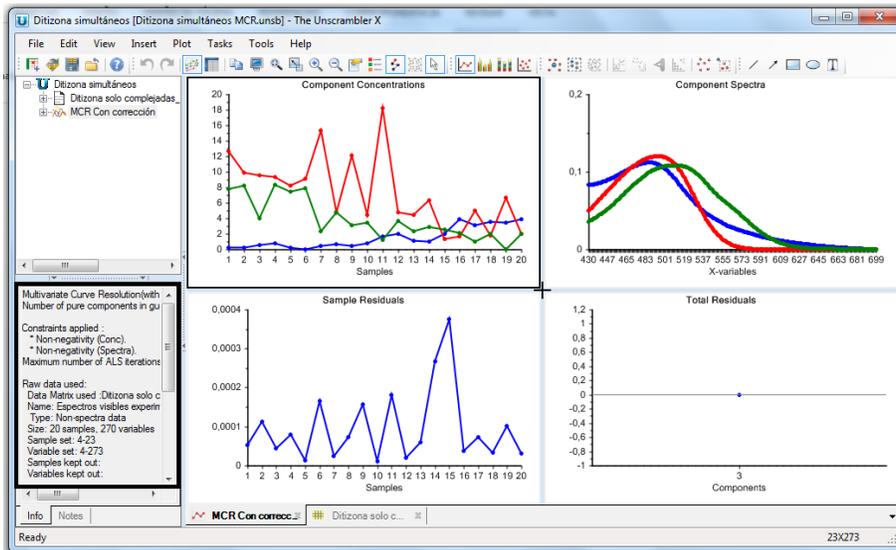


Figura A17. Interfaz del programa The Unscrambler, empleado en la ejecución del análisis MCR para el sistema Ditzona/Metales, donde se muestra la apariencia de la interfaz una vez se ejecuta el análisis MCR, para los sistemas con Ditzona.

En la imagen A17 se muestran los gráficos de descripción general que se obtienen una vez se ejecuta el análisis. Aquí se pueden apreciar los 4 gráficos, nombrados de la esquina superior derecha a la esquina inferior izquierda, como sigue: Concentraciones de componentes, espectros de los componentes, residuos de las muestras y residuos totales. Observándose, como se mencionó en la discusión del capítulo 4, que el número óptimo de componentes puros estimados es 3.

A3.1.1. Interfaz empleada en la ejecución del análisis MCR para el sistema con PAN

Las figuras A19 y A20 muestran la interfaz del programa The Unscrambler, antes y después de la ejecución del análisis MCR, respectivamente.

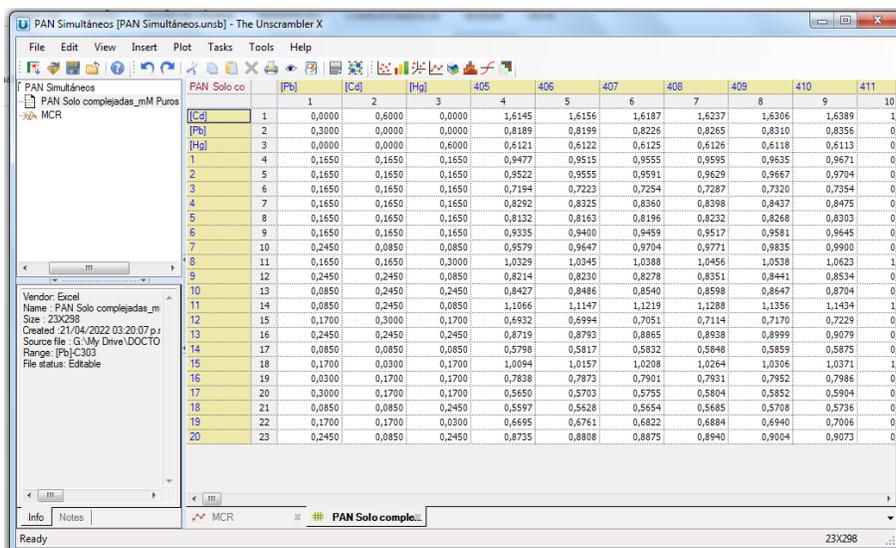


Figura A19. Interfaz del programa The Unscrambler, empleado en la ejecución del análisis MCR para el sistema Ditizona/Metales, donde se muestra la matriz de datos originales sobre los cuales se llevó a cabo el análisis, para los sistemas con PAN.

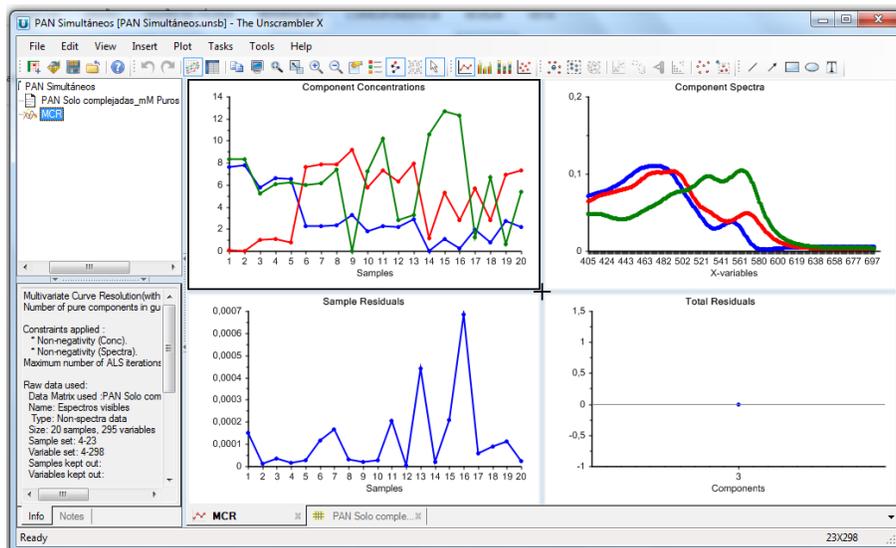


Figura A20. Interfaz del programa The Unscrambler, empleado en la ejecución del análisis MCR para el sistema Ditizona/Metales, donde se muestra la apariencia de la interfaz una vez se ejecuta el análisis MCR, para los sistemas con PAN.

A5. Artículo publicado



Article

Integration of Response Surface Methodology (RSM) and Principal Component Analysis (PCA) as an Optimization Tool for Polymer Inclusion Membrane Based-Optodes Designed for Hg(II), Cd(II), and Pb(II)

Jeniffer García-Beleño and Eduardo Rodríguez de San Miguel *

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, 04510 Ciudad de México, México; jgarciab@comunidad.unam.mx

* Correspondence: erdsmg@unam.mx



Citation: García-Beleño, J.; Rodríguez de San Miguel, E. Integration of Response Surface Methodology (RSM) and Principal Component Analysis (PCA) as an Optimization Tool for Polymer Inclusion Membrane Based-Optodes Designed for Hg(II), Cd(II), and Pb(II). *Membranes* **2021**, *11*, 288. <https://doi.org/10.3390/membranes11040288>

Academic Editor: Robert Cattrall

Received: 12 March 2021

Accepted: 10 April 2021

Published: 14 April 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: An optimization of the composition of polymer inclusion membrane (PIM)-based optodes, and their exposure times to metal ion solutions (Hg(II), Cd(II), and Pb(II)) was performed using two different chromophores, diphenylthiocarbazone (dithizone) and 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol (PAN). Four factors were evaluated (chromophore (0.06–1 mg), cellulose triacetate (25–100 mg) and plasticizer amounts (25–100 mg), and exposure time (20–80 min)). Derringer's desirability functions values were employed as response variables to perform the optimization obtained from the results of three different processes of spectral data treatment: two full-spectrum methods (M1 and M3) and one band-based method (M2). The three different methods were compared using a heatmap of the coefficients and dendrograms of the Principal Component Analysis (PCA) reductions of their desirability functions. The final recommended M3 processing method, i.e., using the scores values of the first two principal components in PCA after subtraction of the normalized spectra of the membranes before and after complexation, gave more discernable differences between the PIMs in the Design of Experiments (DoE), as the nodes among samples appeared at longer distances and varyingly distributed in the dendrogram analysis. The optimal values were time of 35–65 min, 0.53 mg–1.0 mg of chromophores, plasticizers 34.4–71.9 of chromophores, and 62.5–100 mg of CTA, depending on the metal ion. In addition, the method yielded the best outcomes in terms of interpretability and an easily discernable color change so that it is recommended as a novel optimization method for this kind of PIM optode.

Keywords: polymer inclusion membrane; optode; desirability function; parameters optimization; response surface methodology; principal component analysis

1. Introduction

Chemists often work in very complex systems, where the estimation of the variables and their interactions affecting a phenomenon or finding the differences between two or more extremely complex sample classes may not be immediately apparent from a superficial evaluation. Subsequently, maximizing the information gained from a chemical experiment becomes a crucial step to reduce the time and cost necessary for studying chemical systems. Chemometrics is a prominent area dedicated to developing multivariate strategies for chemical data evaluation and interpretation [1]. Over the years, chemometrics has become an important chemical discipline, including the incorporation of significant improvements in design and selection of optimal experimental procedures, and advanced methods for analysis of chemical data [2]. With a suitable design of experiments (DoE) as a basis for experimentation, optimal information about an investigated system can be gained and the cost of gaining that information can be minimized. In chemistry and related fields, DoE has been used in the optimization of organic synthesis, peptide design, cheese

manufacture, bread-making, investigation of calibration process parameters, and various other applications [3]. With the continuous technological progress of instrumental techniques for analytical purposes, multiple responses are now easily generated in the study of chemical systems, e.g., NIR, NMR, Raman, MS, and UV-VIS spectra. Multivariate analysis (MVA) applied to this type of chemical responses is mandatory to use all the information contained within the spectra, in the analysis and interpretation of the data. By coupling both chemometric areas, DoE and MVA, a valuable way to study complex chemical systems is created. In this context, such connection has been used, either in a complementary or integral form, in diverse areas, such as product development in a continuous process [4], the development of a drug product [5], size exclusion chromatography for development of silica-based stationary phases [6], for undertaking metabolomic studies [7], for enhancing the performance of cathodes [8], for studying the cadmium biosorption process [9], for studying the effects of physical properties of dosage forms [10], to determine the moisture content in mAb lyophilisates [11], and to create solvent maps to identify safer alternatives to toxic/hazardous solvents, and also in the optimization of an SNAr reaction [12], among others. Despite such a wide range of applications, in the area of optodes for metal ions, although DoE strategies have been employed [13,14], little advantage has been taken from the simultaneous coupling between DoE and MVA concerning the manufacturing and optimization of sensor composition. This article aims to provide evidence of the utility of this approach by integration of the response surface methodology, RSM, an area of DoE, and principal component analysis, PCA, an area of MVA, for optimizing the composition and exposure time of polymer inclusion membrane (PIM) based-optodes for the measurement of metal ions. Along the work, a Doehlert design matrix [15] coupled to the Derringer's desirability function (DF, [16]) is described and analyzed using an algebraic transformation of spectral data before PCA analyses of the responses allows an easy and integral form to optimize PIM optodes for sensing three metals (Hg(II), Cd(II), and Pb(II)) with two chromophore agents (dithizone and PAN). PIMs are a type of membrane in which the chromophore agent is contained within the polymeric network of a non-porous support in the presence or absence of a plasticizer. They have been used for sensing Co(II) [17,18], Al(III) [14,19,20], Zn(II) [21], and Cu(II) [22], among other metal ions. A recent overview of PIM applications, including sensors, has been presented elsewhere [23].

2. Materials and Methods

2.1. Reagents

Cellulose triacetate (CTA, Aldrich, Darmstadt, Germany), 2-nitrophenyl octyl ether (2NPOE 99%, Aldrich), tris(2-ethylhexyl) phosphate (THEP 97%, Aldrich), 1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol (PAN indicator grade, Aldrich), diphenylthiocarbazone (Dithizone A.C.S reagent, Aldrich), dichloromethane (99.99%, J.T. Baker, PA, USA), and ethanol (Analyka, 99.9%) were employed in PIMs preparation. The solutions of metal ions were prepared at a concentration of 2×10^{-5} mol/L employing the following metallic salts: lead nitrate $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (A.C.S reagent 99.5%, Fermont), cadmium nitrate $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (J. T. Baker 99.1%), and mercury nitrate monohydrate $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (A.C.S reagent 99.5%, Fermont). A solution of 2-N-morpholino) ethanesulphonic acid (MES hydrate, >99.5%, Sigma-Aldrich) 10^{-2} mol L^{-1} was employed for buffering the systems.

2.2. Instruments

A Perkin Elmer model Lambda 2 UV/vis spectrophotometer was used to record all absorbance spectra (400 nm–800 nm). The pH of metal solutions was measured using a SevenCompact pH meter S220 with a combined glass electrode Cole-Parmer 62014, Mettler Toledo, Ciudad de México, México. A Burrel 75 mechanical shaker was employed to shake the metal solutions containing the membranes.

2.3. Doehlert Experimental Design

To find the optimal composition of the optode, it is necessary to evaluate the amounts of components used, as well as the agitation time to which the sensor is exposed to the aqueous solution containing the metal. In this way, four factors were evaluated (CTA, plasticizer, and chromophore contents and time), each one at different levels. This led to the Doehlert design matrix being chosen [15], with 21 experiments as shown in Table 1, where the real and coded levels of the variables are indicated. These levels were chosen based on preliminary results, where PIMs were prepared employing different compositions and observations were made with respect to the possibility of membrane formation and its resistance. It is important to mention that along the work, all statistical analyses were performed using coded values of the variables, such that they were not dependent on the measured scale range. As observed, six experimental designs were executed for the individual determination of the three ions (Hg(II), Cd(II), and Pb(II)) in solution: three using dithizone and three using PAN as chromophores.

Table 1. Doehlert matrix employed to study the influence of the membrane composition and the equilibration time on the performance of the optodes. Coded and real values of the variables are indicated.

Experimental Runs	Factor A	Factor B	Factor C	Factor D
	Time	Chromophore	Plasticizer	CTA
1	0 (50 min)	0 (0.53 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
2	1 (80 min)	0 (0.53 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
3	0.5 (65 min)	0.866 (1 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
4	0.5 (65 min)	0.289 (0.68 mg)	0.817 (100 mg)	0 (62.5 mg)
5	0.5 (65 min)	0.289 (0.68 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
6	−1 (20 min)	0 (0.53 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
7	−0.5 (35 min)	−0.866 (0.060 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
8	−0.5 (35 min)	−0.289 (0.37 mg)	−0.817 (25.0 mg)	0 (62.5 mg)
9	−0.5 (35 min)	−0.289 (0.37 mg)	−0.204 (53.13 mg)	−0.791 (25 mg)
10	0.5 (65 min)	−0.866 (0.06 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
11	0.5 (65 min)	−0.289 (0.37 mg)	−0.817 (25 mg)	0 (62.5 mg)
12	0.5 (65 min)	−0.289 (0.37 mg)	−0.204 (53.13 mg)	−0.791 (25 mg)
13	−0.5 (35 min)	0.866 (1.0 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)
14	0 (50 min)	0.577 (0.84 mg)	−0.817 (25 mg)	0 (62.5 mg)
15	0 (50 min)	0.577 (0.84 mg)	−0.204 (53.13 mg)	−0.791 (25 mg)
16	−0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0.817 (100 mg)	0 (62.5 mg)
17	0 (50 min)	−0.577 (0.21 mg)	0.817 (100 mg)	0 (62.5 mg)
18	0 (50 min)	0 (0.53 mg)	0.613 (90.63 mg)	−0.791 (25 mg)
19	−0.5 (35 min)	0.289 (0.68 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
20	0 (50 min)	−0.577 (0.21 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
21	0 (50 min)	0 (0.53 mg)	−0.613 (34.36 mg)	0.791 (100 mg)

2.3.1. Membrane Preparation

PIMs were prepared according to the procedure described elsewhere [24]. Briefly, weighted amounts of CTA, plasticizer (THEP or 2NPOE), and chromophore (PAN or Dithizone, Dz) (see Table 1) were dissolved in a 1:9 (*v/v*) dichloromethane-ethanol mixture. THEP was used for PIMs with PAN while 2NPOE for those with Dz, as good solubility behavior was observed using such combinations. The addition of ethanol during casting ensured PIM homogeneity. The mixture was stirred for 1 h until homogeneity, then poured into a Petri dish (Internal diameter of 5 cm) and allowed to evaporate for 24 h. Then, the membranes were detached from the Petri dish, adding water, and, subsequently, the visible spectrum was acquired.

2.3.2. Measurements

The membranes were shaken in the presence of 30 mL of a solution containing the metal ion, at a concentration of 2×10^{-5} mol/L and pH 6.5, adjusted with 10^{-2} mol/L MES buffer. Each sensor was subjected to stirring at different times, as indicated in the design matrix (see Table 1). Once the agitation was finished, the membrane was dried at

ambient temperature and the visible spectrum was measured to, subsequently, perform the data processing and analysis.

2.4. Optimization

2.4.1. Response Surface Methodology (RSM)

The response surface methodology is a collection of mathematical and statistical techniques based on fitting a polynomial equation to a set of experimental data, in order to make statistical predictions [25]. This approach has been applied in investigations that involve analysis of the interaction of independent variables and their influence on an answer (dependent variables) [26,27]. In the area of PIMs, RMS has been used as a tool to establish the influence of the components of a membrane or pH and concentrations of feed or strip solutions in the determination of different metals [18,28].

2.4.2. Principal Component Analysis (PCA)

This is a data reduction technique that aims to find new variables (principal components) that are linear functions of those in the original dataset, which successively maximize variance and are uncorrelated with each other, preserving as much variability as possible in the data but eliminating noise. PCA as a descriptive tool needs no distributional assumptions and, as such, it is very much an adaptive exploratory method, which can be used on numerical data of various types [29]. The central point is to reduce the original (m,n) data matrix X with m features (variables) and n objects (samples) to the following components parts that are linearly related according to the Equation (1):

$$X = A \cdot F + E \tag{1}$$

where A are factor loadings and F factor scores. So, the linear combination of the loadings and scores that constituted the principal components can reproduce the original data matrix X with a minimal loss of information represented by the matrix of residuals E . In this manner, PCA provides a projection from the high-dimensional feature space on to a space defined by a few factors; they can also be used as a method for graphical representation of multidimensional data [30]. In the present case, the X matrix in Equation (1) is constituted by the combination of VIS spectra (columns) of all PIMs prepared along the 21 experimental runs (rows) for a particular chromophore/metal system, while A and F represent loadings and score matrices, respectively, which define the different principal components used in trying to reduce the number of variables to analyze.

2.4.3. Derringer’s Desirability Function

Before DoE analyses, the individual responses, i.e., PCs or absorbances (Y_i), were first fitted to a polynomial function to give expected values of the responses; then, each estimated response variable was transformed to a desirability value d_i , where $0 \leq d_i \leq 1$ (Equation (2)):

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 0 & Y_i < LSL \\ \left(\frac{Y_i - LSL}{USL - LSL} \right)^s & LSL \leq Y_i \leq USL \\ 1.0 & Y_i > USL \end{cases} \tag{2}$$

where “LSL” and “USL” are the lower and upper specifications limits of the associated response Y_i . The weight exponent “ s ” specifies the form of the response within the range of interest [26]. The value of d_i increases as the desirability of the corresponding response increases for an optimization case in which the estimated response has to be maximized; however, d_i varies if the response is required to be minimized according to Equation (3) [16,31]:

$$d_i(Y_i) = \begin{cases} 1 & Y_i < LSL \\ \left(\frac{USL - Y_i}{USL - LSL} \right)^s & LSL \leq Y_i \leq USL \\ 0 & Y_i > USL \end{cases} \tag{3}$$

The individual desirabilities, d_i , were then combined using a modified geometric mean as:

$$D = \left(d_1^{I_1} \cdot d_2^{I_2} \cdot \dots \cdot d_k^{I_k} \right)^{\frac{1}{\sum I_k}} \quad (4)$$

This single value of D gives the overall assessment of the desirability of the combined response levels. DF is one of the most used methods for optimization of multiple response processes in science and engineering [32]. By considering all responses in measurement through a weighted geometric mean, it provides the possibility of predicting the optimal levels for the independent variables. The function varies between the value of zero, which suggests that the answer is completely unacceptable, to the value of 1, which means that the answer corresponds exactly to the target value. In Equation (4), I_k is the impact coefficient, ranging between 1 and 5 [33]. In the present case, the default value of 3 for all k was assumed, as the goal was to give the same importance to each d_i .

2.4.4. Heat Maps

A heatmap is a two-dimensional visual representation of data using colors, where the colors all represent different values. Heatmaps can provide an efficient and comprehensive overview of a topic at a glance and unlike charts or tables they are direct data visualization tools that are more self-explanatory and easy to read [34].

2.4.5. Hierarchical Cluster Analysis (HCA)

Cluster analysis includes several powerful algorithms and methods for grouping objects of similar kinds into organized categories. It is an exploratory analysis tool that aims to sort different objects into groups in such a way that the degree of association between two objects is maximal if they belong to the same group and minimal if not [35]. The results are visually represented by a two-dimensional dendrogram, a tree diagram that lists each observation according to the similarities (distances) to the others. In hierarchical methods, all objects begin alone in groups of size one, and groups that are closer together are merged. One could use either the original X variables or PCA scores to determine the distance. The usage of PCA scores can provide collinearity and noise reduction benefits but requires the specification of the appropriate number of PCs. Additionally, given the input variables (X variables or PC scores), one can then choose either the Euclidean or the Mahalanobis distance to complete the definition of the distance measure. In the present case, the Mahalanobis distance was used as it accounts for dominant multivariate directions in the data when performing cluster analysis. In the analysis, the desirability values for the three metals at each processing method were reduced by PCA and used as input for the HCA methodology.

2.5. Data Presentation

The optimization was made in three different modes; in the first one (M1), the PCA reduction of the spectra after complexation was performed and the scores values of two first principal components were employed as a response in the experimental design. The second mode (M2) was made by employing both the absorbances of the free chromophore and that of the formed complex as a response in the experimental design. The third mode (M3) was made by first normalizing the VIS spectrum to the highest absorbance value of all the spectra, before and after complexation, to preserve the quantitative relationships that might exist among the absorbance values and, subsequently, subtracting each pair of spectra. This data set was used to perform the PCA reduction and the score values of the two first principal components were used as response variables in the experimental design. VIS spectra were baseline corrected before analyses. Statgraphics Centurion 16 (Statgraphics Technologies, Inc., The Plains, VA USA), Unscrambler 10.5.1 (CAMO Analytics, Oslo, Norway) and PLS-Toolbox 8.7.1 (Eigenvector Research, Inc., Manson, WA, USA), and Plotly Chart Studio (Plotly, Montreal, QC, Canada) software were used for data processing and analysis.

3. Results and Discussions

Since the reactions of the metal ions with the used chromophores form a colored complex, colorimetric detection of these ions can be carried out using polymeric inclusion membranes in which the chromophore is contained in the polymeric network of a non-porous support [23]. The behavior of the PIM used as the optode is determined by its composition, the range of concentrations in which it works, and the time during which the sensor is exposed to the analyte-containing solution [36]. Therefore, parameters, such as the quantities of the components of the membrane and the time of exposure to the solution containing the metal ion, were optimized. This was carried out using a design of experiments approach, which considers all the factors simultaneously to determine the influence of the factors and their interactions on the behavior of the optode. In this case, a four-factor Doehlert matrix was used, each at different levels, as described in the experimental part. One of the main challenges was to find an adequate response for the DoE matrix, in such a way that it preserves most information about the membrane/(membrane+metal) system. Therefore, the three ways (M1, M2, and M3) to evaluate the response and including it in the design of experiments to perform the optimization of the sensor's composition were carried out and subsequently compared. Each mode was employed for sensors made with the three different metal ions (Cd(II), Hg(II), and Pb(II)) and two chromophore agents (Dithizone, Dz, and PAN).

3.1. PCA of the Spectra after Complexation (M1)

In Figure 1, an example of raw spectra data of the PIMs for the Dz-Hg(II) system is shown. As observed, very different VIS spectrum profiles are obtained depending on the membrane composition. Although the most notable change is the baseline shift, the appearance and disappearance of bands at about 500 and 625 nm and their shifts are observed as well. These bands are related to the chromophore and its metal complex. After dimensionality reduction, two PCs explain about 85% of the variability in the data (Figure 2), allowing them to be used as a response in the DoE, and evaluation of their effect in conjunction through the desirability function (Figure 3).

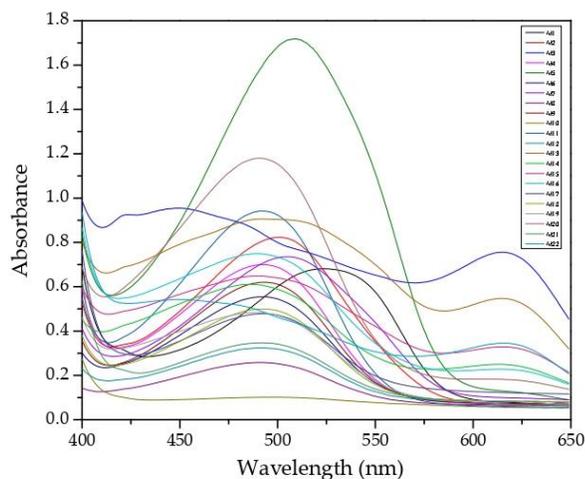


Figure 1. Visible spectra of the membranes after complexation for the system Dz-Hg(II).

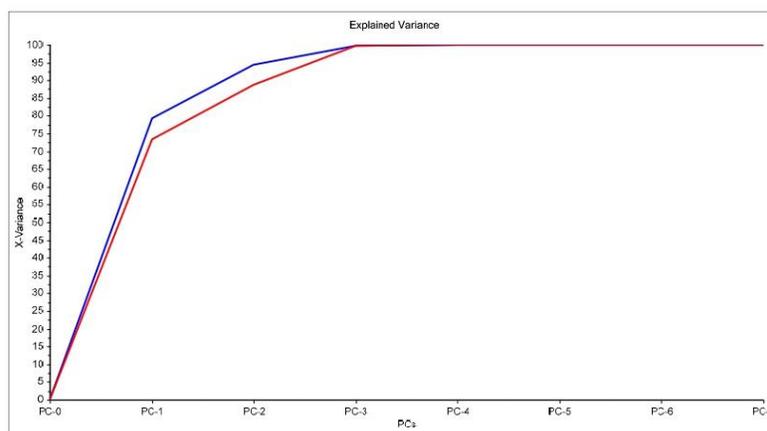


Figure 2. Principal component analysis for the system Dz-Hg(II).

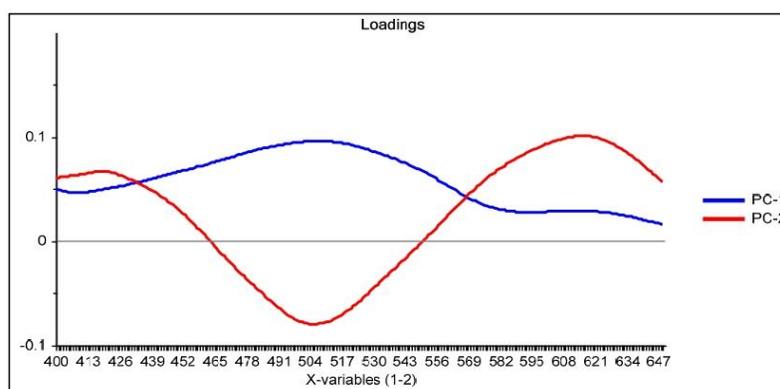


Figure 3. Loading graph of the principal component analysis (PCA) reduction for the system Dz-Hg(II) using the M1 process method of analysis.

From the loadings graph of the first two principal components (Figure 3), which shows the relationship between these new variables and the original ones, it is observed that the region of the spectrum between 490 and 510 nm has a great influence on the first principal component PC-1 (blue line in Figure 3); this region of the spectrum corresponds to the formed Dz-Hg(II) complex.

Similarly, with respect to PC-2 (red line in Figure 3), the influence of the region of the spectrum corresponding to the uncomplexed dithizone (510 and 615 nm) is denoted. After comparison of both loadings, it is clear that an inverse behavior is observed in the zone around 430–560 nm, i.e., positive values for the loadings in PC-1 contrast with negative ones for those of PC-2, meaning that some contributions of this spectral region cancel out. On the contrary, the contributions of both PCs in the region above 560 nm are added together, as both have positive values, indicating that the analysis is strongly affected by the VIS spectral region of the uncomplexed form of the chromophore. This means that the analysis is practically performed based on the reduction in intensity of the band of Dz due to complexation with the metal ion. After the score values of both PCs were considered

as responses in the experimental design for maximization, the fitted equation for their desirability was computed as:

$$D = 0.576507 - 0.09592 \times Dz - 0.235797 \times \text{Time} \times \text{CTA} \tag{5}$$

The significant terms (95% confidence interval), Dz and Time × CTA, were chosen according to the Pareto (Figure 4) and ANOVA (Table 2) analyses. With the response surface of the desirability function, an optimal membrane was then selected (Table 3).

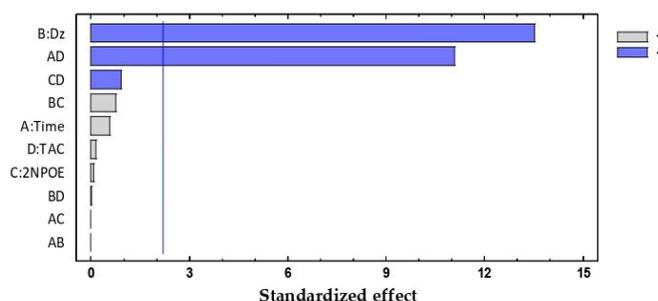


Figure 4. Desirability Pareto chart after DoE analysis for the system Dz-Hg(II).

Table 2. Analysis of variance (ANOVA) results for the system Dz-Hg(II).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	p-Value
A:Time	0.0000836037	1	0.0000836037	0.33	0.5759
B:Dz	0.0460006	1	0.0460006	182.85	0.0000
C:2NPOE	0.0000018768	1	0.0000018768	0.01	0.9327
D:CTA	0.00000643161	1	0.00000643161	0.03	0.8759
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AC	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
AD	0.0309215	1	0.0309215	122.91	0.0000
BC	0.0001458	1	0.0001458	0.58	0.4625
BD	1.26293×10^{-7}	1	1.26293×10^{-7}	0.00	0.9825
CD	0.000213563	1	0.000213563	0.85	0.3766
Total Error	0.00276736	11	0.000251578		
Total (corrected)	0.0840181	21			
R ²	96.7062%				
Adj - R ²	93.7119%				
Standard error	0.0158612				
Std. Dev	0.00881342				

Table 3. Summary of the optimization results for the membranes prepared with PAN and THEP using M1 in the determination of Hg(II), Pb(II), and Cd(II). Coded and real values of the variables are indicated.

Metal	Optimal Composition			
	Time	PAN	THEP	CTA
Hg ²⁺	0.5 (65 min)	-0.289 (0.37 mg)	-0.204 (53.13 mg)	-0.791 (25 mg)
Pb ²⁺	0 (50 min)	-0.577 (0.21 mg)	0.204 (71.86 mg)	0.791 (100 mg)
Cd ²⁺	-0.5 (35 min)	-0.866 (0.600 mg)	0 (62.5 mg)	0 (62.5 mg)

The negative influence on both significant factors indicates that an increase in, for example, the amount of Dz decreases the desirability function. Considering that the desirability function jointly represents the PC-1 and PC-2 responses and these, in turn, are related

to the behavior of the membrane before and after complexation, an increase in the amount of dithizone can chemically be interpreted as the greater the amount of chromophore, the more saturated the membrane becomes.

Therefore, due to the low metal concentration used, the band of the free ligand mask existed with that of the metal complex. Now, regarding the Time*CTA interaction, this means that the time factor affects the response at each CTA level differently. For example, thick membranes with high CTA content must be exposed to short periods of time to obtain a better performance.

Similar to above, the analyses of the systems for the determination of Hg(II) with PAN and Cd(II) and Pb(II) with both extractants were carried out. In the Supplementary Material values of the predicted desirability functions. Pareto and ANOVA analyses of all metals with both extractants are reported. A comparison of these data with the other processing methods (M2 and M3) will be presented in Section 3.4.

3.2. Use of the Absorbances of the Free Chromophore and the Formed Complex (M2)

Searching for an appropriate response to optimize, the maximum values of the absorption bands were tested as a response in the experimental design considering the wavelengths at which the free chromophore band appears (PAN 465 nm, Dithizone 436 nm, and 615 nm) as well as for the metal complex (PAN: Hg 556 and 602 nm, Cd 550 nm, Pb 556 nm; Dithizone: Hg 490 nm, Cd 490 nm, Pb 502 nm). To exemplify this case, the optimization of the membranes prepared using PAN as a chromophore and THEP as a plasticizer for the determination of Pb(II) ions is presented below (Figure 5).

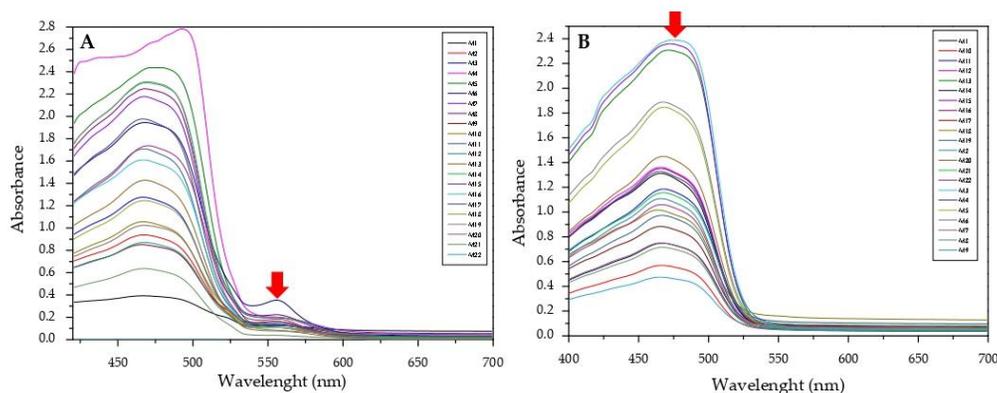


Figure 5. Visible spectra of the membranes before (A) and after complexation (B) for the system PAN–Pb(II).

As clearly observed, the selected bands vary along the experimental design. However, band shifting and distortion are noticeable as well (Figure 5A,B). Once again, the two responses were combined into their desirability function, maximizing the absorption band of the metal complex and minimizing that of the free chromophore:

$$D = 0.535822 + 0.190557 \times \text{PAN} - 0.0859353 \times \text{Time} \times \text{PAN} \quad (6)$$

The significant term (95% confidence interval), PAN, was chosen according to the Pareto (Figure 6) and ANOVA (Table 4) analyses. With the response surface of the desirability function, an optimal membrane was then selected (Table 5).

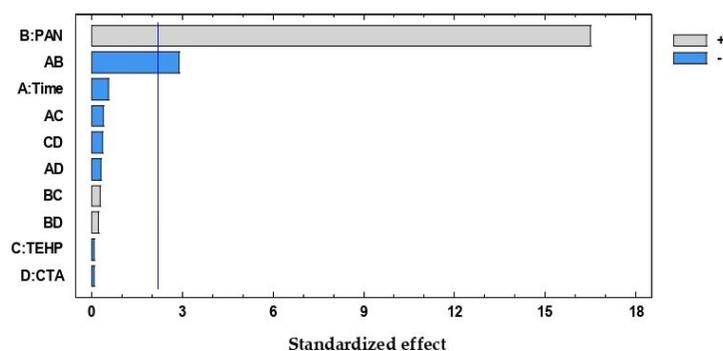


Figure 6. Desirability Pareto chart after DoE analysis for the system PAN-Pb(II).

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) results for the system PAN-Pb(II).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	p-Value
A:Time	0.000200484	1	0.000200484	0.30	0.5941
B: PAN	0.181549	1	0.181549	272.70	0.0000
C:THEP	0.00000417595	1	0.00000417595	0.01	0.9383
D:CTA	0.0000250761	1	0.0000250761	0.00	0.9522
AB	0.00553834	1	0.00553834	8.32	0.0149
AC	0.000100039	1	0.000100039	0.15	0.7057
AD	0.0000556332	1	0.0000556332	0.08	0.7779
BC	0.0000519484	1	0.0000519484	0.08	0.7852
BD	0.0000275653	1	0.0000275653	0.04	0.8425
CD	0.0000784508	1	0.0000784508	0.12	0.7379
Total Error	0.00732311	11	0.000665738		
Total (corrected)	0.197303	21			
R ²	96.2884%				
Adj - R ²	92.9142%				
Standard error	0.0258019				
Std. Dev	0.0135246				

Table 5. Summary of the optimization results for the membranes prepared with PAN using M2 in the determination of Hg(II), Pb(II), and Cd(II).

Metal	Wavelength (nm)		Optimal Composition *
	Free Chromophore (PAN)	Metal Complex	
Hg ²⁺	465	556	8
Pb ²⁺	465	556	13
Cd ²⁺	465	550	14

* Refers to the number of experimental runs in Table 1.

The positive influence of PAN indicates that an increase in the amount of this factor maximizes the response; therefore, the optimal values of this factor correspond to the highest level of the chromophore content. However, as its interaction with time is present, PAN contents cannot be analyzed independently of time, denoting a strong kinetic effect for metal extraction.

Similar to above, the analyses of the systems for the determination of Pb(II) with Dz and Hg(II) and Cd(II) with both extractants were carried out. In the Supplementary Material values of the predicted desirability functions, Pareto and ANOVA analyses and optimal compositions of all metals with both extractants are reported. A comparison of these data with the other preprocessing methods (M1 and M3) will be presented in Section 3.4.

3.3. Subtraction of the Normalized Spectra before and after Complexation before PCA Analysis (M3)

Results of this method are exemplified in the case of the system Cd(II)-PAN. In Figure 7, raw spectral data are shown with their corresponding optode colors. In Figure 8, the results from the spectral subtraction clearly point out that the analysis will be focused in the part of the spectra where the changes are maximal.

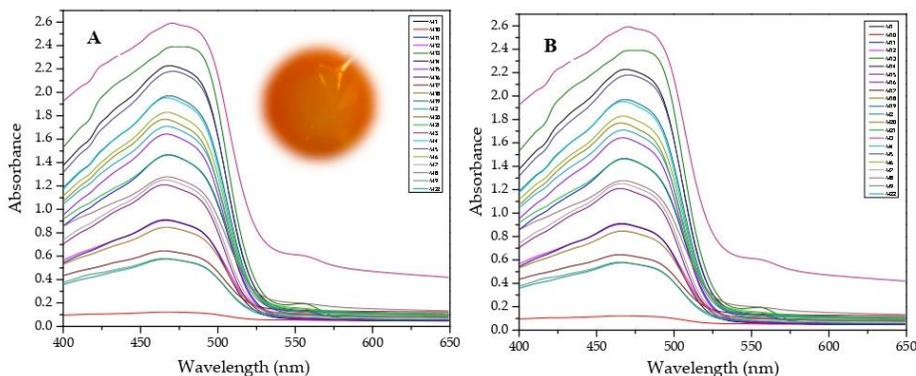


Figure 7. Visible spectra and appearance of the membranes before (A) and after (B) complexation for the system PAN–Cd(II).

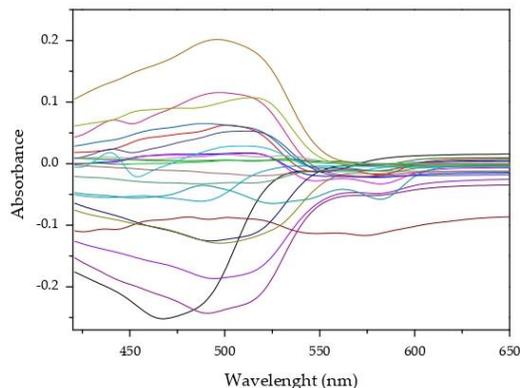


Figure 8. Visible spectra after algebraic transformation for the system PAN–Cd(II).

The PCA reduction led to score values in PC-1 and PC-2 that explain 97% of the variability in the data (Figure 9). Once the PCA reduction was applied (Figure 10), the desirability function was computed, maximizing both responses. Its analysis allowed identification of the significant factors (Pareto chart, Figure 11).

This time the loadings plot (Figure 10) practically showed the same profile as that of the subtracted data with the advantage that the chemical meaning of the data reduction technique is not hidden by the abstract meaning of the principal components. The two responses (PC-1 and PC-2) were finally combined into their desirability function, maximizing the individual desirability:

$$D = 0.45101 + 0.105882 \times \text{PAN} - 0.19029 \times \text{Time} \tag{7}$$

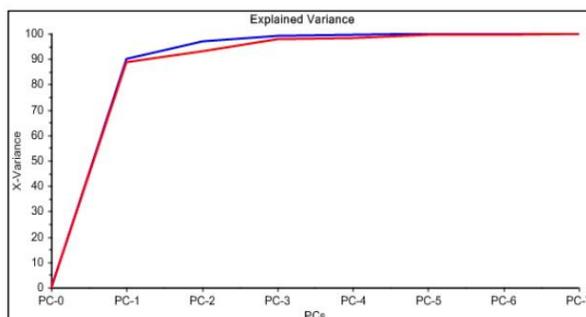


Figure 9. Principal component analysis for the system PAN–Cd(II).

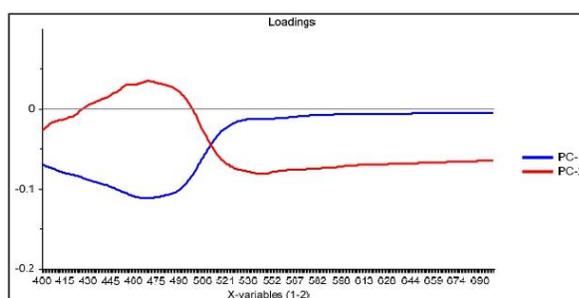


Figure 10. Loadings plot for the M3 processing method in the case of the PAN–Cd(II) PIM optode.

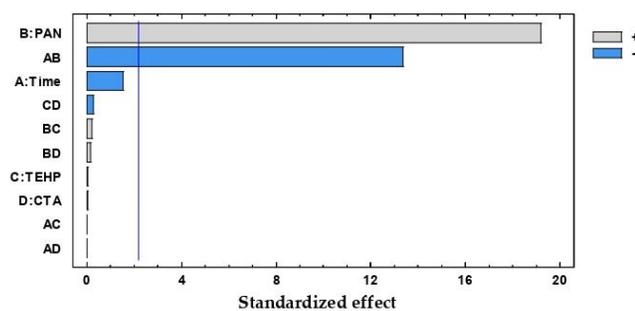


Figure 11. Desirability Pareto chart after DoE analysis for the system PAN–Cd(II).

The significant terms (95% confidence interval), PAN and Time × PAN, were chosen according to the Pareto (Figure 11) and ANOVA (Table 6) analyses. With the response surface of the desirability function, an optimal membrane was then selected (Table 7).

Table 6. Analysis of variance (ANOVA) results for the system PAN-Cd(II).

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	p-Value
A:Time	0.00035041	1	0.00035041	2.30	0.1573
B: PAN	0.0560517	1	0.0560517	368.35	0.0000
C: THEP	2.38862×10^{-7}	1	2.38862×10^{-7}	0.00	0.9691
D: CTA	1.43434×10^{-7}	1	1.43434×10^{-7}	0.00	0.9761
AB	0.0271562	1	0.0271562	178.46	0.0000
AC	3.5837×10^{-8}	1	3.5837×10^{-8}	0.00	0.9880
AD	1.99296×10^{-8}	1	1.99296×10^{-8}	0.00	0.9911
BC	0.00000700214	1	0.00000700214	0.05	0.8341
BD	0.00000371548	1	0.00000371548	0.02	0.8787
CD	0.0000103725	1	0.0000103725	0.07	0.7989
Total Error	0.00167386	11	0.000152169		
Total (corrected)	0.0913495	21			
R ²	98.1676%				
Adj – R ²	96.5018%				
Standard error	0.012357				
Std. Dev	0.00509949				

Table 7. Optimal parameters obtained after applying the M3 processing method.

Metal	Optimal Composition							
	Time	Dithizone	NPOE	CTA	Time	PAN	THEP	CTA
Hg ²⁺	65 min	0.68 mg	71.86 mg	100 mg	50 min	0.53 mg	34.36 mg	100 mg
Cd ²⁺	35 min	0.60 mg	62.5 mg	62.5 mg	35 min	1.0 mg	62.5 mg	62.5 mg
Pb ²⁺	65 min	0.68 mg	71.86 mg	100 mg	35 min	0.6 mg	62.5 mg	62.5 mg

As PAN content had a positive influence, it means that as the amount of PAN increases, the response increases as well; however, this fact is conditioned by the level of the time variable, with a negative behavior, indicating that time and chromophore content are inversely related.

Similar to above, the analyses of the systems for the determination of Cd(II) with Dz and Hg(II) and Cd(II) with both extractants were carried out. In the Supplementary Material values of the predicted desirability functions, Pareto and ANOVA analyses of all metals with both extractants are reported. A comparison of these data with the other processing methods (M1 and M2) will be presented in Section 3.4. In Table 7, the found optimal parameters are shown.

3.4. Comparison of the M1, M2, and M3 Processing Methods

Two full-spectrum methods (M1 and M3) and one band-based method (M2) were employed. To make an easy comparison along the data, taking advantage of the desirability functions with the same metrics independent of the scale and range of the response variable, coded values of the predictive variables were employed, and a heatmap of the coefficients of all primary and binary significant terms in the desirability functions generated by the different processing methods (Table S1) was built (Figure 12). In this form, a uniform representation showing the magnitude of the effects of the chromophore, Plasticizer, and CTA content and time are represented in a common color bar ranging from black to yellow according to the extent of their values. It is observed that overall, the process methods tend to give the same importance to the similar variables, although with different weights. Chromophore content and its interaction with time are variables whose importance was expected considering that the color of the optode is determined by the free form of the agent, the complex formed with the metal ion, and the equilibration time. However, the weight (coefficient) of the chromophore follows the sequence M2 < M1 < M3, indicating that the last method is more susceptible to the importance of this variable. This should be a direct consequence of employing wisely all the spectra information

using M3, as this method focused on the relevant changes after the complexation of the chromophore and the metal has occurred. In contrast, as discussed previously, M2 is subject to band shifting and distortion, and the PCs in M1 cancel out in some way, which is not easy to comprehend due to the abstract meaning of such figures. The association of CTA content with time and chromophore content is also not strange, as the system functions as a whole, and changes in one variable impacts the others. For the system Dz-Pb²⁺ with M3, the highest coefficient values are observed. Interestingly, the plasticizer content, although it plays its role, is not as pronounced as that of the other variables. This may be a consequence of having selected the appropriate plasticizer for each system from the beginning (THEP for PIMs with PAN and 2NPOE for those with Dz) and using contents at relatively high values. Clearly, each processing method gave characteristic results, but it is necessary to mention that direct comparisons cannot be made as the optimized response varies within each method, so that care should be taken when comparing the signs of the coefficient of the different equations.

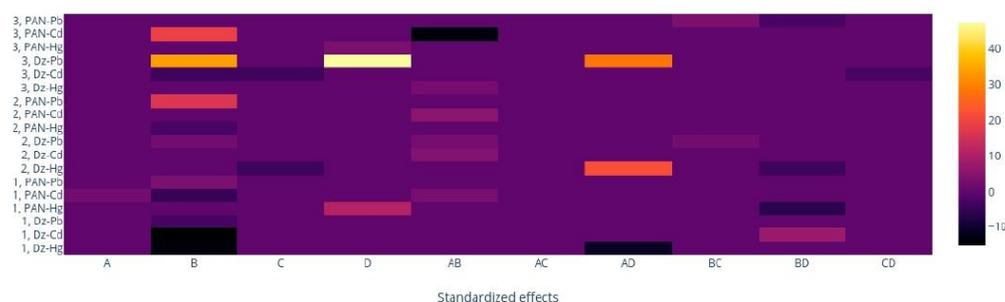


Figure 12. Heatmap of the coefficients of the desirability functions generated by the three different processing methods (M1, M2, M3). A: Time; B: Chromophore. C: Plasticizer; D: CTA.

To further compare the processing methods, HCA analysis was performed as described in Section 2.4.4. Only one PC was necessary as, on average, it accounts for about 97% of the desirability variations. Dendrograms for the desirability values for each processing method are shown in Figure 13. Although, once again, each method tends to cluster the PIMs in a different form (each experiment in Table 1), going from M1 to M3 the method more precisely discerned the differences in the PIMs, as the nodes among samples appeared at longer distances and varyingly distributed in the dendrogram, i.e., M3 is the method that provides more differentiation amongst PIMs.

It is not evident that the second susceptible method to account for variations in the PIMs is a band-based one (M2), considering that band shifting, and distortion were observed. It seems that although M1 is a full-spectrum method, the abstract meaning of the principal components and its property to model according to the greatest sources of variance hides the differences in the parameters one is interested in capturing.

In conclusion, both the heat map and HCA analyses indicate M3 as the method that gives more discernable differences between the PIMs in the DoE design. In addition, using the naked eye, it was found that M3 produces the higher contrast among PIMs on comparing the uncomplexed versus the complexed membranes. This result is summarized in Table 8.

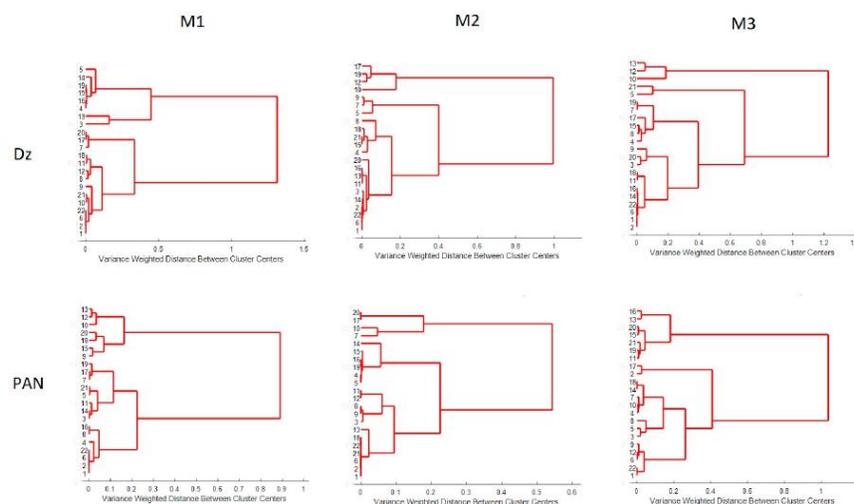


Figure 13. Dendrograms for the desirability values for M1, M2, and M3.

Table 8. Results for optimization using the PIM optodes and the M3 process method.

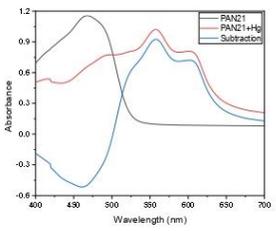
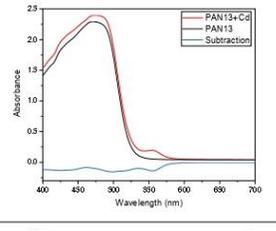
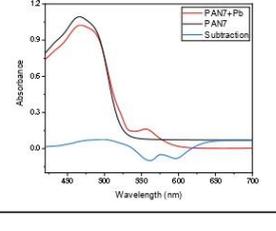
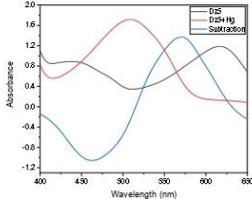
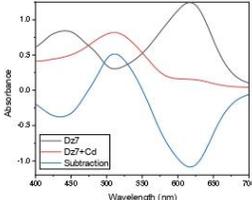
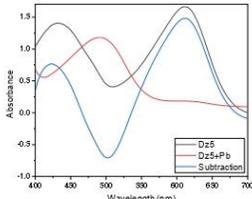
System	Optimal Experiment	Appearance of the Membrane		Spectra
		Before	After	
PAN + Hg	21			
PAN + Cd	13			
PAN + Pb	7			

Table 8. Cont.

System	Optimal Experiment	Appearance of the Membrane		Spectra
		Before	After	
Dz + Hg	5			
Dz + Cd	7			
Dz + Pb	5			

4. Conclusions

The optimization of Hg(II), Cd(II), and Pb(II) optosensors using dithizone and PAN as chromophores to be applied in aqueous solution was carried out successfully by integration of RSM and PCA analyses. The comparison of three different processing methods, i.e., using the score values of the first two components of the PCA data reduction technique of complexed membranes (M1), employing the absorbances of the free chromophore and the formed complex (M2), and using the score values of the first to principal components in PCA after subtraction of the normalized spectra of the membranes before and after complexation (M3), showed that M3 allows detection of more discernable differences between the PIMs in the DoE design, according to both heat map and HCA analyses. Although each processing method gave characteristic results, overall, they tended to give the same importance to similar variables, yet with different weights, according to the ANOVA and Pareto analyses of the coefficients of the PCA reductions of their desirability functions. As M3 focuses on the relevant changes after the complexation of the chromophore and the metal has occurred, the developed full-spectrum method can be used when band-based methods present problems related to overlapping, shifting, and distortion of the signals. In addition, it does not suffer drawbacks associated with the interpretability of full-spectrum methods based only on PCA. Furthermore, HCA clearly showed M3 as the method with more discernable differences between the PIMs in the DoE design, as the nodes among samples appear at longer distances and varyingly distributed in the dendrograms. Due to its easy chemical meaning and the adequate determined color changes, the method is recommended as a novel optimization method for this kind of PIM optode.

Applications to multicomponent detection to deconvolute a more complicated system with even more metal ion components are promising areas of future research.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/membranes11040288/s1>, Tables of the values of all predicated desirability of the multivariate analysis performed with the three processing methods (M1, M2, M3) for all metal ions with the different chromophores, and their corresponding Pareto, ANOVA and RSM analysis. Tables showing color figures of the results of all developed optosensors for each Doehlert design.

Author Contributions: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, writing—original draft preparation, J.G.-B.; resources, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition, E.R.d.S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by DGAPA-UNAM grant number PAPIIT IN229219.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: J. García-Beleño acknowledges CONACyT for her Ph.D. scholarship. The authors are thanked to Q. Nadia Marcela Munguía Acevedo and Q.F.B. María Guadalupe Espejel Maya for technical services.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Santos, M.C.; Nascimento, P.A.M.; Guedes, W.N.; Pereira-Filho, E.R.; Filletti, É.R.; Pereira, F.M.V. Chemometrics in analytical chemistry—An overview of applications from 2014 to 2018. *Eclét. Quím.* **2019**, *44*, 11–25. [CrossRef]
- Duarte, A.C.; Capelo, S. Application of chemometrics in separation science. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2006**, *29*, 1143–1176. [CrossRef]
- Olsson, I.-M. Experimental Designs at the Crossroads of Drug Discovery. Ph.D. Thesis, Umeå University, Umeå, Sweden, 2006.
- Vanhatalo, E.; Vännman, K. Using factorial design and multivariate analysis when experimenting in a continuous process. *Qual. Reliab. Eng. Int.* **2008**, *24*, 983–995. [CrossRef]
- Huang, J.; Kaul, G.; Cai, C.; Chatlapalli, R.; Hernandez-Abad, P.; Ghosh, K.; Nagi, A. Quality by design case study: An integrated multivariate approach to drug product and process development. *Int. J. Pharm.* **2009**, *382*, 23–32. [CrossRef] [PubMed]
- Weatherell, C.J.; Lai, E.P.C. Factorial experimental design and principal component analysis of the interaction of animal glues with polymeric and silica-based stationary phases in size exclusion chromatography. *J. Chromatogr. A* **1994**, *669*, 31–44. [CrossRef]
- Antti, H.; Ebbels, T.M.D.; Keun, H.C.; Bollard, M.E.; Beckonert, O.; Lindon, J.C.; Nicholson, J.K.; Holmes, E. Statistical experimental design and partial least squares regression analysis of biofluid metabonomic NMR and clinical chemistry data for screening of adverse drug effects. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2004**, *73*, 139–149. [CrossRef]
- Babanova, S.; Artyushkova, K.; Ulyanova, Y.; Singhal, S.; Atanassov, P. Design of experiments and principal component analysis as approaches for enhancing performance of gas-diffusional air-breathing bilirubin oxidase cathode. *J. Power Sources* **2014**, *245*, 389–397. [CrossRef]
- Bhateria, R.; Dhaka, R. Optimization and statistical modelling of cadmium biosorption process in aqueous medium by *Aspergillus niger* using response surface methodology and principal component analysis. *Ecol. Eng.* **2019**, *135*, 127–138. [CrossRef]
- Thapa, P.; Choi, D.H.; Kim, M.S.; Jeong, S.H. Effects of granulation process variables on the physical properties of dosage forms by combination of experimental design and principal component analysis. *Asian J. Pharm. Sci.* **2019**, *14*, 287–304. [CrossRef] [PubMed]
- Clavaud, M.; Lema-Martinez, C.; Roggo, Y.; Bigalke, M.; Guillemain, A.; Hubert, P.; Ziemons, E.; Allmendinger, A. Near-Infrared Spectroscopy to Determine Residual Moisture in Freeze-Dried Products: Model Generation by Statistical Design of Experiments. *J. Pharm. Sci.* **2020**, *109*, 719–729. [CrossRef]
- Murray, P.M.; Bellany, F.; Benhamou, L.; Bučar, D.K.; Tabor, A.B.; Sheppard, T.D. The application of design of experiments (DoE) reaction optimisation and solvent selection in the development of new synthetic chemistry. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2373–2384. [CrossRef] [PubMed]
- Kazemi, S.Y.; Hamidi, A.S.; Zolgharnein, J.; Lakouraj, M.M. Experimental design as an optimization approach for fabrication a new selective sensor for thallium(I) based on calix [6] arene. *J. Anal. Chem.* **2014**, *69*, 646–655. [CrossRef]
- Ngarisan, N.I.; Ngah, C.W.Z.C.W.; Ahmad, M.; Kuswandi, B. Optimization of polymer inclusion membranes (PIMs) preparation for immobilization of Chrome Azurol S for optical sensing of aluminum(III). *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *203*, 465–470. [CrossRef]
- Ferreira, S.L.C.; Dos Santos, W.N.L.; Quintella, C.M.; Neto, B.B.; Bosque-Sendra, J.M. Doehlert matrix: A chemometric tool for analytical chemistry—Review. *Talanta* **2004**, *63*, 1061–1067. [CrossRef] [PubMed]

16. Derringer, G.; Suich, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* **1980**, *12*, 214–219. [CrossRef]
17. Suah, F.B.M. Preparation and characterization of a novel Co(II) optode based on polymer inclusion membrane. *Anal. Chem. Res.* **2017**, *12*, 40–46. [CrossRef]
18. Shirzad, M.; Karimi, M. Statistical analysis and optimal design of polymer inclusion membrane for water treatment by Co(II) removal. *Desalin. Water Treat.* **2020**, *182*, 194–207. [CrossRef]
19. Suah, F.B.M.; Ahmad, M.; Heng, L.Y. Highly sensitive fluorescence optode for aluminium(III) based on non-plasticized polymer inclusion membrane. *Sens. Actuators B Chem.* **2014**, *201*, 490–495. [CrossRef]
20. Suah, F.B.M.; Ahmad, M. Preparation and characterization of polymer inclusion membrane based optode for determination of Al³⁺ ion. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *951*, 133–139. [CrossRef]
21. Wang, D.; Liu, J.; Chen, J.; Liu, Q.; Zeng, H. New insights into the interfacial behavior and swelling of polymer inclusion membrane (PIM) during Zn(II) extraction process. *Chem. Eng. Sci.* **2020**, *220*, 115620. [CrossRef]
22. Jayawardane, B.M.; Coo, L.D.L.C.; Cattrall, R.W.; Kolev, S.D. The use of a polymer inclusion membrane in a paper-based sensor for the selective determination of Cu(II). *Anal. Chim. Acta* **2013**, *803*, 106–112. [CrossRef]
23. Almeida, M.I.G.S.; Cattrall, R.W.; Kolev, S.D. Polymer inclusion membranes (PIMs) in chemical analysis—A review. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *987*, 1–14. [CrossRef]
24. Rodríguez de San Miguel, E.; Hernández-Andaluz, A.M.; Bañuelos, J.G.; Saniger, J.M.; Aguilar, J.C.; de Gyves, J. LIX®-loaded polymer inclusion membrane for copper(II) transport. 1. Composition-performance relationships through membrane characterization and solubility diagrams. *Mater. Sci. Eng. A* **2006**, *434*, 30–38. [CrossRef]
25. Myers, R.H.; Montgomery, D.C.; Anderson-Cook, C.M. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*; Wiley: New York, NY, USA, 2016; p. 856; ISBN 978-1-118-91601-8.
26. Henrique, A.; Karimi, M.; Silva, J.A.C.; Rodrigues, A.E. Analyses of Adsorption Behavior of CO₂, CH₄, and N₂ on Different Types of BETA Zeolites. *Chem. Eng. Technol.* **2019**, *42*, 327–342. [CrossRef]
27. Karimi, M.; Silva, J.A.C.; Gonçalves, C.N.D.P.; Diaz De Tuesta, J.L.; Rodrigues, A.E.; Gomes, H.T. CO₂ Capture in Chemically and Thermally Modified Activated Carbons Using Breakthrough Measurements: Experimental and Modeling Study. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2018**, *57*, 11154–11166. [CrossRef]
28. Rojas-Challa, Y.; Rodríguez de San Miguel, E.; de Gyves, J. Response Surface Methodology Approach Applied to the Study of Arsenic (V) Migration by Facilitated Transport in Polymer Inclusion Membranes. *Water Air Soil Pollut.* **2020**, *231*, 1–12. [CrossRef]
29. Jolliffe, I.T.; Cadima, J. Principal component analysis: A review and recent developments. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **2016**, *374*, 20150202. [CrossRef]
30. Einax, J.W.; Zwanziger, H.W.; Geiß, S. *Chemometrics in Environmental Analysis*; American Chemical Society: NJ, USA, 1998; ISBN 3-527-28772-8. Available online: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja975630o> (accessed on 14 April 2021).
31. Akçay, H.; Anagün, A.S. Multi response optimization application on a manufacturing factory. *Math. Comput. Appl.* **2013**, *18*, 531–538. [CrossRef]
32. Mang, D.Y.; Abdou, A.B.; Njintang, N.Y.; Djiogue, E.J.M.; Louira, B.B.; Mbofung, M.C. Application of desirability-function and RSM to optimize antioxidant properties of mucuna milk. *J. Food Meas. Charact.* **2015**, *9*, 495–507. [CrossRef]
33. *STATGRAPHICS Diseño de Experimentos—Optimización de Múltiples Respuestas. Manual del Usuario*; StatPoint, Inc.: Madrid, Spain, 2006; pp. 1–16.
34. Available online: <https://www.investopedia.com/terms/h/heatmap.asp> (accessed on 24 February 2021).
35. Hanrahan, G. *Environmental Chemometrics. Principles and Modern Applications*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2019; ISBN 9780367386344.
36. McDonagh, C.; Burke, C.S.; MacCraith, B.D. Optical chemical sensors. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 400–422. [CrossRef] [PubMed]

” Se hacen eternas cuando las quieren
Y siempre viven, y nunca mueren
Cuando se duermen son indefensas
Y se despiertan cuando las piensas
Si las atacan y las defienden
Las más valiosas nunca se venden
Alcanzan todo lo que desean
Así de grandes son las ideas.

— **Así de grandes son las ideas**

Calle 13