



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA

***Diseño de un sistema de lengua electrónica basado en
técnicas electroquímicas voltamétricas y su aplicación en el
ámbito agroalimentario***

Doctorando: Miguel Alcañiz Fillol

Directores: Juan Soto Camino
José Manuel Barat Baviera
Luis Gil Sánchez

Valencia, 2011

A mi madre

Es un error capital el teorizar antes de poseer datos. Insensiblemente uno comienza a alterar los hechos para encajarlos en las teorías, en lugar de encajar las teorías en los hechos
Sherlock Holmes (Sir Arthur Conan Doyle)

Resumen

En los últimos años, las lenguas electrónicas se han convertido en una excelente alternativa a los métodos tradicionales de análisis para el control de los procesos y los productos en el ámbito agroalimentario. Se trata de sistemas que, mediante técnicas electroquímicas como la potenciometría o la voltametría combinadas con herramientas de análisis multivariante, son capaces de clasificar muestras y cuantificar sus parámetros fisicoquímicos. Su principal ventaja con respecto a los métodos tradicionales es que permiten la realización de medidas rápidas y económicas, evitando el preprocesado de la muestra y la necesidad de contar con personal cualificado para llevar a cabo los análisis. Su funcionamiento se basa en la utilización de sensores de sensibilidad cruzada, lo que permite medir muestras en las que existan interferencias entre los distintos compuestos que las integran.

En la presente tesis se ha desarrollado un sistema de lengua electrónica basado en las técnicas de voltametría y espectroscopía de impedancias. El sistema diseñado consta de una aplicación de PC y de un Equipo Electrónico de Medida que es capaz de llevar a cabo ensayos de voltametría cíclica y voltametría de pulsos sobre un total de 10 electrodos de trabajo. También se pueden realizar medidas de espectroscopía de impedancias en un rango de frecuencias de 1 Hz a 200 kHz. El Equipo Electrónico de Medida dispone de un potencióstato, lo que posibilita la implementación de ensayos en configuración de tres electrodos tanto de voltametría como de espectroscopía de impedancias. El software desarrollado permite no solo la realización de los ensayos sino también el almacenamiento de los datos correspondientes a las medidas obtenidas, su preprocesado y la generación de los ficheros necesarios para llevar a cabo el posterior análisis multivariante.

El sistema ha sido caracterizado eléctricamente obteniéndose unos niveles de precisión y exactitud excelentes para la técnica de voltametría y niveles aceptables para la espectroscopía de impedancias. Además se llevaron a cabo ensayos de validación del equipo para voltametría cíclica y para voltametría de pulsos. Los resultados de estas pruebas demostraron que el sistema diseñado es capaz de reproducir las medidas de un sistema comercial (Autolab) y de clasificar muestras de zumos de distinta naturaleza.

Por último, como aplicaciones de la lengua voltamétrica se realizaron dos experiencias relacionadas con el ámbito agroalimentario. En primer lugar se

midieron disoluciones de antioxidantes (ácidos ascórbico, cítrico y málico) con siete electrodos de metales nobles y no nobles aplicando la voltametría cíclica y de pulsos. Para el estudio de los datos y la generación de los modelos predictivos se utilizaron el análisis de componentes principales (PCA) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Los resultados obtenidos demostraron que era posible cuantificar con precisión la concentración de los tres ácidos tanto en disoluciones simples como en mezclas binarias. También se observó que los modelos generados con la configuración de lengua electrónica (combinación de los siete electrodos) eran tan buenos como los obtenidos con cualquiera de los electrodos por separado.

En la segunda experiencia se comprobó la validez del sistema diseñado para la detección de glifosato, un herbicida de extensa aplicación en la agricultura. Se aplicó la voltametría de pulsos a una lengua electrónica formada por ocho electrodos de diversos metales para medir disoluciones con distintas concentraciones de glifosato, y se construyeron los modelos predictivos correspondientes mediante PLS. En este caso, los electrodos de cobre y cobalto mostraron mejor comportamiento que la combinación de los ocho electrodos. Con el objetivo de mejorar la resolución de las medidas a bajas concentraciones, se llevaron a cabo nuevos ensayos con estos dos electrodos en configuración de electrodo rotatorio (RDE). Los resultados obtenidos mostraron cómo la aplicación de la voltametría de pulsos al electrodo RDE de cobre permite obtener modelos predictivos fiables y robustos para la cuantificación del glifosato a concentraciones de hasta 10^{-5} M.

Se ha demostrado la capacidad del sistema de lengua electrónica voltamétrica para generar modelos de predicción que permiten la cuantificación de distintos compuestos en disoluciones y mezclas. Dados los buenos resultados obtenidos se han puesto en marcha nuevas experiencias cuyo objetivo es la cuantificación de parámetros fisicoquímicos en alimentos y otras matrices complejas como aguas residuales.

Resum

En els darrers anys, les llengües electròniques han suposat una excel·lent alternativa als mètodes tradicionals d'anàlisi per al control dels processos i els productes en l'àmbit agroalimentari. Es tracta de sistemes que, per mitjà de tècniques electroquímiques com la potenciometria o la voltametria combinades amb eines d'anàlisi multivariant, permeten classificar les mostres i quantificar els seus paràmetres fisicoquímics. El seu principal avantatge respecte dels mètodes tradicionals és que permeten la realització de mesures ràpides i econòmiques, evitant el preprocesat de la mostra i la necessitat de comptar amb el personal qualificat per a dur a terme l'anàlisi. El seu funcionament es basa en la utilització de sensors de sensibilitat creuada, el que permet mesurar mostres en les quals existisquen interferències entre els diversos compostos que les integren.

En aquesta tesi s'ha desenvolupat un sistema de llengua electrònica que es basa en les tècniques de voltametria i espectroscòpia d'impedàncies. El sistema dissenyat consta d'una aplicació d'ordinador i d'un Equip Electrònic de Mesura que pot desenvolupar assajos de voltametria cíclica i voltametria de polsos sobre un total de 10 elèctrodes de treball. També es poden realitzar mesures d'espectroscòpia d'impedàncies en un rang de freqüències d'1 Hz a 200 kHz. L'Equip Electrònic de Mesura disposa d'un potenciostat, el que possibilita la implementació d'assajos en configuració de tres elèctrodes tant de voltametria com d'espectroscòpia d'impedàncies. El software desenvolupat permet no tan sols la realització dels assajos sinó també l'emmagatzemament de les dades corresponents a les mesures obtingudes, el seu preprocesat i la generació dels fitxers necessaris per a desenvolupar el posterior anàlisi multivariant.

El sistema ha sigut caracteritzat elèctricament obtenint-se uns nivells de precisió i exactitud excel·lents per a la tècnica de voltametria i nivells acceptables per a la espectroscòpia d'impedàncies. A més a més se desenvoluparen assajos de validació de l'equip per a voltametria cíclica i per a voltametria de polsos. Els resultats d'aquestes proves demostraren que el sistema dissenyat és capaç de reproduir les mesures d'un sistema comercial (Autolab) i de classificar mostres de suc de fruites de diversa naturalesa.

Finalment, com a aplicacions de la llengua voltamètrica es van realitzar dos experiències relacionades amb l'àmbit agroalimentari. En primer lloc es van

mesurar dissolucions d'antioxidants (àcids ascòrbic, cítric i màlic) amb set elèctrodes de metalls nobles i no nobles aplicant-se la voltametria cíclica i de polsos. Per a l'estudi de les dades i la generació dels models predictius es van utilitzar l'anàlisi de components principals (PCA) i la regressió per mínims quadrats parcials (PLS). Els resultats obtinguts demostraren que era possible quantificar amb precisió la concentració dels tres àcids tant en dissolucions simples com en mescles binàries. També es va observar com els models generats amb la configuració de llengua electrònica (combinació dels set elèctrodes) eren tan bons com els obtinguts amb qualsevol dels elèctrodes per separat.

En la segona experiència es va comprovar la validesa del sistema dissenyat per a la detecció del glifosat, un herbicida d'extensa aplicació en l'agricultura. Es va aplicar la voltametria de polsos a una llengua electrònica formada per vuit elèctrodes de diversos metalls per a mesurar dissolucions amb diferents concentracions de glifosat, i es van construir els models predictius corresponents per mitjà de PLS. En aquest cas, els elèctrodes de coure i cobalt mostraven millor comportament que la combinació dels vuit elèctrodes. Amb l'objectiu de millorar la resolució de les mesures a baixes concentracions, es van dur a terme nous assajos amb estos dos elèctrodes en configuració d'elèctrode rotatori (RDE). Els resultats obtinguts mostraren com l'aplicació de la voltametria de polsos a l'elèctrode RDE de coure permet obtenir models predictius fiables i robustos per a la quantificació del glifosat a concentracions de fins 10^{-5} M.

S'ha demostrat la capacitat del sistema de llengua electrònica voltamètrica per a generar models de predicció que permeten la quantificació de diversos compostos en dissolucions i mescles. Donats els bons resultats obtinguts s'han posat en marxa noves experiències l'objectiu de les quals és la quantificació de paràmetres fisicoquímics en aliments i altres matrius complexes com ara aigües residuals.

Abstract

In recent years, electronics tongues have appeared as an excellent alternative to traditional analysis methods for product and process control in food and agriculture industry. These systems combine electrochemical techniques such as potentiometry or voltammetry with multivariate analysis tools in order to classify samples or quantify their physicochemical properties. Their main advantage compare to traditional methods is that they allow the implementation of fast and low-cost measurements avoiding the pre-processing of the samples and the need of qualified operators to carry out the analyses. Their operation is based on the use of cross-sensitive sensors, which allow the measurement of samples where interferences between the different compounds exist.

In the present thesis an electronic tongue system based on voltammetry and impedance spectroscopy has been developed. The designed system consists of a PC software application and an Electronic Measurement Equipment able to carry out cyclic and pulse voltammetry measurements on up to 10 working electrodes. Impedance spectroscopy measurements in the range of frequencies from 1 Hz to 200 kHz can also be performed. The Electronic Measurement Equipment includes a potentiostat that enables the implementation of voltammetry and impedance spectroscopy tests in three electrodes mode. The software application allows the configuration of the measurements, the storage and the pre-processing of the collected data and the generation of the files needed to carry out the multivariate analysis.

The system has been electrically tested and excellent accuracy and precision levels for voltammetry and acceptable levels for impedance spectroscopy were obtained. Besides validation tests have been carried out for cyclic and pulse voltammetry. The results of these tests show that the designed system was able to reproduce the measurements done with a commercial equipment (Autolab) and to classify different fruit juice samples.

Finally, the voltammetric electronic tongue was applied in two experiments related to food and agriculture. Firstly, antioxidant solutions (ascorbic, citric and malic acids) were measured with seven noble and non-noble metal electrodes using cyclic and pulse voltammetry. Principal Components Analysis (PCA) and Partial Least Squares regression (PLS) were used to examine the data and to generate the prediction models. The results obtained demonstrate that it is possible to precisely quantify the concentration of the three acids both

in simple and binary solutions. It was also observed that the prediction models generated in electronic tongue configuration (combination of the seven electrodes) were as good as the models obtained with any of the electrodes.

In a second experience, the ability of the system to detect glyphosate, a herbicide broadly applied in agriculture, was evaluated. Pulse voltammetry was applied to an electronic tongue made of eight metallic electrodes to measure solutions with different concentration levels of glyphosate, and the corresponding predictive models were generated with PLS. In this case, copper and cobalt electrodes showed better results than the combination of the eight electrodes. In order to improve the resolution of the measurements at low concentration levels, new tests were carried out with these two metals in rotating disk electrode (RDE) configuration. The results obtained show that the application of the pulse voltammetry to rotating disk electrodes allows the generation of robust and reliable prediction model for the quantification of glyphosate at concentration levels down to 10^{-5} M.

The ability of the voltammetric electronic tongue system to quantify different compounds in simple solutions and mixtures has been demonstrated. In view of the good results, new experiments have been started with the objective of quantifying physicochemical properties of foodstuffs and other complex matrices as wastewaters.

Prólogo

La industria agroalimentaria es uno de los sectores con más peso en la economía mundial. La innovación se ha convertido en una prioridad para esta industria y gran parte de los esfuerzos realizados en las últimas décadas han ido encaminados al desarrollo de sistemas de medida rápidos, económicos y no destructivos que permitan garantizar la seguridad alimenticia, optimizar el control de procesos y facilitar el análisis del producto. La principal dificultad que entraña el diseño de este tipo de sistemas radica en la naturaleza multifásica de los alimentos y en las interferencias que se producen entre las distintas especies que los componen. Dichas interferencias limitan la eficacia de los métodos de medida tradicionales basados en sensores selectivos. Las narices y las lenguas electrónicas han surgido en los últimos años como alternativa a estos métodos tradicionales. Son sistemas de medida basados en sensores de sensibilidad cruzada que, combinados con herramientas de análisis multivariante, permiten la generación de modelos de clasificación y predicción de parámetros fisicoquímicos en alimentos y otro tipo de matrices complejas.

En la presente tesis se ha llevado a cabo el diseño y la validación experimental de una lengua electrónica basada en técnicas electroquímicas voltamétricas. Dicho sistema, del cual ya se han construido 7 prototipos, ha sido y está siendo utilizado en numerosas experiencias realizadas por el Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) y por el Departamento de Tecnología de Alimentos. En esta tesis se describen dos de ellas: la cuantificación de antioxidantes en disoluciones y la detección del herbicida glifosato. Además, el sistema diseñado se está aplicando en otros trabajos como la evaluación de la calidad de carne de cerdo, la optimización de los ciclos de funcionamiento de una lavadora, el análisis de aguas residuales y la monitorización de la degradación del ácido ascórbico en zumos.

Aunque la presente tesis tiene un marcado carácter electrónico, para su desarrollo ha sido necesaria la integración de otras áreas de conocimiento como la electroquímica, la tecnología de alimentos y la estadística. Dado el carácter multidisciplinar de la tesis y para facilitar la comprensión de la misma se ha decidido estructurarla de la siguiente forma:

- Un primer apartado de Introducción en el que se examina el estado del arte de la tecnología de lenguas electrónicas, indicando sus tipos y sus

principales aplicaciones. También se hace un breve repaso de las distintas técnicas electroquímicas existentes incidiendo especialmente en las técnicas voltamétricas. Además se analizan los sistemas electrónicos y los electrodos utilizados en la implementación de dichas técnicas. Por último, se describen las técnicas de análisis multivariante que van a emplearse en el procesado de los datos.

- En el apartado de Objetivos se enumeran los objetivos que se pretenden alcanzar en el desarrollo de la tesis.
- El Capítulo 1 describe el sistema diseñado tanto a nivel de hardware como de software, y en él se explican los ensayos llevados a cabo para su caracterización eléctrica y validación. Además se detallan los electrodos utilizados en las experiencias de antioxidantes y glifosato.
- En el Capítulo 2 se describen las dos experiencias realizadas con antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico). En la primera tanda de ensayos se aplica la voltametría de pulsos para cuantificar la concentración de los tres tipos de antioxidantes en disoluciones simples. En la segunda se determina la concentración de los antioxidantes pero esta vez en mezclas binarias de ascórbico y cítrico por un lado y ascórbico y málico por otro.
- El Capítulo 3 incluye la descripción de las experiencias llevadas a cabo con el fin de desarrollar una técnica basada en la voltametría de pulsos que permita la detección del glifosato. Las primeras experiencias tienen como objetivo intentar cuantificar el glifosato con distintos metales nobles y no nobles en configuración de lengua electrónica. En la segunda parte de este capítulo se detallan los ensayos conducentes a la mejora de la resolución de la medida mediante el uso de electrodos rotatorios (RDE).
- Conclusiones finales.
- Líneas futuras.
- Referencias bibliográficas.

Producción científica

Hasta la fecha de la publicación de esta tesis, la producción científica derivada o relacionada con la misma ha sido la siguiente:

Publicaciones SCI

R. Masot, M. Alcañiz, A. Fuentes, F. C. Schmidt, J. M. Barat, L. Gil, D. Baigts, R. Martínez-Máñez, J. Soto. *Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy*. Sensors and Actuators A 158 (2010) 217-223.

R. H. Labrador, R. Masot, M. Alcañiz, D. Baigts, R. Bataller, J. Soto, R. Martínez-Máñez, E. García-Breijo, L. Gil, José M. Barat. *Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor*. Food Chemistry 122 (2010) 864–870.

I. Campos, R. Masot, M. Alcañiz, L. Gil, J. Soto, J. L. Vivancos, E. García-Breijo, R. H. Labrador, J. M. Barat, R. Martínez-Máñez. *Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue*. Sensors & Actuators: B. Chemical. Volume 149 (2010) Pages 71-78.

J. D. Escobar, M. Alcañiz, R. Masot, A. Fuentes, R. Bataller, J. Soto, J. M. Barat. *Quantification of organic acids using voltammetric tongues*. Food Chemistry. Enviado.

Congresos

L. Gil, M. Alcañiz, R. Masot, E. García-Breijo, J. Ibáñez, J. Garrigues. *Desarrollo de sistemas de lenguas electrónicas con distintas técnicas de medida. Aplicación al análisis de aguas y de alimentos*. III Workshop on Sensors and Molecular Recognition. Valencia – España. Julio 2009.

Divulgación

Telediario 1 de TVE 14 de Noviembre de 2010.

Índice

Introducción.....	1
1. Concepto de lengua electrónica	1
1.1. Sentido del gusto biológico.....	1
1.2. Definición de lengua electrónica	4
2. Técnicas electroquímicas de medida.....	6
2.1. Procesos electroquímicos en el electrodo	6
2.2. Clasificación de los métodos electroquímicos de medida	12
2.3. Potenciometría	13
2.4. Técnicas voltamétricas.....	15
2.5. Culombimetría	25
2.6. Espectroscopía de impedancias.....	26
3. Tipos de lenguas electrónicas.....	28
3.1. Lenguas electrónicas potenciométricas.....	28
3.2. Lenguas electrónicas voltamétricas	31
3.3. Otras lenguas electrónicas.....	35
3.4. Sistemas híbridos	38
4. Sistemas electrónicos para lenguas electrónicas	40
4.1. Sistemas electrónicos para medidas potenciométricas.....	40
4.2. Sistemas electrónicos para medidas voltamétricas	41
4.3. Potenciostato	42
5. Electroodos.....	49
5.1. Electroodos de referencia.....	49
5.2. Electroodos indicadores o de trabajo	52
6. Procesado de datos	54
6.1. Tratamiento previo de los datos	57
6.2. Análisis de componente principales (PCA)	60
6.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)	62
 Objetivos de la tesis	 64
 Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida.....	 64

1. Antecedentes. Especificaciones del diseño	64
1.1. Diagrama general del sistema de medida	64
2. Descripción del hardware del Equipo Electrónico de Medida	64
2.1. Bloque de procesamiento digital	64
2.2. Módulo del convertidor digital-analógico (DAC).....	64
2.3. Módulo del convertidor analógico-digital (ADC).....	64
2.4. Circuitos de selección de técnica	64
2.5. Circuitos de adaptación de señal	64
2.6. Potenciostato	64
2.7. Alimentación del equipo	64
2.8. Tratamiento del ruido	64
3. Descripción del software del Equipo Electrónico de Medida.	64
3.1. Herramientas de desarrollo	64
3.2. Descripción general del código del μ C	64
3.3. Organización de la memoria	64
3.4. Módulo de comunicación.....	64
3.5. Módulo de configuración del ensayo	64
3.6. Módulo de generación de señal y muestreo	64
4. Código de la aplicación de PC	64
4.1. Módulo de Configuración	64
4.2. Módulo de Voltametría de pulsos	64
4.3. Módulo de Voltametría cíclica.....	64
4.4. Módulo de Espectroscopía de Impedancias	64
5. Electroodos.....	64
5.1. Lengua electrónica (ET).....	64
5.2. Electrodo rotatorio (RDE).....	64
5.3. Limpieza de los electrodos de trabajo	64
6. Caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida.....	64
6.1. Caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida para voltametría	64
6.2. Caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida para espectroscopía de impedancias	64
7. Validación experimental del sistema de medida	64
7.1. Validación experimental del sistema de medida para voltametría cíclica	64
7.2. Validación experimental del sistema de medida para voltametría de pulsos.....	64
8. Aspecto final	64
9. Conclusiones	64

Capítulo 2. Aplicación a la medida de antioxidantes en disoluciones.	64
1. Introducción	64
2. Estudios de voltametría cíclica en disoluciones simples.....	64
2.1. Material y métodos.	64
2.2. Resultados y discusión.....	64
2.3. Conclusiones	64
3. Estudios de voltametría pulsos en disoluciones simples	64
3.1. Material y métodos	64
3.2. Resultados y discusión.....	64
3.3. Conclusiones	64
4. Estudios de voltametría pulsos en disoluciones binarias.....	64
4.1. Material y métodos.	64
4.2. Resultados y discusión.....	64
4.3. Conclusiones	64
 Capítulo 3. Aplicación a la detección de glifosato	64
1. Introducción	64
2. Experiencia con electrodos en configuración de lengua electrónica.....	64
2.1. Materiales y métodos	64
2.2. Resultados y discusión.....	64
2.3. Conclusiones	64
3. Experiencia con electrodos rotatorios (RDE).....	64
3.1. Material y métodos	64
3.2. Resultados y discusión.....	64
3.3. Conclusiones	64
 Conclusiones finales	64
 Líneas futuras	64
 Referencias bibliográficas.....	64

Introducción

1. Concepto de lengua electrónica

1.1. *Sentido del gusto biológico*

Sistema sensorial

El ser humano hace uso continuamente de sus cinco sentidos para el desempeño de sus tareas cotidianas. Por ejemplo, para algo tan sencillo como probar un plato de sopa necesitamos la vista para localizar el plato y supervisar el movimiento del brazo, el tacto para coger la chuchara con la fuerza justa y, por último, el olfato y el gusto para saborear la sopa y determinar si nuestra madre ha acertado en el punto de sal. Y aunque tenemos la sensación de que mediante nuestros sentidos percibimos el mundo exterior tal y como es, en realidad la única información que le llega a nuestro cerebro de ese mundo exterior son impulsos eléctricos que viajan a través de nuestro sistema nervioso [1].

En efecto, la información sensitiva viaja en forma de potenciales de acción de igual amplitud pero de frecuencia variable, que son discriminados en el cerebro. Éste no determina el tipo de estímulo en función del potencial de acción ya que todos son iguales, sino en función del canal por el cual le llega. Estos potenciales son generados por las células receptoras sensitivas que están especializadas en transformar la energía del estímulo en una señal nerviosa. Un estímulo es una forma de energía proveniente del exterior capaz de despertar una respuesta sensitiva. Para cada tipo de estímulo hay un tipo de células receptoras sensitivas. Los mecanorreceptores son receptores sensoriales que reaccionan ante estímulos mecánicos generando potenciales de acción. Existen mecanorreceptores en la piel (sentido del tacto) y en las células de la cóclea que transducen las presiones de aire en sonido (sentido del oído). Los fotorreceptores son transductores de luz que proporcionan una señal eléctrica como respuesta a la radiación óptica que incide sobre la superficie sensora. Estos receptores permiten a nuestro cerebro percibir las ondas electromagnéticas del espectro visible (sentido de la vista). Por último, los quimiorreceptores se encargan de transformar en impulsos eléctricos la energía química que se produce cuando entran en contacto con determinadas moléculas o iones. Son los responsables del sentido del olfato y del gusto.

Sentido del gusto

El sentido del gusto tiene su origen en las papilas gustativas que son conjuntos de quimiorreceptores o receptores sensoriales que traducen una señal química en un potencial de acción o impulso eléctrico. Estos receptores sensoriales son los encargados de la detección de los cinco sabores básicos (ácido, dulce, salado, amargo y umami). Cada receptor sensorial termina en una dendrita o microvellosidad [2] que al entrar en contacto con las sustancias químicas presentes en los alimentos generan impulsos nerviosos que son transmitidos al cerebro y convertidos, mediante complejos sistemas de reconocimiento, en la percepción de un sabor concreto (ver Figura 1). La frecuencia con que se repiten estos impulsos indica la intensidad del sabor.

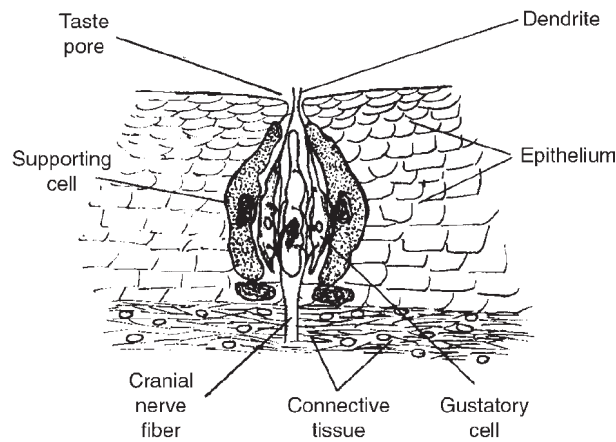


Figura 1. Estructura de la papila gustativa [2]

Cada uno de los sabores básicos puede asociarse a una o varias sustancias químicas. Por ejemplo, los protones disociados de ácidos (H^+) se corresponden con el sabor ácido, los iones sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) con el sabor salado, las moléculas de glucosa o sacarosa con el dulce, la quinina con el amargo y la urea con el umami. Existen diversos tipos de quimiorreceptores distribuidos por la boca cada uno de los cuales presenta una respuesta diferente. En la Figura 2 se pueden ver los umbrales de detección de los distintos receptores sensoriales del gusto para las sustancias relacionadas con los distintos sabores [3].

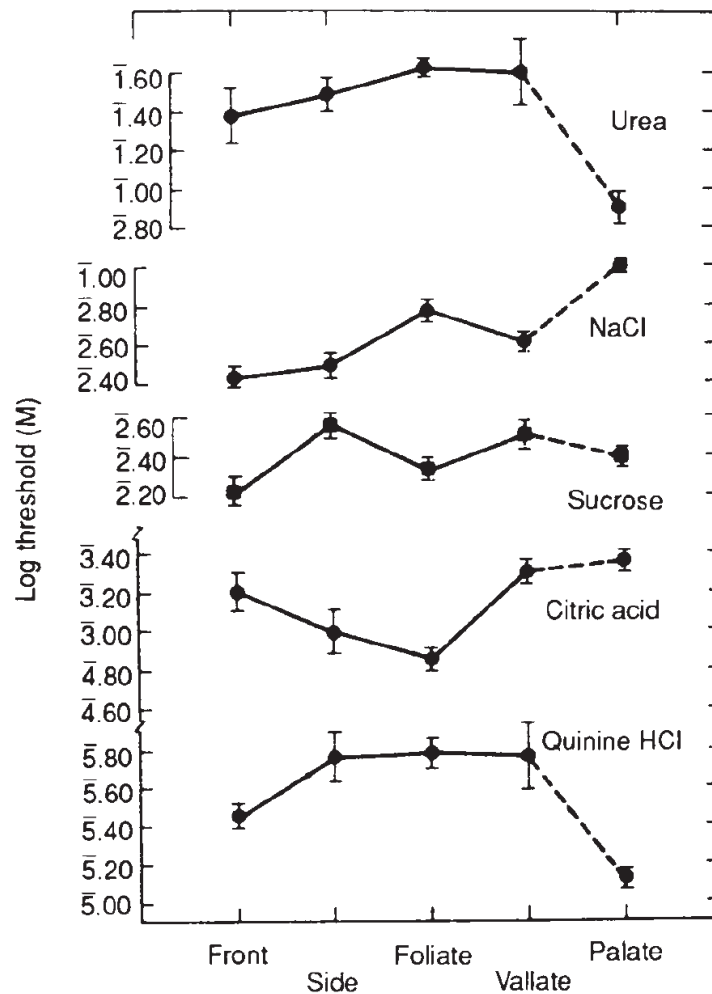


Figura 2. Umbrales de detección de los quimiorreceptores de la boca para distintas sustancias [3]

Como se puede observar todos los quimiorreceptores de la boca pueden producir respuesta para todas las sustancias, sin embargo, cada uno de ellos tiene más facilidad (umbral de detección más bajo) para detectar determinadas sustancias (sabores).

Aunque los receptores sensoriales del gusto puedan estar más o menos especializados en la detección de un sabor en concreto, el concepto general de sabor, aquél que percibimos por ejemplo cuando degustamos un trozo de

chocolate, se corresponde con el procesado en el cerebro de los impulsos eléctricos generados por todos los quimiorreceptores de la boca y de la nariz.

1.2. Definición de lengua electrónica

En los últimos tiempos han surgido sistemas electrónicos que imitando el funcionamiento del sentido del olfato y del gusto permiten la determinación de parámetros fisicoquímicos en matrices complejas. Se trata de las narices y las lenguas electrónicas.

En el caso de las lenguas electrónicas, su analogía con el gusto biológico no está relacionada con el método de conversión de la información química en señal eléctrica ni con el formato de dicha señal. Como acabamos de ver, en el gusto biológico los quimiorreceptores generan un impulso eléctrico al captar una determinada sustancia en su superficie que es transmitido al cerebro a través del sistema nervioso. Sin embargo, en las lenguas electrónicas la señal eléctrica puede ser por ejemplo, el potencial de la interfaz electrodo-muestra (lenguas electrónicas potenciométricas) o la corriente generada como respuesta a la aplicación de un determinado potencial al electrodo (lenguas electrónicas voltamétricas). No obstante, sí que existe una analogía en el funcionamiento de ambos sistemas a nivel global. Cuando probamos un alimento el cerebro combina la información generada por quimiorreceptores de distinta naturaleza para establecer el sabor de dicho alimento. En las lenguas electrónicas el sistema de procesado de datos combina las señales recibidas de varios sensores de distinto tipo para determinar una propiedad de la muestra o cuantificar alguno de sus compuestos. Existe un tipo de lenguas electrónicas llamado *taste sensor* (sensor de gusto o de sabor) que intentan mimetizar la capacidad del gusto biológico de detectar los 5 sabores básicos (dulce, salado, ácido, amargo y umami). Sin embargo, el concepto de lengua electrónica es mucho más amplio; en la mayoría de los casos los sensores utilizados en este tipo de sistemas no son capaces de detectar ningún sabor en concreto. Para cada aplicación se eligen aquellos sensores cuya respuesta combinada permita clasificar las muestras o cuantificar alguna de sus propiedades [4][5][6].

En los últimos años esta tecnología está cobrando una enorme importancia, prueba de ello es la gran cantidad de trabajos de revisión bibliográfica que se han publicado sobre este tema. Algunos de ellos son generales y abarcan los

distintos tipos de lenguas electrónicas y sus aplicaciones [4][5]. Otros, aunque dan una visión general de esta tecnología, se centran en alguna aplicación en concreto como la industria alimentaria [6][7], la industria farmacéutica [8][9] o las aplicaciones medioambientales [10]. También hay trabajos que repasan los avances llevados a cabo en un tipo de lengua electrónica en concreto: por ejemplo en [11] Bratov et al. hacen una revisión de las lenguas potenciométricas incidiendo en los tipos de electrodos utilizados; mientras que en [12] Winquist describe las lenguas voltamétricas y enumera las aplicaciones de dicha tecnología en los últimos años. En [13] Gutiérrez et al. repasan el uso de las lenguas electrónicas en los sistemas de medida de inyección de flujo.

Las lenguas electrónicas se pueden definir como sistemas basados en múltiples sensores de baja selectividad o sensibilidad cruzada que, conjugados con herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante, permiten la clasificación de muestras o la cuantificación de alguno de sus parámetros fisicoquímicos [13]. La principal diferencia entre las lenguas electrónicas y otras técnicas de análisis es el uso de sensores de sensibilidad cruzada y baja selectividad, es decir, sensores que no están diseñados para detectar una especie en concreto. Esto es perfectamente compatible con la primera de las funciones de las lenguas electrónicas: la clasificación. En este caso se toman diversas muestras con diferentes niveles de la característica que se quiere evaluar (frescura de pescado, calidad de la carne, paneles sensoriales y otros). Las medidas realizadas sobre estas muestras se procesan mediante herramientas de reconocimiento de patrones o de análisis multivariante con el fin de establecer una clasificación de las mismas.

Sin embargo, a la hora de cuantificar un determinado parámetro cabría preguntarse qué ventajas ofrecen las lenguas electrónicas sobre otros métodos analíticos basados en sensores más selectivos. En [4] se explica que cuando una determinada especie se encuentra combinada con otras especies las interacciones entre ellas dificultan enormemente su cuantificación mediante el uso de sensores selectivos. Sin embargo, si se miden señales de varios sensores que son sensibles a las especies presentes (siendo las respuestas de cada uno de ellos diferentes) es posible, mediante métodos de análisis multivariante, generar modelos de predicción que permitan la cuantificación de una de las especies en concreto. Sería parecido a construir un sistema de ecuaciones en el que las variables serían las especies que queremos cuantificar y las respuestas de cada uno de los electrodos constituirían cada una de las ecuaciones.

La Figura 3 muestra la estructura de una lengua electrónica. Se compone de tres elementos: los sensores, el sistema de medida y el sistema de procesado de datos. Como se ha comentado anteriormente, los sensores por lo general tienen una sensibilidad cruzada a los distintos compuestos de la muestra y su número depende de la aplicación y de la técnica empleada. La misión del sistema de medida es captar las señales generadas por dichos sensores, digitalizarlas y transmitir las al sistema de procesado de datos. Éste recibe los datos de las medidas y, basándose en algoritmos de reconocimiento de patrones o en herramientas de análisis multivariante, clasifica las muestras o cuantifica alguna de sus características fisicoquímicas. Normalmente antes de poder llevar a cabo esa clasificación o cuantificación debe realizarse un proceso de aprendizaje en el que muestras de características conocidas son procesadas para “entrenar” al sistema.

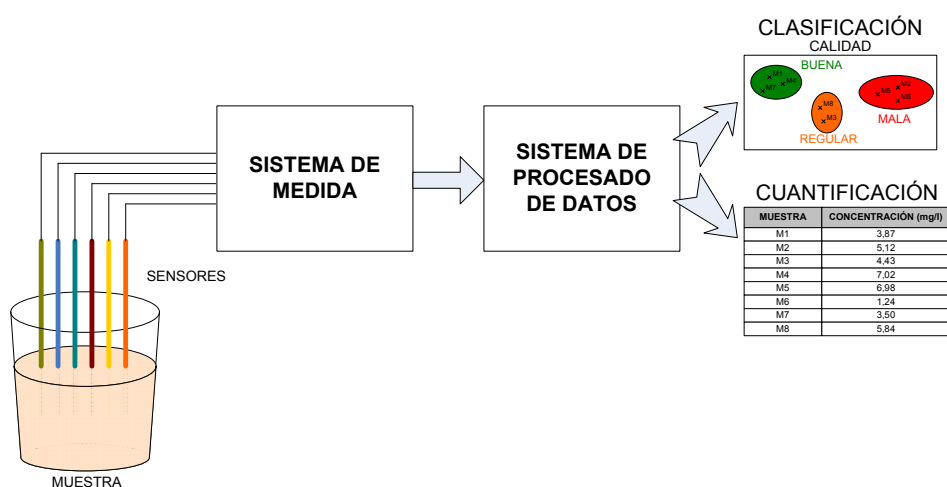


Figura 3. Lengua Electrónica

2. Técnicas electroquímicas de medida

2.1. Procesos electroquímicos en el electrodo

Una celda electroquímica básica se compone de dos electrodos inmersos en una disolución (ver Figura 4). Si aplicamos una tensión externa V entre dichos

electrodos, bajo determinadas circunstancias, se producirá la circulación de una corriente eléctrica I derivada de los procesos electroquímicos que ocurren en la interfaz electrodo-disolución de cada uno de ellos. El origen de esta corriente puede ser la transferencia de carga debida a reacciones químicas (procesos farádicos) o la reorganización de la carga en la interfaz (procesos no farádicos).

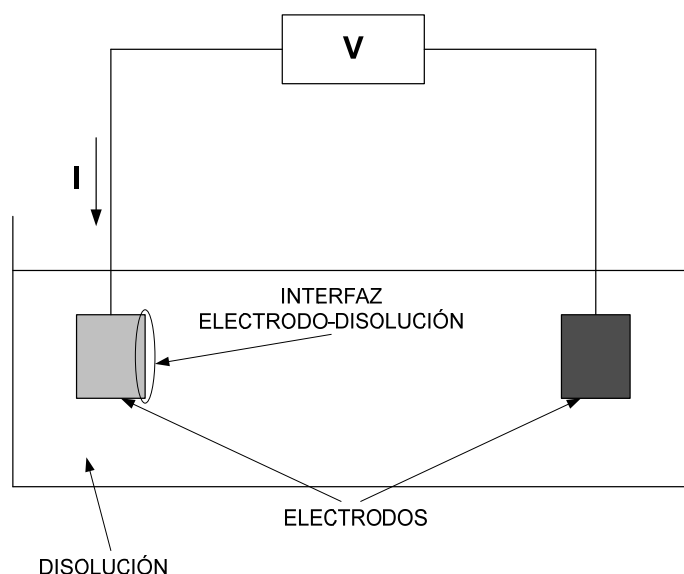


Figura 4. Celda electroquímica

Procesos farádicos

Normalmente en electroquímica los estudios se centran en uno de los electrodos (electrodo de trabajo o indicador). Supongamos en dicho electrodo se produce una reacción del tipo que aparece en la Ecuación 1.



En función del potencial aplicado, la reacción podrá ser reforzada en uno u otro sentido, lo que dará lugar a la circulación de corriente en uno u otro sentido. La relación entre el potencial en la interfaz electrodo-disolución y la corriente derivada de la transferencia de carga durante la reacción vendría dada por la ecuación de Butler-Volmer [14] (ver Ecuación 2).

$$i = n \cdot F \cdot A \cdot k^0 \cdot \left[C_O \cdot e^{-\frac{\alpha n F}{R T} (E - E^0)} - C_R \cdot e^{\frac{(1-\alpha) n F}{R T} (E - E^0)} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

- i : corriente que atraviesa la interfaz electrodo-disolución
- F : constante de Faraday ($96\,485,34 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- A : superficie de contacto entre el electrodo y la disolución
- k^0 : constante de velocidad de la reacción estándar
- C_O : concentración de la especie O en la interfaz
- α : coeficiente de transferencia
- n : número de electrones involucrados en la reacción (ver Ecuación 1)
- R : constante universal de los gases ideales ($8,314472 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$)
- E : potencial en la interfaz electrodo-disolución
- E^0 : potencial normal del par redox
- C_R : concentración de la especie R en la interfaz

Como se puede apreciar, esta relación viene condicionada por las características intrínsecas de la reacción (que a su vez dependen de la naturaleza del electrodo y de las especies que reaccionan), la superficie de contacto entre el electrodo y la disolución, la concentración de las especies involucradas en la reacción y la temperatura. Esta ecuación explica el comportamiento relacionado con la transferencia de carga justo en la interfaz electrodo-disolución. Para entender el proceso a nivel de la celda electroquímica es necesario tener en cuenta otros fenómenos como:

- El transporte de las especies desde el seno de la disolución hasta la interfaz para que puedan reaccionar. Este movimiento de materia se denomina transporte de masa y en el caso de sistemas electroquímicos puede deberse a fenómenos hidrodinámicos (producidos por la agitación de la disolución, la rotación del electrodo o el flujo forzado de la disolución por el electrodo), de migración (debidos a la interacción con un campo eléctrico) o difusión (debidos a gradientes de concentración). En la Ecuación 2 los valores de C_R y C_O corresponden a los valores de concentración en la interfaz. Dichos valores evolucionan con el tiempo. Por un lado, conforme se produce la reacción la concentración de la especie que se está consumiendo disminuirá. Por otro, esta disminución se irá compensando gracias a los procesos de transporte de masa. La

evolución de la corriente generada vendrá marcada por el ritmo de llegada a la interfaz desde el seno de la disolución de nuevas cantidades de la especie que se está consumiendo.

- Procesos de adsorción o desorción. En el proceso de adsorción los iones o moléculas presentes en la disolución se adhieren al electrodo disminuyendo la superficie útil en la que las reacciones puedan tener lugar. En el proceso de desorción las sustancias adheridas se separan del electrodo.
- Otras reacciones que puedan darse antes o después de la reacción que da lugar a la transferencia de carga.

Un caso particular interesante de la ecuación de Butler-Volmer es considerar la situación en la que no se produce circulación de corriente; es decir cuando existe un equilibrio en la reacción de la Ecuación 1 y no hay transferencia neta de carga en ninguno de los dos sentidos. En este caso el valor del potencial en la interfaz electrodo-disolución puede expresarse en función de las concentraciones de las especies que reaccionan tal y como se indica en la Ecuación 3. Esta expresión se denomina ecuación de Nernst.

$$E = E^{0'} + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \ln\left(\frac{C_0}{C_R}\right) \quad \text{Ecuación 3}$$

Procesos no farádicos

La ecuación de Butler-Volmer explica los fenómenos farádicos que ocurren en la interfaz electrodo-disolución, es decir, aquellos relacionados con la transferencia de carga. Sin embargo, en las cercanías de la interfaz, además de las especies que reaccionan, pueden encontrarse iones de otras especies para los que no se alcanza el potencial de reacción. Estos iones, aunque no producen transferencia de carga, sí que son atraídos o repelidos por la superficie del electrodo en función del potencial aplicado. Ese movimiento de carga cuando el potencial cambia da lugar a una corriente similar a la que se produce cuando se modifica la tensión en bornes de un condensador [14][15]. De hecho la estructura que se forma en la interfaz electrodo-disolución, denominada doble capa eléctrica (ver Figura 5), tiene cierta similitud con un condensador. Dicha estructura integra varias capas. La primera capa (1), la más próxima al electrodo, se compone de moléculas del disolvente y a veces de otras moléculas o iones que son específicamente adsorbidos. Esta capa se denomina capa

interna, compacta, de Helmholtz o de Stern. El plano formado por los centros de estos iones específicamente adsorbidos se denomina Plano Interno de Helmholtz (IHP). Tras esa capa se sitúan los iones solvatados; el plano formado por los centros de estos iones se denomina Plano Externo de Helmholtz (OHP) y marca la distancia mínima a la que estos iones pueden acercarse a la superficie del electrodo. Las interacciones entre dichos iones y el electrodo se limitan a fuerzas electrostáticas. Más allá del OHP se encuentra la capa difusa. En esta zona la distribución de los iones se establece en base al movimiento aleatorio térmico y las fuerzas de atracción/repulsión entre los iones y la superficie del electrodo. La capa difusa tiene un grosor muy pequeño y depende de la concentración iónica total (para concentraciones mayores de 10^{-2} M, el espesor es menor de 100 Å). Más allá de la capa difusa los iones no perciben las fuerzas de atracción electrostática producidas por el electrodo. De hecho, en ausencia de corriente, la caída de potencial entre dos electrodos se produce en los interfaces y no en el seno de la disolución. Cuando hay circulación de corriente se genera una pequeña caída de potencial en la disolución debida a su conductividad finita.

Si se producen cambios en el potencial aplicado al electrodo la estructura de la doble capa eléctrica debe reorganizarse en base al nuevo potencial, lo que genera una corriente transitoria (corriente de carga). Esta corriente debe ser considerada en los experimentos electroquímicos ya que en algunos casos puede llegar a ser mayor que la corriente farádica.

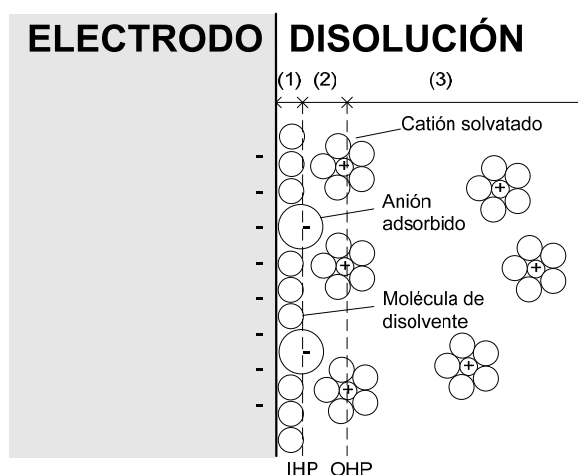


Figura 5. Estructura de la doble capa eléctrica

Una celda electroquímica es, por tanto, un sistema complejo en el que ocurren simultáneamente diversos procesos y en el que distintas variables se interrelacionan. En la Figura 6 se detallan las variables más importantes que intervienen en los procesos electroquímicos [14].

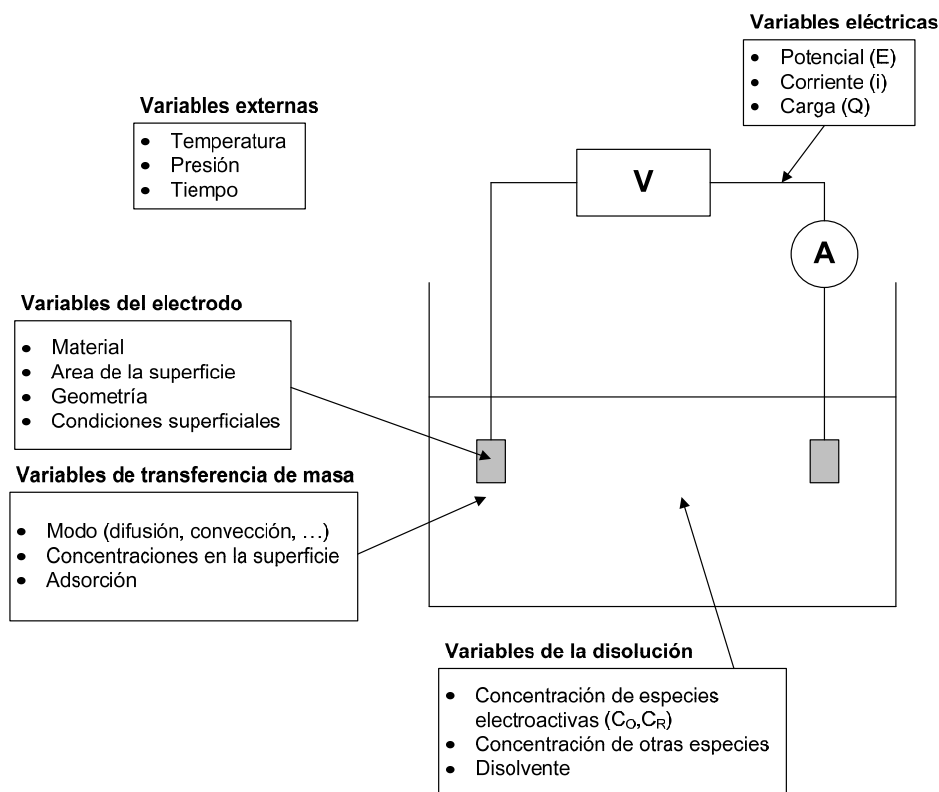


Figura 6. Variables involucradas en los procesos electroquímicos

El objetivo de las técnicas electroquímicas de medida es la determinación de alguna de estas variables a partir del control y/o la medida de otras. Por ejemplo, en voltametría se aplica un determinado potencial al electrodo de trabajo y se mide la corriente que circula por el mismo con el fin de determinar la concentración de alguna de las especies electroactivas presentes en la disolución.

2.2. Clasificación de los métodos electroquímicos de medida

En la bibliografía consultada se han encontrado diversas clasificaciones de las técnicas electroquímicas [15][16][17][18] aunque todas ellas pueden condensarse en el diagrama que aparece en la Figura 7.

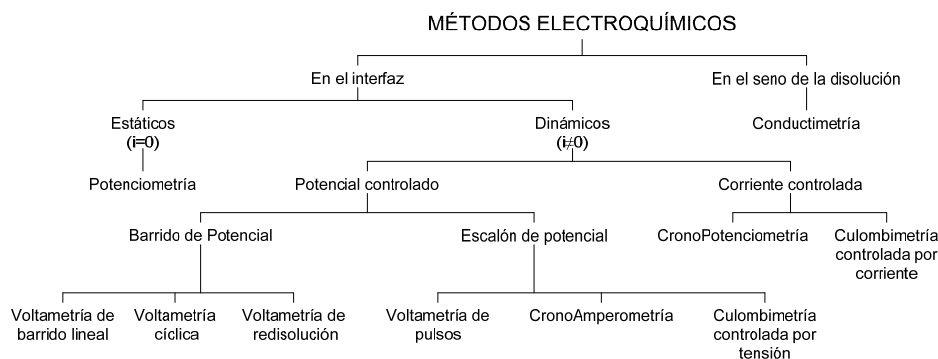


Figura 7. Métodos electroquímicos fundamentales

En primer lugar hay que hacer una distinción entre aquellas técnicas que se aplican en el seno de la disolución y aquellas que se centran en el estudio de los procesos que ocurren en la interfaz entre la disolución y el electrodo. Dentro del primer grupo la técnica más importante es la conductimetría que consiste en medir la conductividad de la disolución aplicando una señal cuadrada de alterna y midiendo la corriente que circula. Para cada semiperiodo de la señal cuadrada el cociente entre la tensión aplicada y la corriente medida se corresponde con la resistencia de la disolución entre los dos electrodos. Conociendo las características geométricas de los electrodos se puede deducir la conductividad a partir de la resistencia medida.

Dentro de los métodos electroquímicos interfaciales se distinguen dos grupos: los estáticos y los dinámicos. En las técnicas electroanalíticas estáticas se trabaja con el sistema en el equilibrio; es decir no hay circulación de corriente. La más conocida de éstas es la potenciometría. Dentro de las dinámicas cabe hacer una nueva separación entre aquellas para las que el parámetro eléctrico controlado es la corriente y aquellas para las que el parámetro controlado es la tensión. Del primer grupo las más significativas son la culombimetría controlada por corriente y la cronopotenciometría. Pero las técnicas electroquímicas interfaciales dinámicas más utilizadas son las controladas por

tensión, en las que el control puede ser mediante barridos de potencial (voltametría de barrido lineal, voltametría cíclica y voltametría de redisolución) o mediante escalones de potencial (voltametría de pulsos, cronoamperometría y coulombimetría controlada por tensión).

Las técnicas interfaciales dinámicas de barrido de potencial también se pueden clasificar entre las hidrodinámicas y las estacionarias. En las estacionarias la disolución permanece en reposo mientras que en las hidrodinámicas se provoca el movimiento de las especies en las cercanías del electrodo con el fin de facilitar la reacción. Hay que considerar la existencia de elementos que dificultan la llegada de las especies a la superficie del electrodo como son las moléculas e iones fisisorbidos o los residuos de las reacciones. El objetivo del movimiento es desalojar estos elementos para facilitar la difusión hacia la superficie del electrodo de las especies que deben reaccionar. Este movimiento puede provocarse de tres maneras:

- Haciendo rotar el electrodo: *Rotating Disk Electrode* (RDE).
- Agitando la disolución.
- Haciendo circular un flujo de disolución por la superficie del electrodo.

Por último, aunque solo aparece en una de las clasificaciones encontradas en la bibliografía consultada [17], la espectroscopía de impedancias es una técnica analítica muy potente [14][19]. Esta técnica puede aplicarse tanto a nivel de la interfaz electrodo-disolución como para medir propiedades en el seno de la disolución.

2.3. Potenciometría

La potenciometría se basa en la medida del potencial que se establece entre dos electrodos cuando son sumergidos en una disolución y no hay circulación de corriente. El potencial medido es la diferencia entre los potenciales que se establecen en cada uno de los electrodos.

En condiciones de corriente nula el potencial de cada electrodo viene dado por la ecuación de Nernst (ver Ecuación 3). Por tanto, el potencial externo medido dependerá, entre otras cosas, del material de los electrodos, de la naturaleza y concentración de las especies presentes en la disolución y de la temperatura. De forma que sería posible relacionar el potencial medido con la concentración del

soluto en una disolución simple. También resulta interesante destacar que en este caso no existe dependencia directa con la superficie de contacto entre el electrodo y la disolución.

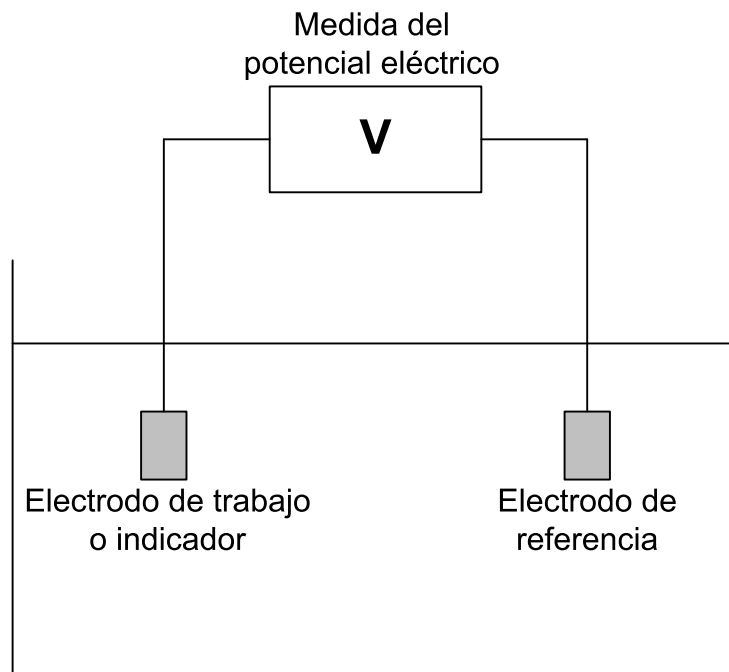


Figura 8. Diagrama de bloques de un sistema de lengua electrónica potenciométrica

En realidad en potenciometría solo interesa obtener información sobre uno de los electrodos (electrodo de trabajo o indicador). El otro electrodo sirve únicamente como referencia (contraelectrodo o electrodo de referencia) y, por tanto, debe tener un potencial estable para que no afecte a las medidas del electrodo de trabajo. Básicamente el electrodo de referencia debe cumplir que su potencial sea estable ante cambios en la concentración del soluto en la disolución. Existen varios tipos de electrodos de referencia; los más conocidos son el electrodo estándar de hidrógeno, el electrodo de calomelanos y el electrodo de plata-cloruro de plata (ver apartado 5.1 de esta introducción).

Con un electrodo de referencia estable, las variaciones en el potencial medido se deberán a cambios en el potencial de la interfaz del electrodo de trabajo que, a su vez, depende de la concentración del soluto. Por tanto, eligiendo el material adecuado para el electrodo de trabajo se puede establecer una relación entre la concentración del soluto y el voltaje medido entre los dos electrodos. En potenciometría existen diversos tipos de electrodos de trabajo: electrodos metálicos, electrodos selectivos de iones y otros (ver apartado 5.2 de esta introducción).

La Ecuación 3 es válida para el caso de disoluciones simples, pero cuando en la disolución existen varias especies el potencial generado ya no depende de la concentración de una sola especie sino de las interacciones que se producen entre todas ellas [4]; y, por tanto, no resulta posible establecer una relación entre la tensión medida y la concentración de una de las especies. Una posible solución a este problema es el uso de electrodos selectivos de iones (ISE), que se verán en el apartado 5.2 de esta introducción. Sin embargo, la fabricación de electrodos selectivos de iones con bajos coeficientes de selectividad no resulta fácil y dichos coeficientes normalmente dependen de las condiciones de medida. Por este motivo, tal y como se comentó en el apartado 1.2, se empezaron a utilizar electrodos de sensibilidad cruzada en formato de lengua electrónica para la cuantificación de especies dentro de las matrices complejas en las que se producen interferencias entre los distintos compuestos.

2.4. Técnicas voltamétricas

Metodología de medida. Configuración a 3 electrodos

El objetivo de la voltametría es aplicar una tensión controlada a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo y medir la corriente que circula por el mismo. Para poder llevar a cabo este proceso es necesario el uso de, al menos, dos electrodos: el electrodo de trabajo (que es aquel en el que se van a producir los procesos electroquímicos que se desea analizar) y un contraelectrodo que permita cerrar el circuito para que la corriente circule. Sin embargo, realizar un ensayo de voltametría en configuración a dos electrodos plantea una serie de problemas derivados del hecho de que en el contraelectrodo también se producen procesos electroquímicos que van a afectar a la medida de aquéllos que ocurren en el electrodo de trabajo. En la Figura 9 se muestra una

celda electroquímica de 2 electrodos a la que se le aplica un potencial E_T . En la parte inferior de la figura se ha añadido el modelo eléctrico simplificado de dicha celda [15].

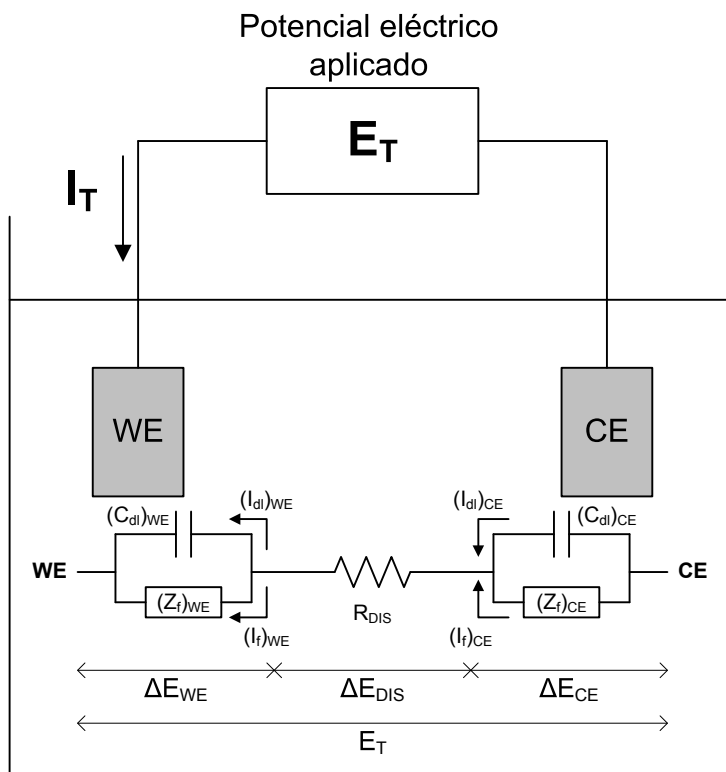


Figura 9. Ensayo de voltametría en configuración a 2 electrodos

Tal y como se vio en el apartado 2.1 de esta introducción, la corriente total que circula por la interfaz electrodo-disolución es la suma de la corriente derivada de la transferencia de carga (corriente farádica I_f) y la corriente debida a la reorganización de las cargas en la doble capa eléctrica (corriente no farádica I_{dl}). La relación entre la corriente farádica y la tensión aplicada a la interfaz electrodo-disolución viene representada por la impedancia Z_f . Este modelo es una simplificación puesto que esta corriente no solo depende del potencial aplicado sino también de otras variables como la concentración. En cuanto a la corriente no farádica, su relación con la tensión se establece mediante un condensador C_{dl} . Esta representación es de nuevo una simplificación porque, a

su vez, el valor de dicho condensador depende de la tensión aplicada. Sin embargo, a efectos prácticos este modelo permite entender la relación existente entre el potencial aplicado al electrodo y la corriente que circula por él. Dicha relación vendría dada por el condensador C_{dl} y la impedancia Z_f , que, a su vez, dependen de las distintas variables que intervienen en el proceso. El modelo eléctrico del tramo de disolución que va del electrodo de trabajo al contraelectrodo se establece mediante una resistencia R_{DIS} (que depende de la conductividad de la disolución). Por tanto, cuando aplicamos un determinado voltaje entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo dentro de la celda electroquímica, este voltaje se reparte en 3 caídas de potencial: la caída de potencial en la interfaz de electrodo de trabajo (ΔE_{WE}), la caída de potencial en la disolución (ΔE_{DIS}), la caída de potencial en la interfaz del contraelectrodo (ΔE_{CE}). La caída de potencial en la disolución es, por lo general, pequeña y además, al depender únicamente de la conductividad de la disolución, podría ser compensada. Sin embargo, la caída en el contraelectrodo supone un problema ya que su valor depende de una gran cantidad de variables que evolucionarán a lo largo del ensayo. Por este motivo, en una configuración a 2 electrodos, aunque apliquemos un potencial controlado entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo, no es posible controlar el potencial que realmente será aplicado a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo.

Para solucionar este problema es necesario trabajar en una configuración a 3 electrodos [14][15][16] y utilizar un potenciostato que permita controlar la tensión aplicada a la interfaz del electrodo de trabajo tal, y como se indica en la Figura 10. En la configuración a 3 electrodos se necesitan:

- Un contraelectrodo o electrodo auxiliar (CE o AE): su misión es únicamente permitir la circulación de la corriente hacia el electrodo de trabajo. La caída de potencial que se produzca en el contraelectrodo no es importante para el funcionamiento del sistema (salvo que pudiese provocar una saturación del potencial total aplicado E_T).
- Un electrodo de referencia (RE): este electrodo debe cumplir dos condiciones. En primer lugar, el electrodo de referencia debe conectarse a una entrada de alta impedancia del potenciostato de forma que no se produzca circulación de corriente por el mismo. Cuando la corriente que lo atraviesa es nula un electrodo puede representarse mediante una resistencia y una batería que corresponde a la tensión que se genera en su interfaz según indica la ecuación de Nernst (ver Ecuación 3). La segunda condición que debe cumplir el electrodo de referencia es que debe ser

muy estable ante cambios de concentración en la disolución de manera que la tensión de la batería pueda considerarse constante.

- Un electrodo de trabajo (WE): es el electrodo sobre el que se quieren realizar las medidas. El objetivo es poder aplicarle una tensión controlada y medir la corriente que circula por él.

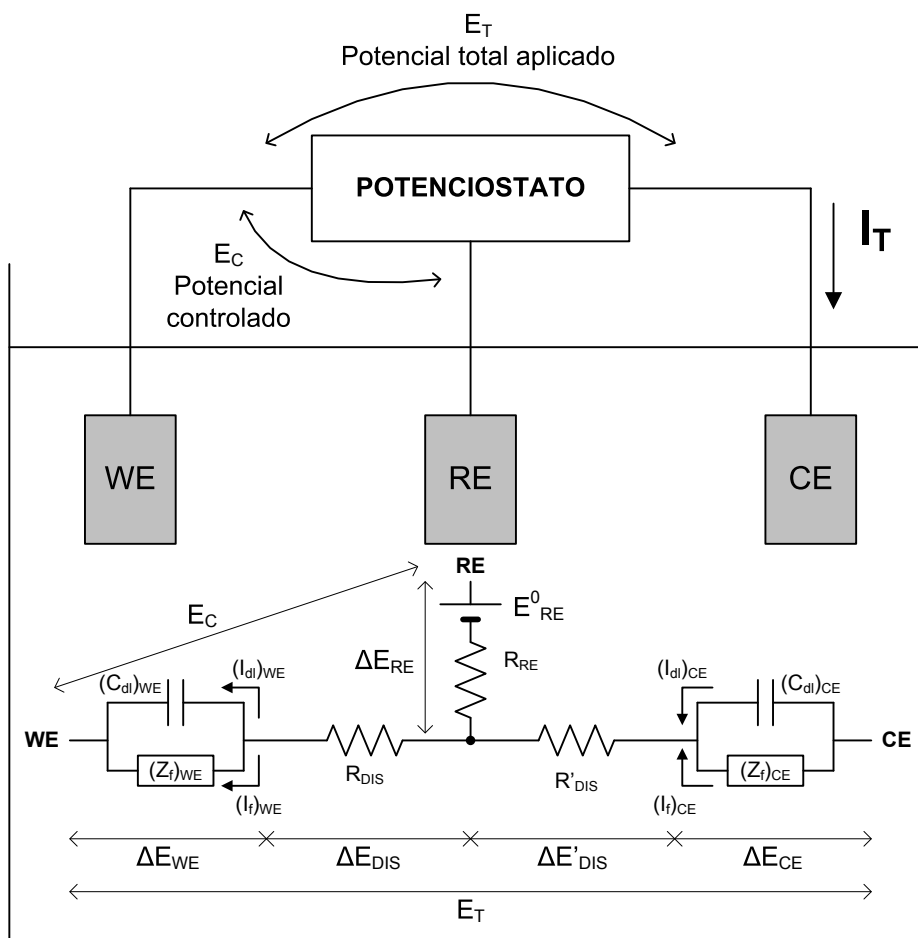


Figura 10. Ensayo de voltametría en configuración a 3 electrodos

El potencióstato, cuya estructura interna y funcionamiento se describe en el apartado 4.3 de esta Introducción, debe garantizar el buen funcionamiento del sistema. Para ello debe cumplir dos condiciones:

- La conexión al electrodo de referencia debe ser una entrada de alta impedancia para evitar la circulación de corriente por él.
- El potenciostato debe aplicar entre el electrodo de referencia y el electrodo de trabajo un potencial controlado (E_C) que no debe ser afectado por lo que ocurra en el contraelectrodo. Por contra, el valor de la tensión total aplicada entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo (E_T) sí que puede variar en función de los procesos que ocurran en el contraelectrodo y en el tramo de la disolución que va desde el contraelectrodo al electrodo de referencia ($\Delta E'_{DIS}$).

En estas condiciones, el potencial aplicado a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo (ΔE_{WE}) vendrá dado por la expresión de la Ecuación 4.

$$\Delta E_{WE} = E_C - E_{RE}^0 - \Delta E_{DIS} \quad \text{Ecuación 4}$$

Como acabamos de explicar, eligiendo el electrodo de referencia adecuado, el potencial E_{RE}^0 puede considerarse constante; además la caída de potencial en la disolución es, por lo general, pequeña. Por tanto, estableciendo el valor del potencial E_C es posible controlar la tensión aplicada a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo. Para el caso de disoluciones de baja conductividad deberá encontrarse un sistema de compensación de la caída ΔE_{DIS} . Una posibilidad de llevar a cabo esta compensación es acercar el electrodo de referencia lo más posible al electrodo de trabajo. Otra posibilidad es realizar medidas de la conductividad de la disolución durante el ensayo, calcular la caída de potencial ΔE_{DIS} y modificar el valor de E_C para tener en cuenta dicha caída.

Clasificación de las técnicas voltamétricas

Hay una gran variedad de técnicas voltamétricas y existe cierta confusión en su clasificación [14][15][16]. Esta confusión se debe a que en los últimos años la tecnología disponible, la forma de llevar a cabo los ensayos y el modo de analizar los datos han cambiando sustancialmente.

Una primera agrupación de las técnicas voltamétricas se hace en base al tipo de potencial que se aplica:

- Técnicas voltamétricas de barrido: en este caso la tensión aplicada al electrodo varía lentamente. Dentro de estas técnicas cabe destacar las siguientes:
 - Voltametría de barrido lineal (*Linear Sweep Voltammetry LSV*): en esta técnica se aplica un potencial al electrodo de trabajo que aumenta de forma lineal a un ritmo que por lo general varía entre 10mV/s y 10V/s y se mide la corriente resultante. A continuación se representa la evolución de la corriente en función del potencial aplicado. A este tipo de representación gráfica se la denomina voltagrama o voltamograma. Cuando se alcanza el potencial de reacción de alguna de las especies presentes en la disolución se produce un aumento significativo de la corriente. Sin embargo, conforme la reacción transcurre la concentración de la especie que reacciona disminuye y, si no hay ningún proceso hidrodinámico, la corriente empezará a caer. Este proceso producirá un pico de corriente en el voltagrama que permitirá la identificación del potencial de reacción (ver Figura 11).

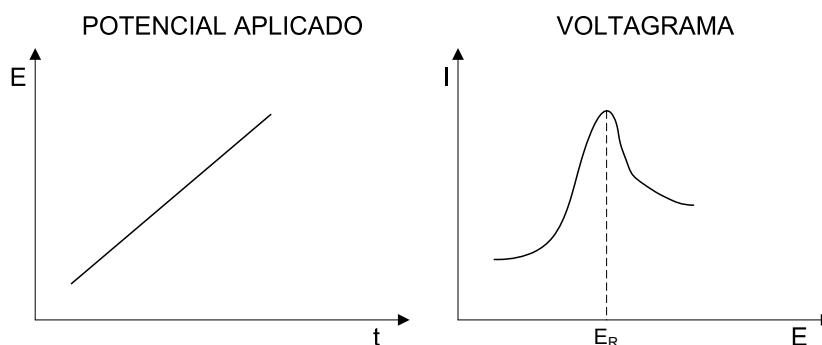


Figura 11. Voltametría de barrido lineal

- Voltametría de redisolución (*Stripping Voltammetry SV*): es muy parecida a la voltametría de barrido lineal pero incluye dos etapas más al principio del proceso. En primer lugar se deposita el analito en la superficie del electrodo a través de una oxidación o de una reducción aplicando un potencial constante. Para aumentar la eficacia de la deposición, durante este proceso se realiza una agitación o se hace girar el electrodo. A continuación viene una etapa de reposo y, por

último un barrido lineal que producirá la reacción inversa a la desarrollada en la fase de deposición, de forma que el analito será retirado de la superficie del electrodo.

- o Voltametría cíclica (*Cyclic Voltammetry CV*): es similar a la voltametría de barrido lineal con la diferencia de que, una vez alcanzado el potencial máximo, se lleva a cabo un nuevo barrido en sentido contrario hasta alcanzar el potencial inicial (ver Figura 12).

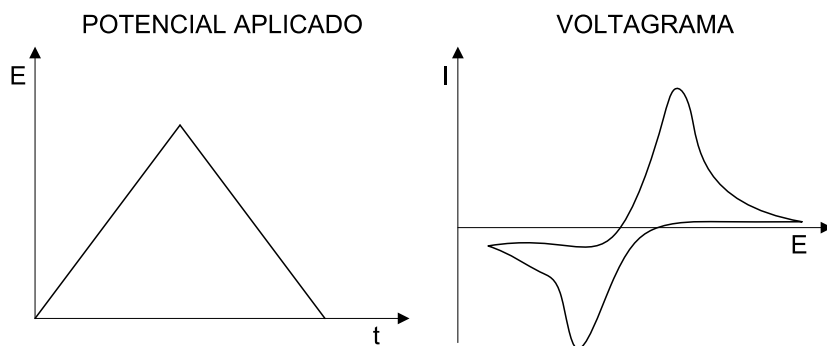


Figura 12. Voltametría cíclica

- Técnicas voltamétricas de pulsos: las numerosas técnicas que se integran en este grupo pueden agruparse en función de la amplitud de los pulsos:
 - o Voltametría de pulsos de pequeña amplitud: dentro de este grupo se integran técnicas en las que se incrementa la tensión aplicada al electrodo en pequeños escalones (voltametría de escalera o *Staircase Voltammetry SV*) o mediante la generación de pequeños pulsos cuyo nivel de continua se va aumentando (voltametría de onda cuadrada o *Square Wave Voltammetry SWV* y voltametría de pulso diferencial o *Differential Pulse Voltammetry DPV*) al tiempo que se mide la corriente resultante. El potencial aplicado para este tipo de técnicas se representa en la Figura 13, en la que los puntos indican los instantes en los que se mide la corriente.
 - o Voltametría de pulsos de gran amplitud: en este caso la amplitud de los pulsos es mayor. Como ejemplo de este tipo de técnicas se pueden citar la voltametría de pulsos normal (*Normal Pulse Voltammetry NPV*) y la cronoamperometría. En la primera de ellas se aplican

pulsos de amplitud creciente y la corriente se mide al final de cada uno de estos pulsos. En la segunda técnica se aplican 1 o 2 pulsos y la corriente se muestrea con una periodicidad mucho menor que la duración de los pulsos. En los últimos años se están utilizando técnicas de voltametría de pulsos en las que el diseño de pulsos se hace a medida en función de la aplicación y la señal de corriente es muestreada al estilo de la cronoamperometría [12].

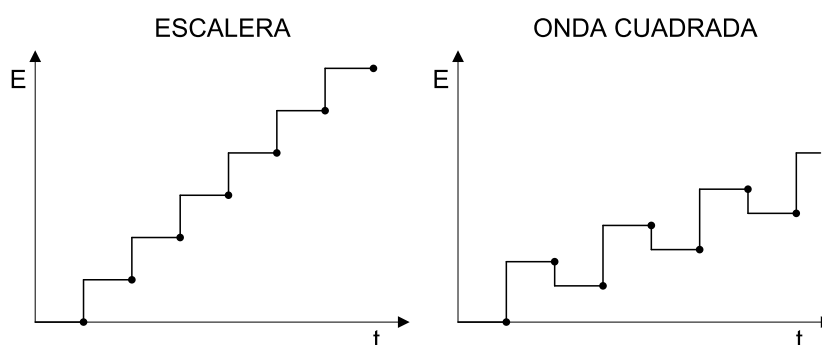


Figura 13. Voltametría pulsos de pequeña amplitud

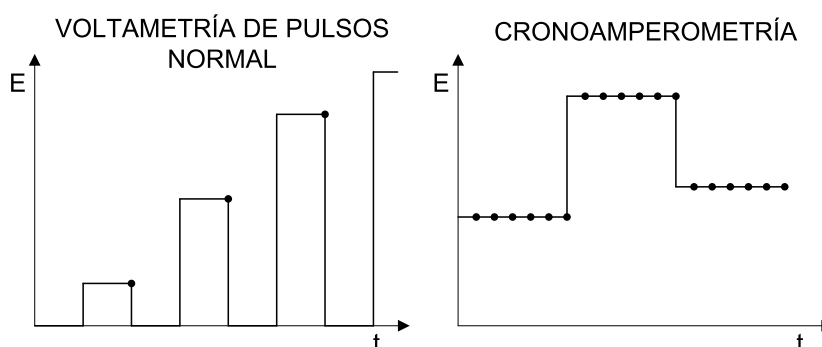


Figura 14. Voltametría pulsos de pequeña amplitud

La elección de la técnica voltamétrica más adecuada para cada experiencia dependerá del objetivo de la misma; es decir, de la variable del proceso electroquímico que se desea medir (concentración de analito, coeficiente de difusión, características de la doble capa eléctrica, potencial de oxidación-

reducción u otros). Por ejemplo, en la voltametría de barrido y en la de pulsos de pequeña amplitud las corrientes medidas estarán fundamentalmente relacionadas con los procesos farádicos y con los procesos de difusión; mientras que en la voltametría de pulsos de gran amplitud además de estos dos procesos pueden estudiarse los efectos de la doble capa eléctrica. Para estas últimas, si la medida de corriente se hace al principio del pulso o si los pulsos son de muy corta duración los resultados obtenidos estarán estrechamente relacionados con la doble capa eléctrica; sin embargo, si los pulsos son largos y la medida se realiza al final, los valores medidos tendrán relación con efectos farádicos y de transporte de masa.

Otro modo de clasificar las técnicas voltamétricas sería en función de cómo se mide la corriente y del procesamiento de los resultados obtenidos. En la mayoría de las técnicas voltamétricas tradicionales la medida de la corriente se utiliza para llevar a cabo la representación gráfica del voltograma. Este es el caso de la voltametría de barrido lineal, de la voltametría de redisolución y de la voltametría cíclica. Pero también es el caso de la mayoría de las técnicas voltamétricas de pulsos (SV, SWV y NPV) ya que los puntos en los que la corriente se mide corresponden a valores crecientes de tensión y, por tanto, es posible representar para esos puntos la gráfica de corriente frente a tensión. Sin embargo, para la cronoamperometría el objetivo no es la obtención de un voltograma sino el estudio de la evolución temporal de corriente en el electrodo cuando éste es sometido a escalones de potencial. En esta línea, en los últimos años han aparecido nuevas técnicas voltamétricas para las que el objeto de estudio es únicamente la evolución temporal de la corriente. En 1998 Winquist et al. presentan un trabajo en el que se utiliza una lengua electrónica voltamétrica para la determinación de la frescura de la leche [20]. En este trabajo se describe una nueva técnica voltamétrica consistente en aplicar pulsos de 0,5 s de duración y de diversas amplitudes y medir la evolución temporal de corriente con una frecuencia de muestreo de 20 Hz. Los valores de las muestras de corriente son procesados mediante herramientas de análisis multivariante con objeto de clasificar las muestras o generar modelos predictivos que permitan cuantificar el contenido bacteriano de la leche. Desde entonces esta metodología ha sido adoptada por otros autores en diversos trabajos. En [17] esta técnica se denomina voltametría de corriente muestreada (*Sampled Current Voltammetry*). En la Figura 15 se representan las señales típicas de los ensayos realizados con este tipo de técnica. En rojo se muestran los pulsos de tensión aplicados al electrodo de trabajo mientras que en verde aparece la señal de corriente que circula por el mismo. Los puntos indican los valores de corriente que son

muestreados. Dichos valores son los que se utilizan para el análisis multivariante.

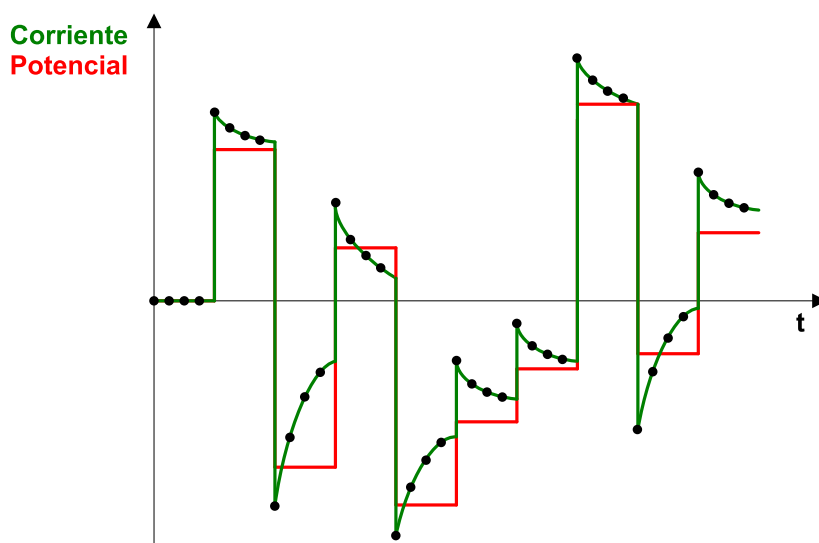


Figura 15. Voltametría de corriente muestreada

Si se analiza cada uno de los pulsos de forma individual se observa que la señal de corriente tiene un comportamiento exponencial. En realidad este comportamiento viene determinado por la contribución de la corriente no farádica (debida a la reorganización de las cargas en la doble capa eléctrica) y de la corriente farádica (correspondiente a las reacciones de oxidación-reducción que ocurren en el interfaz electrodo-disolución). Si la amplitud del potencial aplicado no es suficiente para provocar reacciones de oxidación-reducción la corriente tendrá únicamente una componente no farádica, tal y como se muestra en la Figura 16-a. Sin embargo, si el potencial aplicado produce una reacción de oxidación-reducción la corriente obtenida será la suma de la corriente no farádica y la corriente farádica resultante de la reacción (ver Figura 16-b). Tanto la corriente farádica como la no farádica están relacionadas con la naturaleza del electrodo y la naturaleza y concentración de las especies presentes en la disolución. Por lo tanto, el estudio de la evolución temporal de la

corriente total permite obtener información sobre la composición química de la muestra.

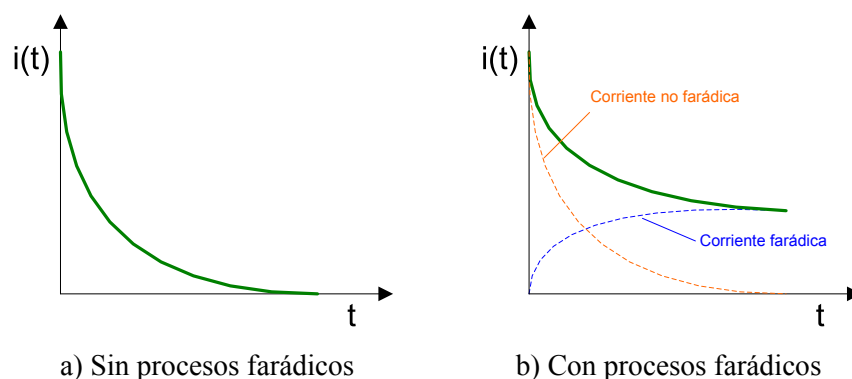


Figura 16. Respuesta en corriente a un escalón de potencial

En la presente tesis se ha aplicado la voltametría de corriente muestreada para la generación de los modelos predictivos de antioxidantes y glifosato.

2.5. Culombimetría

La culombimetría permite medir la cantidad de soluto que hay en una disolución haciendo reaccionar el soluto con el electrodo de trabajo. Conociendo la corriente que circula y el tiempo que dura el ensayo es posible saber la carga que se ha empleado en la reacción, y, por tanto, aplicando la ley de Faraday, puede calcularse la cantidad de soluto que ha reaccionado. Existen dos tipos de culombimetría:

- Culombimetría controlada por tensión: en este caso se aplica una tensión constante durante el tiempo necesario para que todo el soluto presente en la disolución reaccione. Al aplicar una tensión constante, la corriente por electrodo de trabajo va decreciendo de forma exponencial hasta que se hace cero (cuando se haya consumido todo el soluto). Para obtener la carga total es necesario integrar la corriente medida a lo largo del tiempo de ensayo. En disoluciones en las que haya varios solutos el potencial aplicado se establece de forma que permita únicamente la reacción del soluto que se desea cuantificar. Para poder aplicar un potencial

controlado al electrodo de trabajo es necesario utilizar una configuración a 3 electrodos conectada a un potenciostato (ver apartado 2.4).

- **Culombimetría controlada por corriente:** en este caso se aplica una corriente constante, lo que por un lado acelera el proceso y por otro facilita el cálculo de carga, ya que basta con multiplicar el valor de la corriente por el tiempo de ensayo. Sin embargo, esta técnica plantea dos problemas. En primer lugar conforme el soluto se va consumiendo la corriente empezará a disminuir. Para mantenerla constante será necesario aumentar la tensión aplicada al electrodo de trabajo para mantener constante el ritmo de consumo del soluto. Pero ese aumento puede provocar nuevas reacciones en las que no esté involucrado el soluto, con lo que no se cumpliría la relación entre la carga medida y la cantidad de soluto consumida. En ocasiones para mantener el ritmo de consumo del analito sin provocar reacciones que no contribuyan a su consumo se agregan sustancias mediadoras [16]. Se trata de sustancias que reaccionan fácilmente con el analito permitiendo que la corriente consumida se corresponda exactamente con el consumo del analito. En segundo lugar en este tipo de culombimetría resulta difícil conocer cuándo el ensayo ha concluido. Para ello es necesario detectar en qué momento el analito ha sido completamente consumido. Normalmente esto se consigue mediante técnicas auxiliares como la potenciometría.

2.6. Espectroscopía de impedancias

La espectroscopía de impedancias es una técnica analítica que consiste en medir el valor de la impedancia de un determinado sistema a distintas frecuencias. Se trata de un método de medida que puede ser aplicado tanto a muestras sólidas como a muestras líquidas, y en electroquímica puede utilizarse para realizar medidas tanto en la interfaz electrodo-disolución como en el seno de la disolución.

La impedancia es un valor complejo que puede representarse en formato de parte real y parte imaginaria o en formato de módulo y fase. En las medidas de espectroscopía de impedancias se aplican sucesivamente tensiones senoidales de diferentes frecuencias y para cada una de ellas se calcula el valor de la impedancia (ver Figura 17). Para ello, se mide la corriente resultante de la aplicación de la tensión senoidal a la muestra. El cociente entre las amplitudes

de la tensión aplicada y la corriente medida nos dará el módulo de la impedancia; mientras que para calcular la fase tendremos que multiplicar por $2\cdot\pi$ y por la frecuencia el retraso temporal entre los cruces por cero de las dos señales.

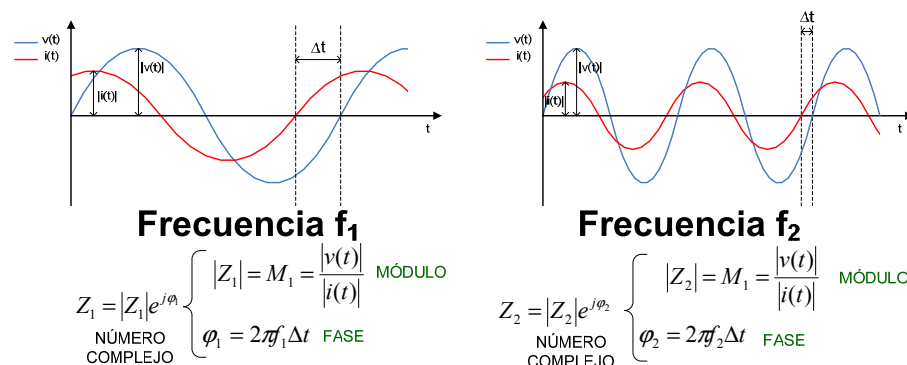


Figura 17. Medidas de espectroscopía de impedancias

Los valores de impedancia para todo el rango de frecuencias medidas constituyen el espectro de impedancias que está íntimamente relacionado con las propiedades físicoquímicas del sistema [19][21].

En sistemas electroquímicos, si lo que interesa es la medida de propiedades en el seno de la disolución, la espectroscopía de impedancias puede aplicarse en configuración de 2 electrodos, siempre que ambos estén hechos del mismo material o la superficie de contacto de uno de ellos sea mucho mayor que la del otro [22]. En este caso la amplitud de las tensiones aplicadas puede llegar hasta los 500 mV [21]. Sin embargo, si lo que interesa es el estudio de los fenómenos que ocurren en la interfaz electrodo-disolución será necesario trabajar en configuración de 3 electrodos y las tensiones aplicadas deberán ser de baja amplitud (de 10 a 20 mV) para mantener al sistema trabajando en la zona lineal [14][19].

3. Tipos de lenguas electrónicas

3.1. *Lenguas electrónicas potenciométricas*

Las potenciométricas son sin duda el tipo de lengua electrónica más extendida. Fueron las primeras en aparecer y su modo de funcionamiento es el que más se asemeja al funcionamiento del gusto biológico. En efecto, las lenguas electrónicas potenciométricas basan su funcionamiento en la medida del potencial de equilibrio que se genera cuando se introduce un electrodo en la muestra (ver apartado 2.3).

Su uso está tan extendido que incluso existen sistemas de lenguas electrónicas potenciométricas comerciales. En concreto, en la bibliografía consultada se han encontrado dos lenguas potenciométricas comerciales: la lengua electrónica Astree de la empresa francesa AlphaMOS y el sensor de gusto TS-5000Z de la empresa japonesa Insent (este último es una versión mejorada de la primera versión SA402 descrita en [23]). La primera, Astree, utiliza unos electrodos ChemFET (transistores de efecto de campo modificados químicamente) con baja selectividad y sensibilidad cruzada, lo que se corresponde exactamente con el concepto de lengua electrónica expuesto en el apartado 1.2 de esta introducción. El fabricante ofrece diversos juegos de electrodos que se seleccionan en función de la aplicación. En cuanto al sensor de gusto TS-5000Z dispone de 7 sensores de membrana lipídica cada uno de los cuales tiene asociada una cierta característica del gusto (amargo, ácido, salado, umami, dulce, etc.); de ahí que este último sistema no pueda considerarse realmente una lengua electrónica. En [24] se hace un estudio comparativo entre estas dos lenguas aplicándolas a la detección de distintos sabores en medicamentos y comparando las medidas obtenidas con un panel sensorial. Los resultados obtenidos con ambos sistemas son igualmente correctos.

Además de las comerciales existe un gran número de sistemas de lenguas electrónicas potenciométricas desarrolladas por diversos grupos de investigación. El más importante de estos grupos es, sin duda alguna, el de la Universidad de San Petersburgo [4]. Son numerosos los trabajos de este grupo encontrados en la bibliografía consultada bien como autores únicos bien en colaboración con otros grupos. Su línea de investigación consiste en el diseño de lenguas electrónicas potenciométricas basadas en electrodos de membranas poliméricas y vidrios calcogenuros. En [25] se hace una comparativa entre las

lenguas desarrolladas por este grupo y la lengua comercial Astree aplicándolas a la determinación del sabor y de parámetros fisicoquímicos de seis variedades de tomates belgas. La conclusión a la que se llega es que la lengua electrónica desarrollada por la Universidad de San Petersburgo tiene mayor capacidad de cuantificación de los parámetros fisicoquímicos mientras que la lengua comercial predice mejor el sabor del tomate.

Las aplicaciones de las lenguas electrónicas potenciométricas son muy variadas. Existe un enorme número de publicaciones en las que se aplican dichos sistemas al ámbito alimentario, pero también se han encontrado publicaciones relacionadas con otros campos.

Aplicación de las lenguas electrónicas potenciométricas al ámbito alimentario

Las aplicaciones más frecuentes de las lenguas electrónicas potenciométricas en el sector alimentario están relacionadas con bebidas ya sean alcohólicas o no alcohólicas. En [26] Lvova et al. clasifican refrescos y cervezas mediante electrodos de carbono de membrana polimérica. Martínez-Mañez et al. analizan en [27] diversas muestras de aguas minerales comerciales comparándolas con agua del grifo mediante electrodos de distintos metales. Mientras que en [28] se cuantifica la cantidad de zumo natural en distintos refrescos utilizando electrodos de membrana polimérica. También se han publicado un gran número de trabajos sobre medidas realizadas en vinos, bien para determinar el contenido en alcoholes [29] o para cuantificar el contenido en ácidos orgánicos y fenoles o el tiempo de crianza [30]. En [31] Polshina et al. aplican una lengua electrónica potenciométrica a la determinación del contenido de alcoholes y polifenoles y del grado de amargor de 50 marcas de cerveza belgas y holandesas. El té ha sido también objeto de estudios con este tipo de técnicas; en concreto, He et al. evalúan mediante una lengua electrónica Astree 10 parámetros sensoriales de té chinos comparándolos con un panel sensorial [32]. Legin et al. evalúan en [33] la calidad de distintos tipos de vodkas y aguardientes midiendo diversos contaminantes mediante electrodos de membrana polimérica y vidrios calcogenuros. Muestras de distintas marcas de zumos de naranja son clasificadas mediante técnicas potenciométricas en [34].

El estudio de la leche es otra de las grandes aplicaciones de las lenguas electrónicas potenciométricas en el ámbito alimentario. En [35] se utiliza la lengua comercial Astree para discriminar entre distintos tipos de fermentación y almacenamiento de leche probiótica. Mottran et al. aplican técnicas

potenciométricas basadas en los electrodos desarrollados por la Universidad de San Petersburgo para la detección de mastitis en muestras de leche de vaca [36]; mientras que en [37] Ciosek et al. clasifican leches de distintas marcas mediante una lengua potenciométrica.

También se han llevado a cabo trabajos con lenguas potenciométricas sobre frutas y verduras. En concreto en [38] se clasifican diversas variedades de manzanas y se cuantifica su contenido en ácidos orgánicos, mientras que en [39] se evalúa la evolución con el tiempo de parámetros químicos (pH y Brix) en albaricoques. Por último, en [25] Beullens et al. aplican las lenguas electrónicas potenciométricas para determinar los azúcares, los ácidos y las sales minerales de los tomates.

En [40] se aplica la potenciometría a la detección de gluten en alimentos (pan, harina, galletas, cereales y papillas para bebés). Mientras que en [41] Wie et al. utilizan la lengua Astree para la clasificación de distintas mieles en función de su origen floral y geográfico.

Aunque en la mayoría de los casos las aplicaciones de las lenguas electrónicas potenciométricas están destinadas a líquidos, existen algunos trabajos en los que las medidas se realizan sobre alimentos sólidos. Por ejemplo en [42] y [43] se presentan sendos trabajos en los que se aplica la potenciometría con electrodos de distintos metales a la medida de frescura de pescado (dorada). Los mismos autores en [44] evalúan la vida útil de la carne de cerdo a partir del estudio de diversos parámetros fisicoquímicos mediante electrodos de Au, Ag, Cu, Pb, Zn y C.

Otras aplicaciones de las lenguas electrónicas potenciométricas

Fuera del ámbito alimentario se encuentran aplicaciones relacionadas con la industria farmacéutica. En [45] y [46] se presentan sendos trabajos en los que se evalúan distintas metodologías para enmascarar el sabor de la quinina en los medicamentos. Con el fin de establecer la intensidad de dicho sabor se utilizan tanto lenguas electrónicas potenciométricas comerciales (Astree en [45] y TS-5000Z en [46]) como paneles sensoriales, obteniendo resultados muy similares con ambas metodologías. Otro importante campo de aplicación de las lenguas electrónicas es el análisis de la calidad del agua. En este sentido en [47] y [48] se aplican las técnicas potenciométricas para cuantificar metales pesados en aguas.

Las lenguas potenciométricas también han sido utilizadas para la determinación de sustancias como la urea y la creatina o para la detección de enfermedades en muestras de orina [49][50]. Por último, se han encontrado trabajos en los que se monitorizan procesos de fermentación mediante el uso de técnicas potenciométricas. A modo de ejemplo cabe destacar el trabajo de Buczkowska et al. en el que se monitoriza el proceso de fermentación del metano en un bio-reactor con el fin de predecir la demanda química de oxígeno y los ácidos grasos volátiles [51].

3.2. *Lenguas electrónicas voltamétricas*

En las lenguas potenciométricas la información que se extrae de cada medida está relacionada con el potencial de equilibrio que se establece entre el electrodo de trabajo y las distintas especies presentes en la muestra. Sin embargo, desde el punto de vista electroquímico, puede resultar mucho más interesante trabajar fuera del equilibrio, ya que la cantidad de información que se puede extraer de los ensayos es mucho mayor. En las lenguas electrónicas voltamétricas se aplican potenciales de diversa naturaleza al electrodo de trabajo midiendo la corriente resultante. Esta corriente está relacionada con los procesos tanto farádicos como no farádicos que ocurren en la interfaz entre el electrodo y la muestra (ver apartado 2.1 de esta introducción).

No existe un consenso en cuanto a la definición de lengua electrónica voltamétrica. En la bibliografía revisada se han encontrado trabajos en los que las técnicas voltamétricas se aplican de forma distinta. En alguno de ellos los datos que se procesan se extraen de los voltagramas, mientras que en otros únicamente se utiliza la información correspondiente a la evolución temporal de la corriente.

En esta tesis se ha desarrollado una lengua electrónica basada en la metodología descrita por Winkvist et al. en [52]. Dicha metodología consiste en aplicar una serie de pulsos a diversos electrodos metálicos y muestrear la corriente que circula por los mismos. A diferencia de otros autores, Winkvist no utiliza las medidas para construir un voltagrama, sino que procesa directamente los datos correspondientes a la evolución temporal de la corriente mediante técnicas multivariante. En posteriores trabajos Winkvist y su grupo de investigación de

la Universidad de Linköping fueron desarrollando el concepto de lengua electrónica voltamétrica (VET).

Sin embargo, en la bibliografía se han encontrado diversos trabajos en los que el uso de la voltametría para la implementación de lenguas electrónicas no sigue las premisas establecidas por Winquist.

Aplicación de las lenguas electrónicas voltamétricas al ámbito alimentario

Al igual que ocurre con las potenciométricas la aplicación más común de las lenguas electrónicas voltamétricas son las bebidas. En concreto, hay un gran número de trabajos publicados relacionados con el vino. En [53] Pigni et al. aplican la voltametría diferencial de pulsos (DPV) a tres electrodos de trabajo con distintos recubrimientos poliméricos para clasificar 6 variedades de vinos blancos. Los mismos autores utilizan en [54] una técnica similar para discriminar distintas variedades de vino tinto italiano. También en [55] se clasifican diversas muestras de vino tinto español mediante voltametría cíclica y de onda cuadrada (SWV). En Gay et al. aplican la voltametría de onda cuadrada a diversos electrodos modificados químicamente y a dos electrodos puros de grafito y platino para discriminar entre distintos procesos de envejecimiento de vino tinto y cuantificar el contenido en polifenoles [56]. Este mismo grupo de investigación describe en [57] un método para la detección de la adulteración de las características organolépticas en vino tinto mediante la aplicación de voltametría cíclica y voltametría de pulsos a una array de electrodos de distintos materiales con y sin modificación química. Por último, Gutiérrez et al. utilizan la voltametría cíclica junto con otras técnicas (colorimetría y potenciometría) para establecer el porcentaje de cada una de las variedades de uva en vino tinto [58].

En [59] se clasifican diversos tipos de bebidas (vinos, cervezas, cafés, leches y zumos de fruta) aplicando voltametría de onda cuadrada a un electrodo de trabajo de platino. En este mismo trabajo y con la misma técnica se consigue cuantificar el contenido de zumo de naranja puro en disoluciones preparadas. Arrieta et al. utilizan la voltametría cíclica para discriminar entre disoluciones preparadas para simular distintos sabores (amargo, dulce, salado, agrio y astringente) [60]. La misma técnica es utilizada por este grupo de investigación en [61] para clasificar 21 cervezas de distintas marcas entre rubias y negras, y para cuantificar su contenido en iso-alfa-ácidos y alcohol.

La voltametría también se ha aplicado al análisis de téis. En [62] se utiliza la lengua electrónica voltamétrica creada por Winkquist para la discriminación de diversas marcas de téis negros y verdes. En este caso pulsos de distinta naturaleza (de gran amplitud, de pequeña amplitud y en escalera) fueron aplicados a electrodos de trabajo de Ir, Pt y Rh y la evolución temporal de la señal de corriente fue procesada mediante PCA's. En [63] y [64] se utiliza la misma técnica aplicada a electrodos de Au, Ir, Pd, Pt y Rh para clasificar distintos tipos de téis en función de su sabor. La clasificación obtenida mediante la lengua electrónica se compara con una clasificación llevada a cabo por un "catador" de téis obteniéndose una muy buena correlación entre ambos métodos.

Las lenguas electrónicas voltamétricas también se han utilizado en la industria láctea. Por un lado Winkquist et al. en [65] aplican la voltametría de pulsos de gran amplitud (LAPV) a cuatro electrodos de oro, platino, rodio y acero inoxidable para monitorizar on-line el proceso de limpieza de una planta de pasteurización de productos lácteos. Por otro, esa misma técnica es utilizada en [66] para predecir el recuento bacteriano de muestras de leche durante su almacenamiento.

La medida de aceites mediante voltametría presenta el problema de que su baja conductividad dificulta la circulación de la corriente. Un grupo de investigación de la Universidad de Valladolid plantea dos posibles soluciones a este problema. Por un lado, en [67] preparan extractos de 6 muestras de aceites de oliva virgen con distintos grados de amargor y aplican la voltametría cíclica a un array de electrodos poliméricos para cuantificar el contenido en polifenoles de dichas muestras. Por otro lado, en [68] establecen el nivel de amargor utilizando unos electrodos de pasta de carbono (CPE) contruidos a partir de las muestras de aceite que se quieren evaluar. Dichos electrodos son caracterizados mediante voltametría cíclica en disoluciones de cloruro de potasio y ácido clorhídrico. El comportamiento observado en los voltagramas se corresponde con la naturaleza de la disolución pero también con la del electrodo. Esta técnica es novedosa ya que la sustancia objeto de estudio no se encuentra en la disolución sino en el electrodo.

En [69] y [70] se presentan sendos trabajos en los que se cuantifica el contenido de cloruro de sodio, nitritos y nitratos en carne picada. En la primera referencia se utiliza una lengua voltamétrica (análoga a la creada por Winkquist) que integra los siguientes metales: Au, Pt, Ir, Rh, Ag, Cu, Co y Ni. La técnica voltamétrica aplicada es la voltametría de pulsos pero aplicando un array de pulso hecho a

medida para esta experiencia en base a análisis previos realizados con voltametría cíclica. Los datos de la evolución temporal de la señal de corriente son recogidos y procesados mediante una regresión PLS. Los resultados muestran una muy buena predicción de los tres tipos de sales. En [70] se combina la voltametría de pulsos (esta vez con electrodos de Au, Pt, Ir y Rh) con la espectroscopia de impedancias. Se llevan a cabo modelos de predicción independientes para cada técnica y uno conjunto. Los resultados demuestran que el modelo más robusto es el construido a partir de la combinación de las dos técnicas.

Finalmente en [71] se describe una técnica mediante la cual se puede monitorizar la frescura de pescado aplicando técnicas voltamétricas. En concreto, se aplica voltametría cíclica y voltametría de pulsos de onda cuadrada a electrodos de carbono para determinar el tiempo de almacenamiento de tencas. Las medidas de voltametría se llevaron a cabo en extractos líquidos del pescado en distintos días de almacenamiento.

Otras aplicaciones de las lenguas electrónicas voltamétricas

El análisis de aguas es otra de las aplicaciones en las que las lenguas electrónicas voltamétricas están teniendo un gran desarrollo. En [72] se utilizan 8 sensores creados mediante serigrafía y modificados con enzimas para clasificar aguas con distintos grados de contaminación (no tratada, normal, alerta y alarma). Para ello se mide la evolución temporal de la corriente al aplicar a los electrodos escalones de tensión. Los datos resultantes se tratan con PCA lográndose una clara discriminación entre las muestras de cada categoría. Krantz-Rülcker et al. en [10], además de hacer un repaso de las aplicaciones medioambientales de las lenguas electrónicas, presentan un trabajo en el que se monitorizan los distintos pasos del proceso de potabilización del agua mediante voltametría de pulsos utilizando la lengua electrónica creada por Winkvist con electrodos de Au, Ir, Rh y Pt. Otro trabajo relacionado con el análisis de la calidad del agua se describe en [73]. En este caso se miden aguas residuales de fábricas de papel en flujo continuo mediante la lengua voltamétrica desarrollada por Winkvist con electrodos de Au, Pt y Rh. El sistema diseñado permite clasificar aguas provenientes de distintas fábricas y cuantificar la demanda química de oxígeno, la conductividad y el pH. Por último, en [74] se aplica esta misma lengua voltamétrica para la cuantificación de distintos compuestos en agua potable (hipoclorito de sodio, cloruro sódico y bisulfito sódico).

Las lenguas electrónicas voltamétricas también se han aplicado a la monitorización del funcionamiento de una lavadora. En este sentido Ivarsson et al. presentan en [75] un trabajo en el que la lengua electrónica voltamétrica (VET) se utiliza para supervisar los ciclos de enjuague de una lavadora. Aplicando la voltametría de pulsos a electrodos de iridio y platino se consigue establecer cuál es el número óptimo de ciclos de enjuague necesarios para que no queden restos de jabón en la ropa. Por otra parte en [76] se describe un sistema de lengua electrónica voltamétrica que permite la cuantificación del detergente en lavadoras durante el proceso de lavado.

El grupo de investigación de la Universidad de Linköping ha publicado dos trabajos [77][78] en los que se utiliza su lengua electrónica voltamétrica para la monitorización del crecimiento de hongos en medios líquidos. En el primero de ellos se aplica la voltametría de pulsos a electrodos de Ir, Rh, Au y Pt para la cuantificación del ergosterol y del pH durante el crecimiento del hongo. En la segunda publicación se utiliza la misma técnica para discriminar entre dos especies de hongos en distintos medios líquidos. Los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia. La conclusión del trabajo es que, si bien la lengua electrónica no es capaz de dar información específica sobre el contenido de las muestras, su capacidad de discriminación entre los dos tipos de hongos es similar a la del método basado en HPLC, siendo una técnica mucho más barata y sencilla. Zaho et al. en [79] describen un trabajo similar en el que se discriminan cuatro tipos diferentes de hongos aplicando voltametría de pulsos de anchura variable a seis electrodos de trabajo (paladio, platino, oro, plata, tungsteno y titanio).

Por último, Campos et al. han aplicado una lengua electrónica voltamétrica constituida por 8 electrodos de trabajo (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Cu, Co y Ni) a la detección de simulantes de agentes nerviosos en líquidos [80].

3.3. Otras lenguas electrónicas

Lenguas electrónicas impedimétricas

Otra de las técnicas electroquímicas aplicadas al desarrollo de lenguas electrónicas es la espectroscopía de impedancias. En este tipo de lenguas se pueden dar diversas configuraciones: en algunos casos se trabaja sobre un único

electrodo y las medidas se realizan para varias frecuencias, en otros se miden varios electrodos a una única frecuencia y, por último, hay casos en los que se utilizan varios electrodos y se realizan medidas a varias frecuencias. La amplitud de la señal aplicada y la configuración de la medida (2 o 3 electrodos) también cambian en función de la aplicación (ver apartado 2.6).

En [21] Masot desarrolla un sistema de lengua electrónica basado en electrodos de distinta naturaleza (electrodo de aguja, electrodo doble y electrodo de punta flecha) a los que aplica señales de 500 mV de amplitud y frecuencias comprendidas en el rango de 1 Hz a 1 MHz para determinar parámetros fisicoquímicos como el contenido en sal y la humedad en carne picada y lomo de cerdo [81], para detectar el nivel de curado en quesos o para estudiar la frescura de pescado.

En [82] y [83] Pioggia et al. presentan un trabajo en el que se aplica una señal senoidal de 150 Hz a un array formado por 5 electrodos de membrana polimérica de distinta naturaleza para medir disoluciones que simulan los 5 sabores básicos (amargo, dulce, umami, salado y ácido). En esta misma línea Ruil et al. aplican señales senoidales en el rango de frecuencias de 20 Hz a 100 kHz a electrodos interdígitos con distintos recubrimientos poliméricos para la detección y discriminación de sacarosa, cloruro de sodio, cloruro de potasio y ácido clorhídrico [84]. También en [85] se cuantifican el sodio, el potasio y el amonio en disolución mediante una lengua impedimétrica compuesta por un array de microelectrodos con distintos recubrimientos poliméricos. El rango de frecuencias de trabajo en este caso es de 60 Hz a 1 MHz, siendo 20 mV la amplitud de las señales senoidales aplicadas. Este mismo grupo de investigación plantea en [86] un trabajo en el que se utiliza esta misma técnica para cuantificar los mismos iones, pero esta vez las medidas se llevan a cabo con un sistema de flujo continuo.

La espectroscopía de impedancias también ha sido utilizada para la discriminación de 6 marcas de té negro en [87]. En este caso se aplican señales senoidales en el rango de 1 Hz a 100 kHz a seis electrodos de trabajo (platino, oro, plata, carbono vítreo y dos electrodos con recubrimiento polimérico). En [88] se aplican señales senoidales con frecuencia que van desde 0,1 Hz a 10 kHz a electrodos de grafito modificados para cuantificar contaminantes de origen microbiológico. Moraes et al. en [89] presentan una lengua electrónica que permite la determinación de colesterol en yemas de huevo basada en electrodos interdígitos modificados. La frecuencia de las

señales aplicadas en este caso va desde 100 Hz a 1000 Hz. Este mismo grupo de investigación aplica la espectroscopía de impedancias a diversos electrodos de membrana polimérica para la clasificación de vinos en función de la cosecha y de la variedad de la uva [90].

Lenguas electrónicas basadas en ondas acústicas

Los sensores de ondas acústicas basan su funcionamiento en el estudio de la deformación que la muestra produce sobre la onda acústica que se le aplica. La forma en la que la amplitud y la frecuencia de la onda acústica son afectadas al atravesar la muestra puede relacionarse con parámetros físicos de la misma como la permitividad, la conductividad o la viscosidad.

En [91] se aplica la tecnología SH-SAW (sensores de onda acústica de superficie horizontal) para la discriminación entre disoluciones de distintos sabores (HCl para el ácido, NaCl para el salado, quinina para el amargo y sacarosa para el dulce). La lengua se implementa mediante sensores interdígitos formados por 28 electrodos de 17 μm de ancho separados por 17 μm y la frecuencia de la señal aplicada es de 60 MHz. Leonte et al. presentan en [92] un trabajo en el que esta misma tecnología se utiliza para determinar 6 sabores: dulce (sacarosa), salado (cloruro sódico), ácido (ácido acético), amargo (quinina), umami (glutamato sódico) y “metálico” (sulfato de hierro). En [93] se describe una lengua electrónica basada en sensores SAW capaz de discriminar diferentes muestras de vino tinto en función de la variedad de uva y del proceso de elaboración.

Otra tecnología basada en ondas acústicas son los sensores de microbalanza de cristal de cuarzo. En [94] se hace una revisión de las distintas variantes de esta tecnología en función de la geometría y disposición de los electrodos, de los materiales utilizados para su construcción así como de las frecuencias aplicadas. Además se detallan las aplicaciones que esta técnica ha tenido en los últimos años entre las que se hayan las narices y las lenguas electrónicas. En [95] esta tecnología se aplica para cuantificar quinina (sabor amargo) y sacarina (sabor dulce) en mezclas binarias.

Lenguas electrónicas ópticas

Dentro de las lenguas electrónicas ópticas existen diversas tecnologías. Una de ellas se basa en el empleo de sensores potenciométricos activados por luz

(LAPS). Por ejemplo, en [96] se mide la corriente que circula por un biosensor con estructura celular cuando se le aplican pulsos de luz para detectar el sabor ácido. Hu et al. utilizan en [97] un array de LAPS para detectar iones de metales pesados (Pb^{2+} , Cr^{6+} y Fe^{3+}).

En [98] se utiliza la colorimetría para clasificar diferentes tipos de aminas. Chang et al. presentan en [99] un equipo portátil capaz de cuantificar la teína y el ácido tánico en muestras de té mediante la aplicación de luz ultravioleta y la medida de la radiación fluorescente generada.

3.4. *Sistemas híbridos*

Son numerosos los trabajos que se han encontrado en la bibliografía consultada en los que un mismo sistema de medida combina varias técnicas con objeto de aumentar la resolución de la medida o mejorar la capacidad de discriminación.

En algunos de estos trabajos se describen lenguas electrónicas basadas en dos o más técnicas. Quizás uno los trabajos más interesantes en este sentido sea el que aparece en [100]. En él se combinan las lenguas electrónicas desarrolladas por los grupos de investigación de la Universidad de Linköping (voltamétrica) y de la Universidad de San Petersburgo (potenciométrica) para discriminar cuatro tipos de hongos y una levadura. El estudio se lleva a cabo con las dos técnicas por separado y con la combinación de ambas. La conclusión del trabajo es que se obtiene mejor discriminación cuando se combinan las dos lenguas. En [101] Winqvist et al. combinan la voltametría de pulsos, la potenciometría y la conductimetría para clasificar seis tipos de leche fermentada. Gutiérrez et al. en [102] combinan la potenciometría, la voltametría y la medida de la absorbancia para cuantificar el porcentaje de cada variedad de uva en vino tinto. En [103] se combina un array de LAPS con la voltametría de redisolución para la detección de iones de metales pesados en agua de mar y en aguas residuales. Por último, en [70] Labrador et al. utilizan la voltametría de pulsos junto con la espectroscopía de impedancias para cuantificar distintos tipos de sales (nitratos y nitritos) en carne picada.

En otros trabajos se crean sistemas híbridos basados en la combinación de lenguas y narices electrónicas. Por ejemplo en [104] se asocian una lengua electrónica y una nariz electrónica para medir el pH, el peso específico y el

contenido de células sanguíneas en muestras de orina y para discriminar entre muestras de leche fresca, pasteurizada y ultrapasteurizada. Los mismos autores utilizan esa misma combinación en [105] para discriminar vinos de distintos viñedos y para cuantificar algunos de sus parámetros físicoquímicos. En [106] Di Natale et al. aplican la combinación de una nariz electrónica con una lengua electrónica para la evaluación de distintos parámetros sensoriales de vino tinto. Un grupo de investigación de la Universidad de Milán presenta sendos trabajos en los que utilizan sistemas híbridos para la clasificación de vinos. En [107] combinan una nariz electrónica con una lengua electrónica amperométrica para clasificar vinos italianos de distinta procedencia. La misma nariz y la misma lengua son utilizadas en [108] junto con la espectrofotometría para predecir una serie de parámetros sensoriales de 15 vinos italianos. Los resultados de las medidas realizadas con este sistema híbrido fueron contrastados con un panel sensorial llevado a cabo por expertos catadores, obteniéndose muy buena correlación entre ambos métodos. La combinación de lenguas y narices electrónicas también ha sido aplicada a la medida de propiedades de aceites de olivas. En [109] se presenta un método basado en la asociación de una nariz electrónica y de una lengua electrónica amperométrica para evaluar la calidad de aceites de oliva provenientes de distintas partes de Italia. Apetrei et al. combinan tres técnicas de medida: una nariz electrónica, una lengua electrónica voltamétrica y un ojo electrónico basado en la medida del espectro de transmitancia [110]. El sistema híbrido resultante se utiliza para la cuantificación del contenido en polifenoles y la determinación del índice de amargor en diferentes aceites de oliva españoles. Winqvist et al. presentan en [111] un trabajo en el que la asociación entre la lengua electrónica voltamétrica desarrollada por la Universidad de Linköping y una nariz electrónica permite mejorar la discriminación entre distintas muestras de zumos de fruta (naranja, manzana y piña). En [112] se utilizan dos sistemas de medida comerciales de la empresa Alpha MOS (la lengua electrónica Astree y la nariz electrónica Prometheus) para predecir características sensoriales de zumos de manzana de distintas marcas. Collier et al. discriminan entre diversos tipos de leche y de yogurt mediante un nariz electrónica comercial y una lengua electrónica voltamétrica [113]. La combinación de una nariz electrónica y el sensor de sabor SA402B se aplica en [114] para discriminar entre diferentes variedades de la *Perilla frutescens*, una planta de la familia de las mentas muy utilizada en medicina y alimentación en Asia.

4. Sistemas electrónicos para lenguas electrónicas

4.1. *Sistemas electrónicos para medidas potenciométricas*

Antiguamente para medir el potencial de equilibrio de una celda electroquímica se utilizaba un potenciómetro acompañado de una fuente de alimentación y de un galvanómetro para detectar la circulación de corriente. El potenciómetro se regulaba hasta que el galvanómetro no detectase paso de corriente. La tensión establecida en ese punto por el potenciómetro se correspondía con el potencial de la celda electroquímica.

Con la aparición de la electrónica los sistemas de medida potenciométricos se simplificaron. En la actualidad se utilizan voltímetros electrónicos basados en amplificadores operacionales de alta impedancia. En realidad el sistema completo se compone de una etapa amplificadora de entrada cuya misión es amplificar la tensión y al mismo tiempo evitar la circulación de corriente por la celda electroquímica. A continuación se coloca un filtro paso-bajo que elimine el ruido de alta, media y baja frecuencia [18]. Dado que lo que interesa medir es la tensión entre el o los electrodos de trabajo y el electrodo de referencia este último se conecta a la masa del circuito electrónico (que representa el potencial cero).

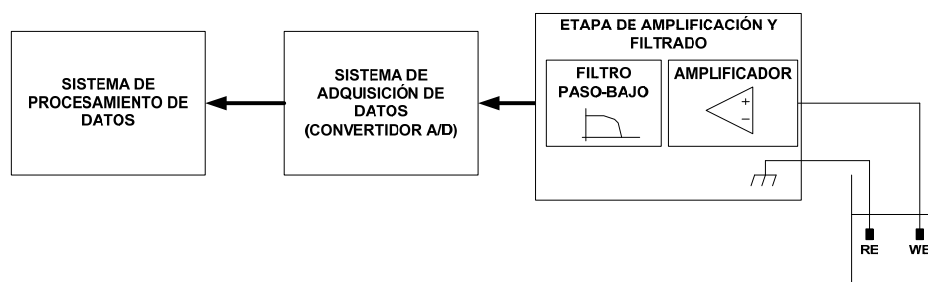


Figura 18. Diagrama de bloques de un sistema electrónico para medidas potenciométricas

En la Figura 18 se muestra el diagrama de bloques de un sistema electrónico para medidas potenciométricas. Se compone de tres etapas: la etapa de amplificación y filtrado, el sistema de adquisición de datos y el sistema de

procesamiento de datos. La primera dispone de una entrada de alta impedancia lo que impide la circulación de corriente en la celda. Además esta etapa amplifica y filtra la señal medida. La tensión analógica obtenida a la salida de este bloque es digitalizada por un sistema de adquisición de datos (integrado por un convertidor analógico-digital). El sistema de procesamiento de datos (que puede ser un ordenador o un sistema μP o μC) recoge el valor digital correspondiente a la muestra capturada y lo almacena en memoria, lo visualiza en pantalla y/o lo procesa.

En algunos de los trabajos publicados sobre lenguas electrónicas potenciométricas se recurre a sistemas comerciales como el TS-5000Z de Insent Inc. o el Astree2 de Alpha MOS [115]. En otros sin embargo se utilizan sistemas diseñados a propósito para la aplicación. En ocasiones el diseño se limita a la etapa de amplificación y filtrado, utilizando un ordenador y una tarjeta de adquisición de datos para llevar a cabo la digitalización de la señal y el procesado de los datos [18][116]; y en otros casos se implementa el diseño del sistema completo [117][118].

4.2. Sistemas electrónicos para medidas voltamétricas

Los ensayos de voltametría requieren el uso de sistemas electrónicos capaces de generar las señales de tensión, aplicar dicha tensión a la celda electroquímica, recoger los datos de la corriente generada y almacenar dichos datos para su posterior tratamiento.

En la Figura 19 se muestra un diagrama con los distintos elementos que son necesarios para llevar a cabo ensayos de voltametría. El control de la tensión de la celda y la medida de la corriente se realiza mediante el potencióstato (ver apartado 4.3). El sistema de generación y adquisición de señales establece la tensión analógica que el potencióstato debe aplicar entre el electrodo de referencia y el de trabajo ($V_{CONSIGNA}$). El potencióstato mide las señales correspondientes a la tensión aplicada (V_{V_MEDIDA}) y a la corriente que circula por el electrodo de trabajo (V_{I_MEDIDA}) y las transmite al sistema de generación y adquisición de señales para que las digitalice. El funcionamiento del sistema es coordinado por el bloque de procesamiento de datos que, por un lado, establece qué tipo de señales deben ser aplicadas a la celda electroquímica (constantes, pulsos, triangulares, senoidales) y por otro recibe los datos digitalizados de la tensión y la corriente y los almacena, visualiza y/o procesa.

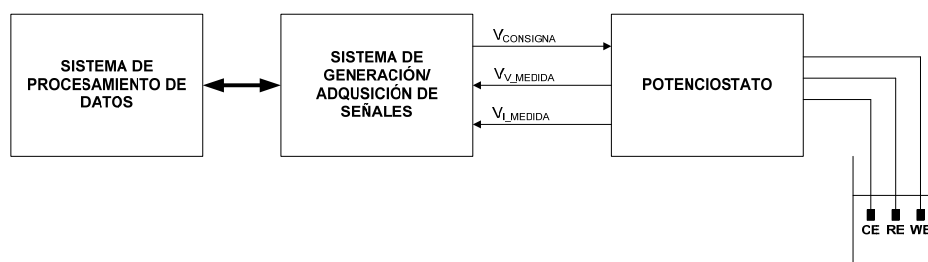


Figura 19. Diagrama de bloques de un sistema electrónico para medidas voltamétricas

En la mayoría de los trabajos consultados se recurre a equipos comerciales para llevar a cabo los ensayos de voltametría. Los equipos más frecuentemente utilizados son el Autolab PGSTAT12 y PGSTAT30 de Ecochemie [53][54][70][102] y el potencióstato modelo 263A de EG&G Instruments [55][59][60][61][67][68]. En algunas ocasiones se recurre a una solución mixta en la que una parte del sistema se diseña a medida para la aplicación. Por ejemplo, en [63] el potencióstato y el software han sido desarrollados por los autores, pero la generación y adquisición de las señales se hace mediante una tarjeta de adquisición de datos comercial. Y en muy pocos casos todo el sistema es diseñado por el grupo de investigación que firma el trabajo [69][72].

4.3. Potenciostato

4.3.1. Estructura y funcionamiento del potencióstato

Aunque existen diversas configuraciones de potencióstato, la más frecuentemente encontrada en la bibliografía consultada [14][15][119][120][121] [122] es la que aparece en la Figura 20.

El potencióstato tiene dos misiones fundamentales. Por una parte, debe aplicar entre el electrodo de referencia (RE) y el electrodo de trabajo (WE) una tensión controlada que sea independiente de los procesos que ocurren en el contraelectrodo (CE). Por otra debe medir la corriente que circula por el electrodo de trabajo. Además se debe garantizar que no haya circulación de

corriente por el electrodo de referencia para que puedan cumplirse las condiciones expuestas en el apartado 2.4 sobre el funcionamiento de la celda electroquímica a 3 electrodos.

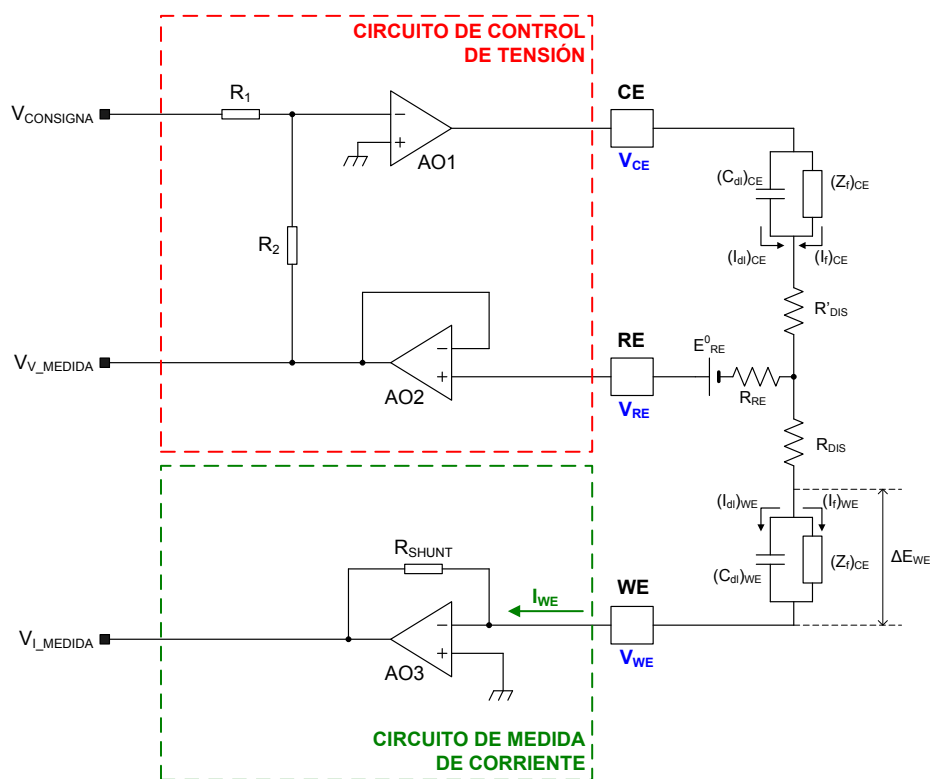


Figura 20. Diagrama de bloques de un potenciostato

Además de los 3 terminales de conexión a la celda electroquímica (CE, RE y WE), el potenciostato dispone de 3 conexiones al sistema de generación y adquisición de señales (ver apartado 4.2). Por una de estas conexiones el sistema de generación y adquisición de señales establece la tensión que debe aplicarse entre los terminales RE y WE ($V_{CONSIGNA}$). Por otra de las conexiones el potenciostato proporciona el valor real de la tensión existente entre los terminales RE y WE (V_{V_MEDIDA}). Normalmente $V_{CONSIGNA}$ y V_{V_MEDIDA} deben coincidir pero para algunas condiciones de funcionamiento del potenciostato (inestabilidades) puede que esto no sea así. Por la tercera conexión al sistema de generación y adquisición de señales el potenciostato proporciona una tensión

que se corresponde con la corriente que circula por el electrodo de trabajo (V_{L_MEDIDA}).

El potenciostato se compone de dos bloques:

- El bloque de control de tensión: este bloque tiene dos misiones. La primera es garantizar que no circulará ninguna corriente por el electrodo de referencia. Esto se consigue mediante la colocación de un amplificador de alta impedancia en configuración seguidor conectado al terminal RE. La segunda misión es aplicar entre los terminales RE y WE la tensión de consigna establecida en la entrada $V_{CONSIGNA}$. Como veremos más adelante, el terminal WE está conectado a una “tierra virtual”, por lo que a efectos eléctricos puede considerarse que su potencial con respecto al potencial de referencia del circuito electrónico es 0. Por tanto, para aplicar una tensión $V_{CONSIGNA}$ entre RE y WE basta con establecer una tensión igual a $V_{CONSIGNA}$ en RE. Para entender el funcionamiento del circuito de control se agrupan los elementos ($C_{dl})_{CE}$, $(Z_f)_{CE}$, R'_{DIS} y R_{RE} en una sola impedancia llamada Z_{CE_RE} y se reorganiza la disposición de los componentes tal y como aparece en la Figura 21.

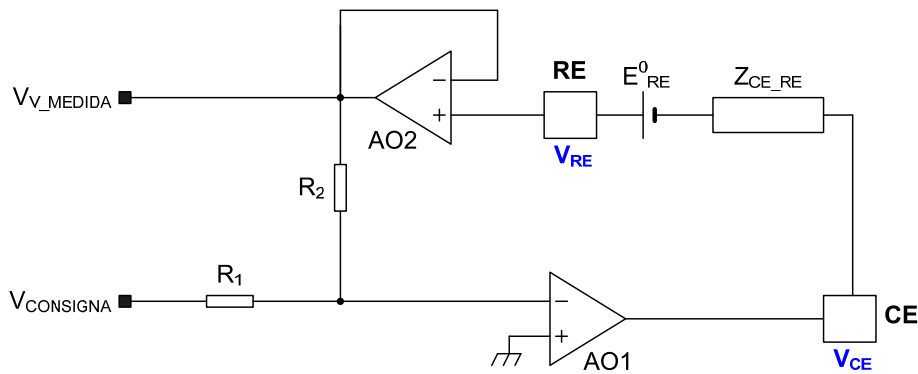


Figura 21. Bucle de realimentación del circuito de control del potenciostato

Si consideramos el amplificador operacional AO1 vemos que está configurado como amplificador inversor con una realimentación negativa en tensión formada por Z_{CE_RE} , E^0_{RE} , el amplificador operacional AO2 y R_2 . Debido a esta realimentación negativa se puede asumir que el terminal “-” de AO1 está conectado a una tierra virtual (considerando que AO1 es un amplificador operacional ideal). Si aplicamos la 1ª ley de

Kirchhoff al nodo del terminal “-“ de AO1 y asumimos una impedancia de entrada infinita para dicho operacional se cumple la igualdad de la Ecuación 5.

$$\frac{V_{CONSIGNA}}{R_1} = \frac{-V_{V_MEDIDA}}{R_2} \quad \text{Ecuación 5}$$

Si elegimos R_1 y R_2 del mismo valor se cumple que V_{V_MEDIDA} es igual a $-V_{CONSIGNA}$; y puesto que AO2 está configurado como amplificador seguidor también se cumple que V_{RE} es igual a $-V_{CONSIGNA}$. En cuanto a V_{CE} deberá tomar el valor que permita que se cumpla la Ecuación 5. En función de las características y ubicación del contraelectrodo y de la naturaleza de disolución, V_{CE} puede llegar a ser mayor que V_{RE} . Esto a priori no supone ningún problema mientras V_{CE} no se haga mayor que la tensión de saturación de los amplificadores operacionales.

Desde el punto de vista del circuito electrónico el terminal WE está 0 V mientras que el terminal RE tiene aplicada una tensión igual a $-V_{CONSIGNA}$. Sin embargo, desde el punto de vista electroquímico se puede considerar que se está aplicando un potencial a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo cuya expresión vendría dada por la Ecuación 6.

$$\Delta E_{WE} = -V_{CONSIGNA} - E_{RE}^0 - R_{DIS} \cdot I_{WE} \quad \text{Ecuación 6}$$

A lo largo de esta tesis consideraremos que el potencial se aplica al electrodo de trabajo aunque desde el punto de vista eléctrico el terminal WE está conectado a la masa virtual y la tensión se aplica al terminal RE. Dado que E_{RE}^0 es un potencial estable y conocido puede ser compensado fácilmente. Sin embargo, el valor del término $R_{DIS} \cdot I_{WE}$ puede variar a lo largo del ensayo con lo que su compensación resulta más problemática.

- El bloque de medida de corriente: este bloque debe generar una tensión V_{I_MEDIDA} que sea proporcional a la corriente que circula por el electrodo de trabajo. En la Figura 20 podemos observar cómo el circuito de medida consiste en un amplificador operacional (AO3) configurado en modo de convertidor corriente-tensión con realimentación negativa a través de la resistencia R_{SHUNT} . En estas condiciones el terminal “-“ de AO3 se

comporta como una tierra virtual por lo cual, aplicando de nuevo la 1ª ley de Kirchhoff y considerando una impedancia de entrada infinita del operacional, se cumplirá la expresión de la Ecuación 7.

$$I_{WE} = \frac{-V_{I_MEDIDA}}{R_{SHUNT}} \Rightarrow V_{I_MEDIDA} = -R_{SHUNT} \cdot I_{WE} \quad \text{Ecuación 7}$$

4.3.2. Problemática del potencióstato

En la práctica los potencióstatos plantean algunos problemas derivados de las siguientes cuestiones:

- Las características no ideales de los amplificadores operacionales que lo componen (impedancia de entrada y ganancia en bucle abierto finitas).
- La conductividad finita de la disolución.
- Las componentes capacitivas de la celda electroquímica.
- La resistencia interna del electrodo de referencia.

Las dificultades más importantes a las que hay que hacer frente cuando se trabaja con un potencióstato son las inestabilidades, que pueden dar lugar a oscilaciones de las señales de tensión y corriente, y la compensación de la resistencia de la disolución.

Inestabilidades del potencióstato

Son varias las publicaciones en las que se comentan los problemas de inestabilidad que pueden aparecer en las medidas con potencióstatos en determinadas condiciones de trabajo [119][123][124][125][126]. Los problemas de inestabilidad pueden tener su origen tanto en el circuito de control de tensión como en el de medida de corriente.

En [123] se establece la función de transferencia de una versión simplificada del circuito de control de tensión. En la expresión obtenida el término del cociente puede anularse bajo determinadas condiciones. Estas condiciones dependen de la ganancia en bucle abierto del amplificador operacional, las características de la celda electroquímica (celdas electroquímicas muy capacitivas son más propensas a las inestabilidades) y la resistencia de shunt del circuito de medida

de corriente. El valor nulo del cociente daría lugar a una ganancia infinita del circuito de control, lo que provocaría que la tensión de salida se saturase o entrase en oscilación. Para evitar este problema se recomienda limitar el ancho de banda del circuito de control de tensión, lo que puede lograrse colocando un condensador en el bucle de realimentación de dicho circuito. Davis et al. analizan en [124] las inestabilidades del circuito de medida de corriente en configuración convertidor corriente-tensión. Para ello establecen un modelo que considera una ganancia en bucle abierto del operacional no infinita. En el modelo construido aparece una componente inductiva que, para determinadas frecuencias y determinados valores de la resistencia de shunt, puede entrar en resonancia con la capacidad de la celda electroquímica, generando inestabilidades que provoquen oscilaciones a la salida del circuito. Como solución a este problema de resonancia se proponen la utilización de resistencias de shunt de valor bajo (lo cual no es viable cuando se quieren medir corrientes bajas) y la colocación de un condensador en paralelo con la resistencia shunt que compense esa componente inductiva. En [119] y [125] las inestabilidades del potencióstato se relacionan con la componente capacitiva de la celda electroquímica que introduce un desfase que puede provocar que el circuito de control de tensión entre en oscilación. Para evitar este desfase se proponen soluciones como reducir la impedancia del electrodo de referencia, reducir el ancho de banda del circuito de control de tensión, añadir una resistencia en serie con el contraelectrodo o colocar un condensador en paralelo con la resistencia shunt del circuito de medida de corriente. En [126] se plantean dos soluciones para estabilizar un potencióstato consistentes en la colocación de condensadores entre el electrodo de referencia y el contraelectrodo o en paralelo con la resistencia de shunt.

De todo lo expuesto se deducen una serie de consideraciones que deben ser tenidas en cuenta a la hora de diseñar y trabajar con un potencióstato:

- Los amplificadores operacionales utilizados deben tener un comportamiento lo más cercano posible al ideal, sobre todo en lo que respecta a la ganancia en bucle abierto y a la impedancia de entrada.
- Se debe reducir la resistencia del electrodo de referencia, para ello es necesario asegurarse que el electrodo de referencia utilizado está en buenas condiciones de funcionamiento (ver apartado 5).
- La componente capacitiva de la celda electroquímica debe minimizarse. Aunque no siempre es posible modificar la estructura interna de la celda,

- sí que se puede tener cuidado con el cableado que va de la celda al potencióstato.
- Para estabilizar el circuito de control de tensión se puede poner un condensador en el bucle de realimentación (ver Figura 22). Este condensador afectará a las señales generadas, por lo cual debe ser conectado únicamente cuando las condiciones de estabilidad del potencióstato así lo requieran.
 - Con el fin de estabilizar el circuito de medida de corriente se puede colocar un condensador en paralelo con la resistencia de shunt tal y como aparece en la Figura 22. El condensador modificará la medida de corriente por lo que debe elegirse el menor valor que estabilice el sistema.

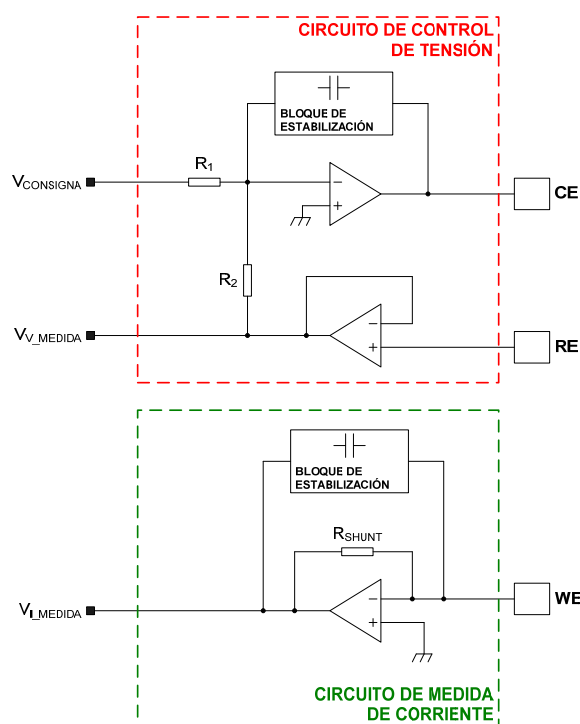


Figura 22. Diagrama de bloques de un potencióstato con circuitos de estabilización

Compensación de la resistencia de la disolución

De la Ecuación 6 se deduce que existe una diferencia entre la tensión de consigna que se quiere aplicar a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de

trabajo (V_{CONSIGNA}) y la que realmente se le aplica (ΔE_{WE}). Este error viene dado por el potencial del electrodo de referencia y por la caída de potencial en la disolución en el tramo que va desde el electrodo de referencia hasta el de trabajo. Si se trabaja con un electrodo de referencia adecuado, el primer término tiene un valor conocido y estable; por lo que no representa un problema ya que puede ser tenido en cuenta cuando se establece el valor de V_{CONSIGNA} . Sin embargo, el segundo término plantea un problema ya que tanto la conductividad de la disolución como la corriente pueden variar durante el ensayo y, por tanto, la caída de potencial no será constante ni fácilmente predecible [127].

Existen métodos para minimizar esta caída de potencial. Por ejemplo se puede aumentar la conductividad de la disolución mediante un electrolito de soporte (*supporting electrolyte*). Otra opción es acercar mucho el electrodo de trabajo al electrodo de referencia. Pero cuando realmente se quiere controlar con exactitud la tensión aplicada a la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo, la caída de tensión en la disolución debe ser compensada. La propuesta que se hace en [127] para llevar a cabo dicha compensación es medir el valor de R_{DIS} durante el tiempo de ensayo a intervalos de tiempo cortos para poder recalcular en cada instante el valor de la tensión V_{CONSIGNA} incluyendo la corrección adecuada.

En ninguna de las experiencias realizadas en la presente tesis ha sido necesario establecer de forma rigurosa un vínculo entre los valores experimentales y los teóricos. Por lo tanto, no ha sido objetivo de esta tesis fijar la tensión de la interfaz electrodo-disolución del electrodo de trabajo con total exactitud. Por otro lado en todas las experiencias desarrolladas siempre se ha trabajado con conductividades de las muestras altas. En consecuencia, no se consideró necesario la incorporación al diseño del sistema de medida de ningún mecanismo de compensación.

5. Electroodos

5.1. *Electrodos de referencia*

Un electrodo de referencia debe proporcionar un potencial estable de manera que las variaciones detectadas en el potencial de la celda correspondan al

electrodo de trabajo [16]. Existen diversos tipos de electrodos de referencia, a continuación se detallan los tres más importantes.

Electrodo de hidrógeno estándar

Este electrodo no suele utilizarse en montajes prácticos debido a la complejidad de su implementación. Su importancia radica en que es el electrodo de referencia utilizado para establecer el potencial estándar del resto de electrodos; su potencial es por definición de 0 V a cualquier temperatura. Consiste en un electrodo platinado inmerso en una disolución en la que la actividad del protón de hidrógeno H^+ es 1,00 y en la que burbujea gas H_2 a una presión de 1 atm (ver Figura 23).

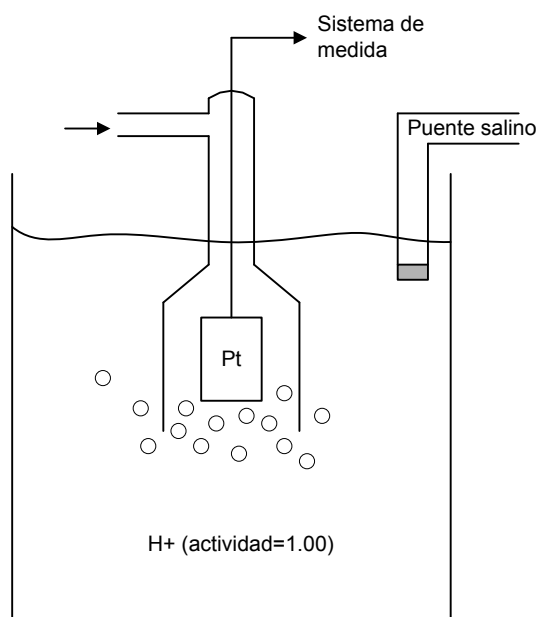


Figura 23. Electrodo estándar de hidrógeno

Electrodo de calomelanos

El electrodo de calomelanos (ver Figura 24) se compone de un tubo interior que contiene una pasta con Hg , Hg_2Cl_2 y KCl saturado. Este tubo se halla dentro de otro tubo en el que hay una disolución de KCl saturada. Un pequeño orificio conecta ambos tubos. En la punta del tubo exterior se encuentra el puente salino

implementado mediante vidrio poroso o fibra de amianto. El potencial de este electrodo a 25°C es de +0,2444 V y se mantiene estable a esa temperatura siempre que la disolución del tubo exterior esté saturada. El problema de este tipo de electrodos es que la solubilidad del KCl es sensible a la temperatura, por lo que no puede ser utilizado a altas temperaturas.

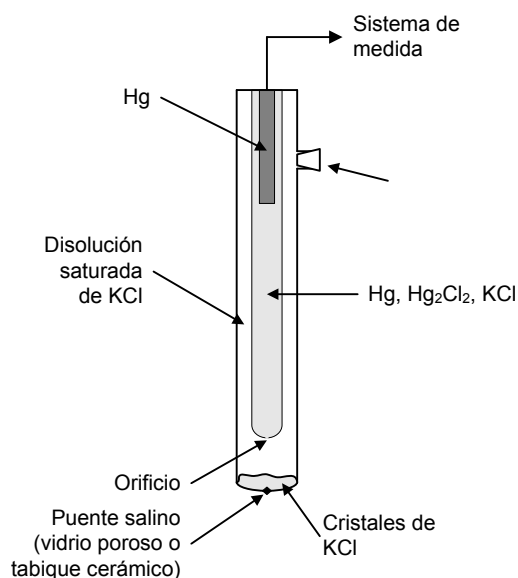


Figura 24. Electrodo de referencia de calomelanos

Electrodo de plata/cloruro de plata

El electrodo de plata/cloruro de plata consiste en un hilo de plata cuyo extremo está recubierto por una fina capa de AgCl. El hilo está inmerso en una disolución de KCl. Todo ello se introduce en un tubo en cuyo extremo se implementa un puente salino mediante vidrio poroso. Su potencial cuando la disolución de KCl está saturada es de +0,197 V. Este electrodo tiene la ventaja de ser operativo a altas temperaturas; sin embargo, es más propenso a reacciones con la muestra que den lugar a complejos insolubles de plata que bloquen el puente salino.

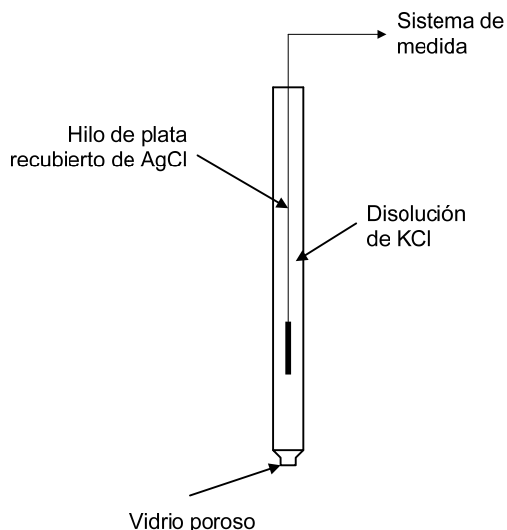


Figura 25. Electrodo de referencia de plata/cloruro de plata

5.2. Electrodo indicadores o de trabajo

El electrodo indicador o de trabajo es el electrodo en el que se producen los procesos electroquímicos de interés. Existen diversos tipos de electrodos indicadores [16][17][18]. A continuación se hace un repaso de los más importantes.

Electrodos metálicos

Se distinguen tres tipos de electrodos metálicos [16]:

- Electrodo metálico de 1^{er} tipo: son aquellos electrodos que están en contacto con una disolución que contiene su propio ion.
- Electrodo metálico de 2^o tipo: cuando el potencial de un electrodo de 1^{er} tipo responde al potencial de otro ion que está en equilibrio con el ion del metal, dicho electrodo se denomina de 2^o tipo.
- Electrodo Redox: se trata de un electrodo cuyo potencial viene determinado por una reacción de oxidación-reducción en la que no interviene el ion del metal.

Ejemplos de utilización de electrodos metálicos en lenguas electrónicas pueden encontrarse en [12][20][42][65][66][74].

Electrodos selectivos de iones (ISE)

Se trata de electrodos que incorporan algún elemento (normalmente una membrana selectiva) mediante el cual se consigue que el potencial del electrodo esté relacionado con la concentración de una de las especies presentes en la muestra. En la mayoría de los casos los electrodos selectivos de iones no son sensibles exclusivamente a un ion determinado, sino que su respuesta puede verse afectada por otros iones presentes en la muestra (interferentes). En este caso para cada uno de los interferentes se define un coeficiente de selectividad. En los electrodos selectivos de iones comerciales el fabricante proporciona estos coeficientes. Cuando no se dispone de ellos, existen métodos para determinarlos experimentalmente.

En la mayoría de los casos este tipo de electrodos se implementan mediante una membrana. Estas membranas están construidas de forma que su potencial depende de la concentración de uno o varios analitos. El primer electrodo selectivo de iones fue el electrodo de pH. Desde entonces se han hecho importantes avances en este campo [128][129]. Inicialmente los electrodos de membrana estaban constituidos por un electrodo de referencia inmerso en una disolución interna y la membrana separaba la disolución interna de la muestra. Sin embargo, la incorporación de una disolución interna al sensor puede resultar un problema en algunos casos como por ejemplo en la implementación de microelectrodos [128]. En 1970 aparecieron los primeros sensores poliméricos de contacto sólido. Consistían en un hilo de metal recubierto de una membrana polimérica selectiva de iones. Desde entonces el uso de esta tecnología se ha extendido de manera notable. En muchos de los trabajos consultados se hace uso de este tipo de electrodos [26][29][34][51][118].

Se distinguen diversos tipos de electrodos selectivos de iones en función de la naturaleza de la membrana [15][16][17]:

- Electrodos de membrana de vidrio: en este caso la membrana se implementa mediante un vidrio de espesor muy pequeño. El electrodo de membrana de vidrio más conocido es el electrodo de pH.

- Electrodo de membrana cristalina: constan de membranas obtenidas a partir de sales inorgánicas monocristalinas o policristalinas no solubles.
- Electrodo de membrana líquida: se implementan mediante membranas poliméricas porosas saturadas con un intercambiador iónico líquido.

Electrodos ISFET (Ion Sensitive Field-Effect Transistor)

Estos electrodos basan su funcionamiento en el transistor de efecto de campo MOSFET. El MOSFET dispone de tres terminales: el drenador, el surtidor y la puerta. Cuando se aplica un potencial entre la puerta y el surtidor se crea un canal entre el drenador y el surtidor que permite la circulación de corriente. En el caso de los electrodos ISFET la estructura no incorpora un terminal de puerta metálico sino que el dieléctrico, en el que debería estar ubicado el terminal de puerta, se expone directamente a la disolución. De esta forma el contenido iónico de la muestra determina la generación del canal entre el drenador y el surtidor.

Electrodos indicadores contruidos a partir de muestra

Normalmente los electrodos indicadores se introducen en la muestra con objeto de obtener una señal eléctrica que nos permita extraer conclusiones sobre la composición de la muestra. Sin embargo, se han encontrado trabajos en los que el electrodo se construye a partir de la muestra y se introduce en una disolución cuyo contenido se conoce. Las señales eléctricas obtenidas en este caso dependen del contenido de la disolución y de la naturaleza del electrodo. Dado que la disolución es siempre la misma, las diferencias entre las distintas medidas pueden achacarse a las diferencias en las muestras contenidas en el electrodo. Esta metodología se suele utilizar cuando la muestra que se desea medir presenta una conductividad muy baja, como por ejemplo ocurre con muestras de aceite [68].

6. Procesado de datos

La medida mediante lengua electrónica de una determinada muestra (ensayo) genera un vector de datos cuyo tamaño depende del tipo de lengua utilizada. Por ejemplo, en una lengua electrónica potenciométrica el vector de ensayo contiene

un dato por cada electrodo; mientras que en las voltamétricas dicho vector, por lo general, incluye un valor por cada punto de la evolución temporal de la corriente. Los datos correspondientes a los ensayos realizados sobre un conjunto de muestras (experiencia) constituyen una matriz que contiene un vector de ensayo por cada muestra analizada.

Las matrices de experiencia incluyen generalmente una gran cantidad de datos dado que el tamaño de los vectores de ensayo suele ser grande. En efecto, estos sistemas se basan en el uso de múltiples sensores cada uno de los cuales recoge uno o varios datos. Por otro lado, en las medidas con lenguas electrónicas se producen efectos de interferencia entre las distintas especies presentes en la matriz compleja. En estas condiciones, resulta inviable establecer modelos de clasificación o predicción basados en el vínculo entre la teoría de los procesos que tienen lugar durante la medida y los resultados de la misma. Todo ello obliga a utilizar técnicas multivariante en el procesamiento de los datos recogidos [18][21][130][131]. Estas herramientas son las mismas que se aplican para otras técnicas analíticas como las narices electrónicas [132][133]. El tipo de análisis multivariante que debe aplicarse para cada experiencia depende de la naturaleza de la misma.

En ocasiones las experiencias se llevan a cabo sobre muestras de las que no se dispone de información previa. En la Figura 26 se indica la estructura típica de la matriz de datos correspondiente a una experiencia de este tipo. Las columnas de dicha matriz corresponden a las variables independientes, es decir, a los sensores o los elementos de medida utilizados en la experiencia. Las filas de la matriz corresponden a cada una de las muestras analizadas (vectores de ensayo). Por ejemplo, en una experiencia mediante lengua electrónica potenciométrica en la que se empleen electrodos de Au, Ag, Cu, Co, Pt, Ni, Ir y Rh, el elemento D_{53} de la matriz corresponde a la tensión medida con el electrodo de cobre sobre la muestra 5. En estos casos la herramienta multivariante más utilizada es el análisis de componentes principales (PCA) [134], aunque también pueden aplicarse técnicas basadas en redes neuronales [132]. El resultado de la aplicación de estas técnicas es una clasificación no supervisada. Es decir, se crean agrupaciones en base a las medidas realizadas, de forma que aquellas muestras que presenten vectores de ensayo “parecidos” serán incluidas en el mismo grupo (clase).

MUESTRAS	VARIABLES INDEPENDIENTES				
	X_1	. . .	X_j	. . .	X_N
S_1	D_{11}	. . .	D_{1j}	. . .	D_{1N}
.	.		.		.
.	.		.		.
.	.		.		.
S_i	D_{i1}	. . .	D_{ij}	. . .	D_{iN}
.	.		.		.
.	.		.		.
.	.		.		.
S_M	D_{M1}	. . .	D_{Mj}	. . .	D_{MN}

Figura 26. Matriz de datos de una experiencia para clasificación no supervisada

En otros casos, las muestras vienen acompañadas de información sobre su clasificación o sus propiedades. La matriz de este tipo de experiencias, además de variables independientes, incluye variables dependientes que corresponden a la información conocida de las muestras (Figura 27). Por ejemplo, en una experiencia de vinos esta información podría ser la bodega de origen o el contenido en polifenoles. Este tipo de experiencias posibilitan la generación de modelos de clasificación o predicción que permitirán clasificar o cuantificar parámetros de nuevas muestras cuyas características se desconozcan. Cuando el objetivo es generar modelos de clasificación, las técnicas utilizadas son el análisis discriminante (LDA o PLS-DA) y las redes neuronales (ANN) [132] [135]. Para la generación de modelos predictivos de cuantificación la herramienta más utilizada es la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) [134], aunque existen otras como la regresión por componentes principales (PCR) [132].

En la mayoría de los trabajos descritos en la bibliografía consultada se aplican alguna de estas técnicas. En algunos de ellos se aplican varias técnicas comparando su efectividad. Por ejemplo, en [35] se utilizan las técnicas de PCA, PLS y ANN, siendo las redes neuronales las que mejores resultados ofrecen. Sin embargo, en [26] se aplican las técnicas de PCA, PCR, BP-ANN y PLS. En este caso los autores concluyen que la regresión por mínimos cuadrados parciales es la herramienta más adecuada. Por último, en algunos trabajos se combinan estas técnicas para optimizar la discriminación o la predicción. En [136] se propone una metodología en dos fases: primero se aplica un PCA o un PLS-DA para llevar a cabo la selección de variables que se

utilizarán en el posterior procesamiento mediante ANN. La conclusión de este trabajo es que la combinación de PLS-DA junto con ANN permite una mejora en el rendimiento del modelo en comparación con la aplicación de cualquiera de las dos técnicas por separado.

	VARIABLES INDEPENDIENTES					VARIABLES DEPENDIENTES				
MUESTRAS	X_1	. . .	X_j	. . .	X_N	Y_1	. . .	Y_k	. . .	Y_Q
S_1	D_{11}	. . .	D_{1j}	. . .	D_{1N}	P_{11}	. . .	P_{1k}	. . .	P_{1Q}
.	.		.		.	.		.		.
.	.		.		.	.		.		.
.	.		.		.	.		.		.
S_i	D_{i1}	. . .	D_{ij}	. . .	D_{iN}	P_{i1}	. . .	P_{ik}	. . .	P_{iQ}
.	.		.		.	.		.		.
.	.		.		.	.		.		.
.	.		.		.	.		.		.
S_M	D_{M1}	. . .	D_{Mj}	. . .	D_{MN}	P_{M1}	. . .	P_{Mk}	. . .	P_{MQ}

Figura 27. Matriz de datos de una experiencia para la generación de modelos de clasificación o de predicción

Los métodos multivariantes empleados en la presente tesis son el análisis de componentes principales y fundamentalmente la regresión por mínimos cuadrados parciales.

6.1. Tratamiento previo de los datos

Compresión de los datos

Para algunas de las técnicas empleadas en lenguas electrónicas el número de valores que se recogen durante las medidas puede ser considerablemente alto. Por ejemplo, en voltametría de pulsos, voltametría cíclica y amperometría el número de medidas de corriente que se obtienen por cada muestra es en muchos casos superior a 100 [53][54][62][63][64][66]. También en espectroscopía de impedancias la cantidad de datos recogidos puede llegar al centenar [21]. Un número alto de valores recogidos por cada muestra ralentiza el posterior tratamiento de los datos mediante las herramientas de análisis multivariante. Además, por lo general, mucha de la información contenida en estos datos es redundante. Por ello, diversos autores se han planteado la implementación de

métodos que permitan comprimir la información de las medidas. El objetivo de estos algoritmos de compresión es reducir el tamaño de las matrices de datos de los ensayos manteniendo únicamente la información relevante. En ocasiones estas técnicas permiten además filtrar las señales eliminando el ruido contenido en ellas.

En [137] y [138] se propone un método basado en wavelets para comprimir los datos obtenidos de las medidas mediante voltametría de pulsos diferencial. Una vez aplicado el algoritmo wavelet, los autores proponen tomar únicamente los coeficientes correspondientes a las frecuencias bajas ya que dichas frecuencias son las que contienen la información relevante en este tipo de ensayos. De esta forma no solo se reduce el número de variables, sino que también se reduce el ruido de alta frecuencia. Un algoritmo similar se aplica en [64].

En [139] Holmin et al. comparan tres metodologías de compresión de datos para experiencias de voltametría de pulsos. En la primera de ellas aproximan la señal de corriente obtenida para cada pulso a una expresión compuesta por dos exponenciales que se derivan del estudio teórico de los procesos electroquímicos que ocurren durante la aplicación del pulso [140]. La segunda metodología consiste en aplicar un análisis de componentes principales jerárquico (HPCA) para reducir el número de variables. En este caso se dividen las medidas recogidas en 4 grupos (un grupo por cada electrodo) y se aplica un PCA a los datos de cada uno de los grupos. Las componentes principales obtenidas para cada grupo se utilizan como nuevas variables. El último método de compresión consiste en aplicar una transformada wavelet a los datos y quedarse con los coeficientes que mayor varianza expliquen [141]. Según los resultados obtenidos, aunque el HPCA permite una mayor reducción del número de variables, el método basado en el modelo teórico presenta mejores resultados.

En [55] las curvas I/V resultantes de las medidas de voltametría de onda cuadrada se procesan mediante 10 funciones de ventana con forma de campana (*bell-shaped-windowing*) llamadas *kernel* con el fin de convertir la información contenida en dichas curvas en 10 coeficientes. El mismo grupo de investigación utiliza una técnica análoga en [56][57][60][61] para comprimir los datos de los voltaogramas.

Preprocesado

En ocasiones antes de aplicar la herramienta de análisis multivariante es conveniente llevar a cabo un pequeño preprocesado de los datos. El tipo de preprocesado más adecuado depende de la naturaleza de los datos y de la técnica que se vaya a utilizar. El preprocesado debe aplicarse tanto a los datos de las variables independientes (D_{ij}) como a los de las variables dependientes (P_{ik}). Las técnicas de preprocesado más comunes son:

- Centrado con respecto a la media: esta técnica suele utilizarse cuando los datos presentan un desplazamiento con respecto al nivel cero que no aporta información relevante sobre las diferencias entre muestras. En este caso es conveniente eliminar dicho desplazamiento restando a cada medida el valor promedio de los datos de la variable independiente correspondiente, tal y como se indica en la Ecuación 8.

$$D_{CEN\ ij} = D_{ij} - D_{MEDj} \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo D_{MEDj} el valor medio de todas las muestras para la variable independiente X_j (ver Ecuación 9).

$$D_{MEDj} = \frac{\sum_{i=1}^M D_{ij}}{M} \quad \text{Ecuación 9}$$

- Estandarización: cuando los datos correspondientes a las variables independientes son de distinta naturaleza (sensores que miden distintos parámetros) puede resultar útil homogeneizar los datos dividiéndolos por la desviación estándar (ver Ecuación 10). De esta forma se le da la misma importancia a todos ellos independientemente de cuál sea su naturaleza.

$$D_{STD\ ij} = \frac{D_{ij}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (D_{ij} - D_{MEDj})^2}{M - 1}}} \quad \text{Ecuación 10}$$

- Autoescalado: consiste en combinar las transformaciones de centrado y estandarización. Es decir, consiste en llevar a cabo una estandarización sobre datos que previamente han sido centrados con respecto a la media, tal y como aparece en la Ecuación 11. Para entender esta ecuación hay que tener en cuenta que la desviación estándar (cociente de la expresión de la Ecuación 11) de los datos antes y después del centrado es la misma.

$$D_{AUTO\,ij} = \frac{D_{CEN\,ij}}{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^M (D_{ij} - D_{MEDj})^2}{M - 1}}} \quad \text{Ecuación 11}$$

- Normalización: se utiliza para conseguir que los datos tengan un valor entre -1 y +1. Consiste en dividir los datos cada variable independiente por el máximo (en valor absoluto) de cada una de ellas.

$$D_{NORM\,ij} = \frac{D_{ij}}{\max_j (|D_{ij}|)} \quad \text{Ecuación 12}$$

La Ecuación 8, Ecuación 9, Ecuación 10, Ecuación 11 y Ecuación 12 están referidas a los datos de las variables independientes (D_{ij}). Las mismas expresiones deberían ser aplicadas a las variables dependientes (P_{ik}).

6.2. Análisis de componente principales (PCA)

Cuando el número de variables independientes es mayor de 3 resulta imposible representar las muestras en función de las medidas. Para poder hacerlo deberíamos reducir el número de variables independientes intentando perder la menor cantidad de información. Es decir, deberíamos encontrar un nuevo sistema de referencia que permita reducir la dimensión de nuestro espacio de variables independientes y que cumpla las siguientes condiciones:

- Los ejes de este nuevo sistema de referencia deben ser ortogonales entre sí de forma que la información aportada por cada uno de ellos sea diferente y exclusiva.

- La proyección de los datos sobre el nuevo sistema de referencia debe contener la información completa del conjunto de los datos concentrando en los primeros ejes la información más relevante.

A los ejes de este nuevo sistema de referencia se les denomina componentes principales. En la Figura 28 se muestra un ejemplo en el que un objeto de tres dimensiones (un lápiz) debe representarse en dos dimensiones (un plano). En la figura se plantean dos alternativas para la proyección del objeto sobre un plano. La proyección del lápiz sobre el plano B daría lugar a una importante pérdida de información mientras que la proyección sobre el plano A permitiría mantener la mayor parte de la información relevante del objeto. Por otro lado, en la proyección sobre el plano A la mayor parte de la información corresponde al eje PC1 y el resto queda para el eje PC2. De igual forma, cuando se lleva a cabo un análisis de componentes principales (PCA – *Principal Components Analysis*) se asegura que la primera componente principal contenga el máximo de la varianza de los datos. A continuación se elige la segunda componente principal de forma que contenga el máximo de la varianza restante (es decir, la varianza que no haya sido explicada por la primera componente principal) y sea ortogonal a la primera componente. Y de igual modo se procede con el resto de componentes principales [132].

Una vez se ha construido el nuevo sistema de referencia, una representación de las muestras proyectadas sobre las dos primeras componentes principales nos daría, a priori, la máxima información que se puede obtener sobre las medidas trabajando en dos dimensiones.

Por lo general, el PCA se utiliza para poder visualizar matrices de datos que contienen un gran número de variables independientes en dos o tres dimensiones. A partir de estas representaciones se pueden agrupar y clasificar las muestras. En efecto, si al proyectar dos muestras sobre el plano formado por las dos primeras componentes principales éstas aparecen juntas, significará que tienen características similares (los valores de las variables independientes para estas dos muestras son semejantes). Por el contrario, si aparecen separadas, significará que las muestras pertenecen a grupos diferentes. Aunque el PCA puede emplearse como herramienta de clasificación no supervisada en ocasiones también se utiliza como paso previo a otros análisis ya que permite tener una visión general del conjunto de los datos recogidos. Por ejemplo, mediante una representación en dos dimensiones de las medidas correspondientes a un ensayo pueden detectarse muestras anómalas (outliers);

es decir, muestras cuyo comportamiento no se corresponde con el resto de las muestras.

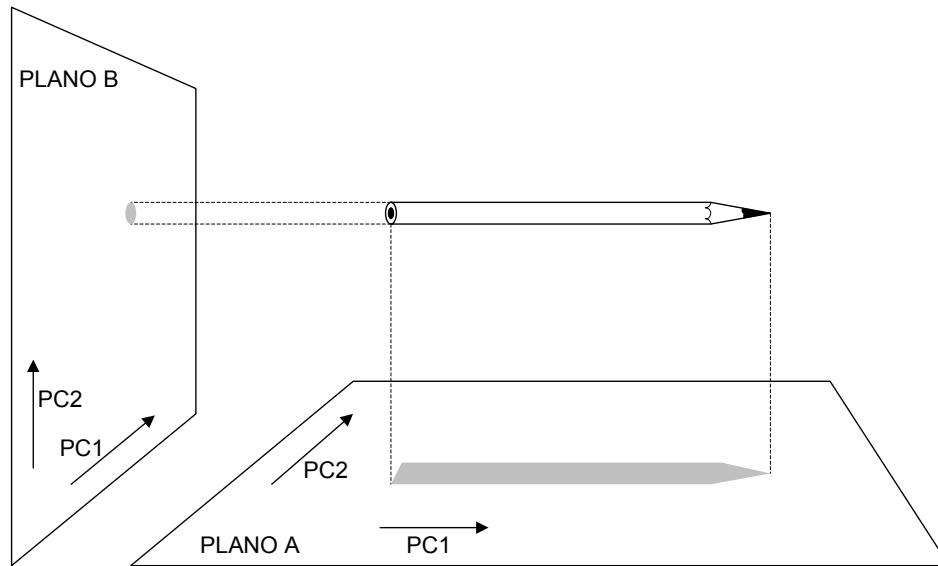


Figura 28. Proyección de un objeto de tres dimensiones sobre planos de dos dimensiones

6.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

Generación del modelo

La regresión por mínimos cuadrados parciales se aplica a experiencias en las que se dispone de información previa sobre las muestras, es decir, experiencias en las que hay tanto variables independientes como variables dependientes (ver Figura 27). Las variables dependientes corresponden a parámetros cuantificables de las muestras. El objetivo en estos casos es generar modelos de predicción que permitan cuantificar dichos parámetros en nuevas muestras a partir de los valores de las medidas. Si para generar el modelo utilizamos toda la información contenida en la matriz de experiencia, éste tendrá una capacidad predictiva excelente sobre las muestras utilizadas para construirlo. Pero probablemente las predicciones sobre nuevas muestras no serán correctas puesto que el modelo, además de la información relevante, contiene los “matices” correspondientes a cada una de las muestras con las que ha sido creado; es

decir, el modelo está “sobre-entrenado”. Por otro lado, en la mayoría de los casos el número de variables independientes es mayor que el número de muestras disponibles para construir el modelo; en estas condiciones no es viable llevar a cabo una regresión múltiple.

La solución a estos dos problemas pasa por realizar una reducción de la dimensión del espacio de las variables independientes. Es decir, debe establecerse un nuevo sistema de referencia en dicho espacio de forma que la información relevante de la experiencia quede contenida en los primeros ejes. El procedimiento a seguir es similar al utilizado para el análisis de componentes principales (PCA) pero con una diferencia importante. Así como en PCA la obtención de los ejes del nuevo sistema de referencia se hace intentando maximizar la varianza de los datos de las variables independientes, en la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS – *Partial Least Squares*) los nuevos ejes se generan intentando maximizar la correlación entre los datos de las variables independientes y de las variables dependientes. A los ejes del nuevo sistema de referencia se les denomina variables latentes. La primera variable latente contiene la mayor covarianza posible entre variables dependientes e independientes. El resto de variables latentes se construye siguiendo el mismo criterio aplicándolo a la covarianza residual que queda en cada fase del proceso. De esta forma las primeras variables latentes contienen la información relevante sobre la relación que existe entre los parámetros cuantificables de las muestras (variables dependientes) y las medidas realizadas (variables independientes). El siguiente paso consiste en construir el modelo mediante una regresión múltiple en la que se utilizan las variables latentes en lugar de las variables independientes originales.

Elección del número óptimo de variables latentes

Como acabamos de ver el modelo generado a partir de las primeras variables latentes contendrá la información relevante de la relación entre las medidas y los parámetros a predecir, lo que le permitirá cuantificar de forma correcta dichos parámetros para nuevas muestras. Sin embargo, para que el modelo sea realmente robusto, es necesario concretar cuál es el número de variables latentes que deben utilizarse para construirlo. Por un lado, si elegimos pocas variables latentes es posible que parte de la información relevante quede fuera del modelo. Por el contrario, si el número de variables latentes es demasiado alto, además de la información relevante, el modelo contendrá información

especifica de las muestras utilizadas para construirlo con lo que su capacidad de predicción de nuevas muestras se verá afectada (sobre-entrenamiento).

Existe una metodología que ayuda a identificar cuál es el número de variables latentes óptimo para cada modelo; se trata de la validación cruzada. En la Figura 29 se muestra un ejemplo de validación cruzada para una experiencia con 6 muestras. El objetivo de este método es establecer cuál es el número de variables latentes que permite obtener un modelo con menor error en la predicción. Para ello se construyen en primer lugar modelos con una sola variable latente. Estos modelos se establecen a partir de los datos de una serie de subconjuntos de muestras y se validan con los datos correspondientes a las muestras no incluidas en dichos subconjuntos. Con los valores de validación obtenidos para cada uno de estos modelos se construye una gráfica de observado frente a predicho. En esta gráfica el eje Y corresponde a los valores conocidos del parámetro que se quiere predecir, mientras que en el eje X se representan los valores predichos mediante el modelo (en ocasiones las predicciones se representan en el eje Y y los valores conocidos en el eje X). En el ejemplo de la figura el primer modelo se obtiene a partir de los datos de las últimas 4 muestras y los datos de las 2 primeras se aplican al modelo para obtener los dos primeros valores predichos. A continuación se construye otro modelo con los datos correspondientes a las dos primeras y a las dos últimas muestras que se valida mediante los datos de las dos muestras intermedias. Por último, se genera un modelo con los datos de las 4 últimas muestras cuya validación se lleva a cabo mediante las dos primeras. Los valores predichos por estos tres modelos se representan en la gráfica de observado frente a predicho y se calcula el error cuadrático medio de validación cruzada (RMSECV). Este parámetro indica cuál es el error promedio de nuestra predicción con respecto a los valores reales y su expresión es la que aparece en la Ecuación 13.

$$RMSECV = \frac{\sum_i^M (y_{OBSi} - y_{PREDCVi})^2}{M}$$

Ecuación 13

Siendo:

- y_{OBSi} : valor del parámetro y observado (conocido) para la muestra i .
- $y_{PREDCVi}$: valor del parámetro y predicho mediante el modelo de validación cruzada para la muestra i .
- M : número de muestras

Una vez calculado el RMSECV para los modelos construidos con una sola variable latente, se lleva a cabo el mismo proceso utilizando dos variables latentes y se calcula el RMSECV correspondiente. El mismo procedimiento se repite incrementando en cada iteración el número de variables latentes incorporadas a los modelos. Finalmente se obtiene una gráfica que relaciona el valor del RMSECV con el número de variables latentes incluidas en el modelo. El número óptimo de variables latentes se corresponderá con el primer mínimo que presente dicha gráfica. En caso de que la gráfica no presente ningún mínimo se deberá elegir el último valor que dé lugar a una disminución importante del RMSECV. Por ejemplo si los valores del RMSECV son: 35 para 1 LV, 27 para 2 LV's, 20 para 3 LV's, 13 para 4 LV's, 11 para 5 LV's, 10 para 6 LV's, etc., el valor óptimo de variables latentes sería 4.

Existen diversas modalidades de validación cruzada en función de cómo se lleve a cabo la elección de las muestras que se utilicen para generar los modelos y para validarlos:

- *Leave-one-out*: para generar los modelos se toman todas las muestras menos una que es la que se utiliza para validar. De esta forma el número de subconjuntos que se crean para la validación cruzada es igual al número de muestras.
- *Venetian Blinds*: los subconjuntos de muestras que se utilizan para construir los modelos se establecen recorriendo la matriz de experiencia y seleccionando 1 de cada s muestras. El valor s determina el número de subconjuntos que se forman para la validación cruzada.
- Aleatorio: se crean s subconjuntos de muestras de forma aleatoria de manera que ninguna muestra aparezca en dos o más subconjuntos. Con estos subconjuntos se realiza una validación cruzada. A continuación se realiza una nueva iteración del mismo proceso y los datos obtenidos se promedian con los del anterior. El procedimiento se repite r veces. En este caso el número de subvalidaciones que se llevan a cabo son $s \cdot r$.
- Bloques contiguos: se forman s bloques de muestras contiguas. Este método se corresponde con el ilustrado en la Figura 29.

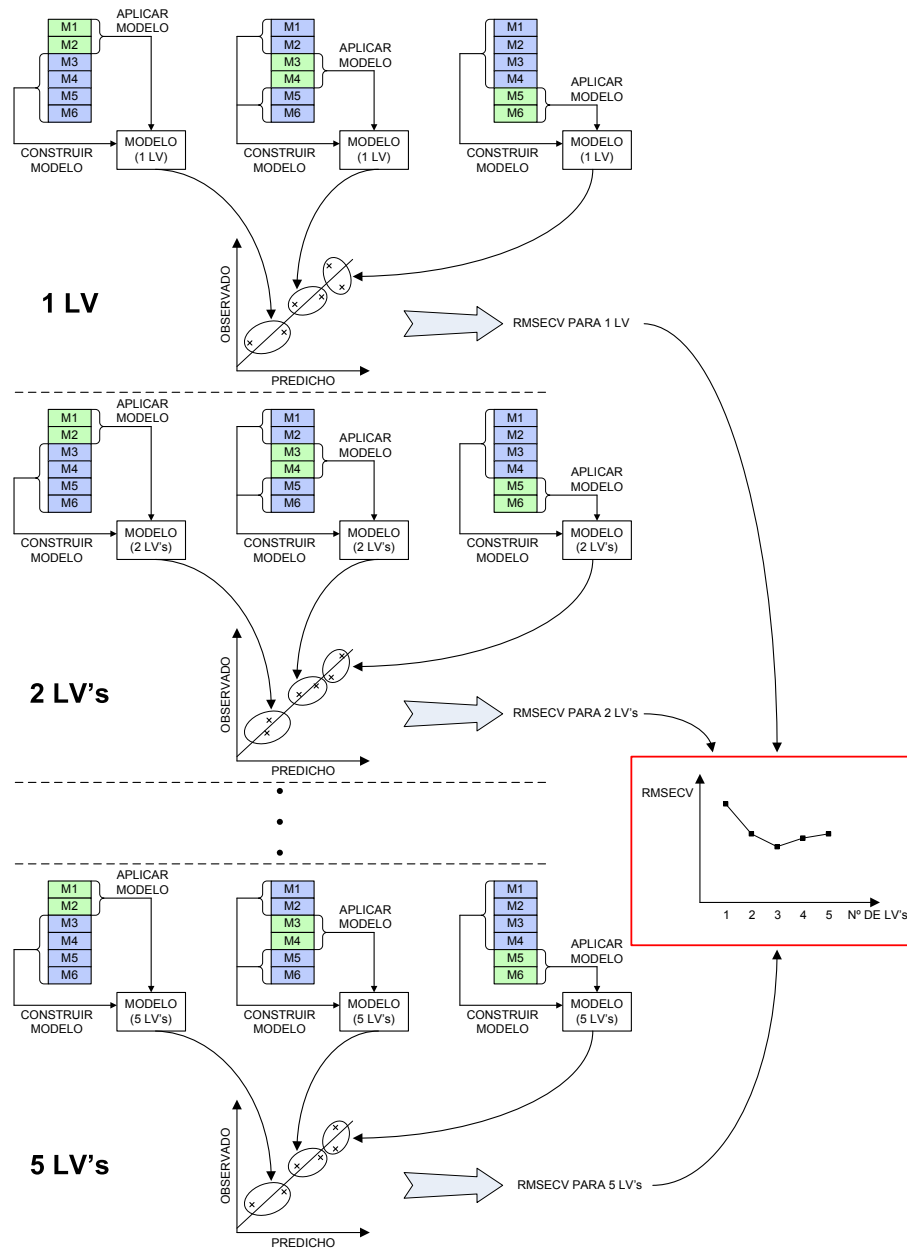


Figura 29. Método de validación cruzada para la elección del número óptimo variables latentes

Validación del modelo

Una vez elegido el número óptimo de variables ya se puede construir el modelo de predicción. El siguiente paso debe ser la evaluación de su robustez. En algunos trabajos dicha valoración se lleva a cabo utilizando los resultados de la validación cruzada. Sin embargo, en la validación cruzada se utilizan los mismos datos con los que luego se construye el modelo, y una validación rigurosa debería hacerse con datos totalmente ajenos al modelo. Por ello, normalmente la validación del modelo se realiza mediante un nuevo conjunto de muestras, denominado set de validación, cuyas características (parámetro que se desea predecir) son conocidas. El set de validación se aplica al modelo construido y con los valores resultantes se representa la gráfica de observado frente a predicho. Del análisis de esta gráfica pueden extraerse conclusiones importantes sobre la robustez del modelo (ver Figura 30).

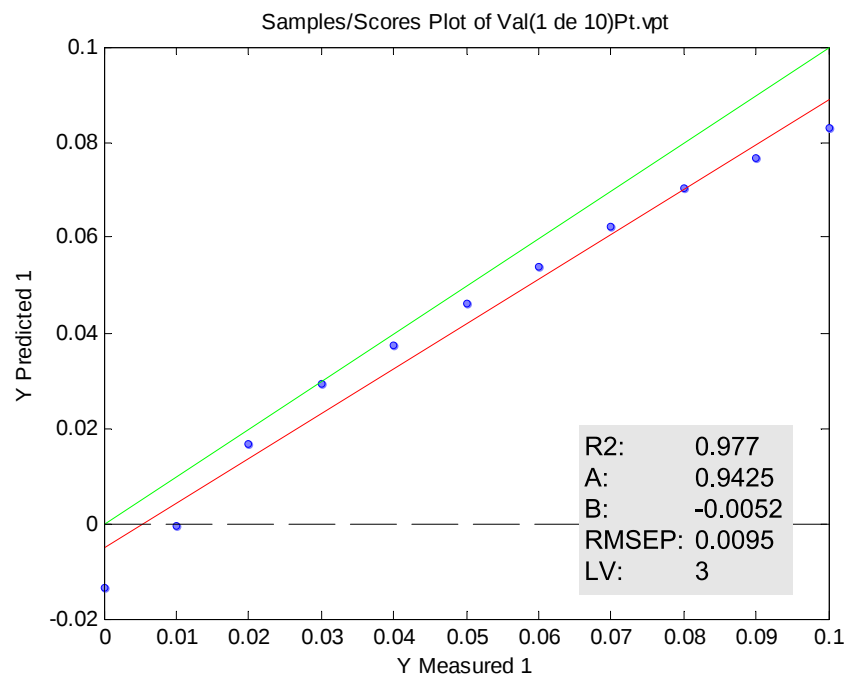


Figura 30. Gráfica de predicho frente a observado

Un modelo perfecto sería aquél en el que los puntos de la gráfica predicho frente observado apareciesen alineados sobre la recta de pendiente 1 y de ordenada en el origen 0 (línea verde); es decir, aquél para el que el valor predicho de cada muestra fuese igual a su valor medido u observado. Para modelos reales lo que se observa es una nube de puntos distribuidos a lo largo de la recta de tendencia o regresión (línea roja). La calidad del modelo puede evaluarse a nivel visual observando:

- El grado de proximidad de los puntos a la recta de tendencia. Si los puntos están muy separados de la recta de tendencia significa que la predicción es mala.
- El grado de similitud que exista entre la recta de tendencia y la recta 1:1. Si los datos están alineados con la recta de tendencia, pero dicha recta está muy separada de la línea 1:1 (ya sea por la pendiente o por la ordenada en el origen) la predicción también será mala.

Pero también puede hacerse una evaluación numérica del modelo atendiendo a los siguientes parámetros:

- R^2 o coeficiente de determinación: es el cuadrado del coeficiente de regresión de la recta de tendencia. Indica el grado de proximidad de los puntos de la gráfica a la recta de tendencia.
- La pendiente (A) y la ordenada en el origen (B) de la recta de tendencia: nos indican numéricamente el grado de similitud entre dicha recta de tendencia y la recta 1:1.
- Error cuadrático medio de predicción: nos indica cuál es en promedio la diferencia entre los valores predichos y los observados (ver Ecuación 14).

$$RMSEP = \frac{\sum_i^M (y_{OBSi} - y_{PREDi})^2}{M} \quad \text{Ecuación 14}$$

Siendo:

- y_{OBSi} : valor del parámetro y observado (conocido) para la muestra i .
- y_{PREDi} : valor del parámetro y predicho para la muestra i .
- M : número de muestras.

Objetivos de la tesis

El objetivo fundamental de esta tesis es el diseño de un sistema de lengua electrónica voltamétrica y el estudio de su aplicación en el ámbito agroalimentario. Las aplicaciones que se proponen son la determinación de la concentración de antioxidantes en disoluciones simples y binarias y la detección de glifosato en disoluciones simples.

A nivel más concreto se plantean los objetivos específicos que se enumeran a continuación:

- Diseño de un equipo electrónico capaz de llevar a cabo ensayos de voltametría cíclica y de pulsos en configuración de lengua electrónica. Además se desarrollará el software que permita su control mediante un ordenador personal (PC). Dicho software deberá incluir herramientas que faciliten el análisis, filtrado, compresión, selección y organización de los datos generados por el equipo electrónico para su posterior tratamiento con técnicas de análisis multivariante. El sistema diseñado deberá ser caracterizado a nivel de señales eléctricas y validado experimentalmente mediante ensayos de voltametría cíclica y de pulsos.
- Estudio de la capacidad del sistema de lengua electrónica diseñado de cuantificar mediante electrodos de metales de diversa naturaleza (nobles y no nobles) el contenido de antioxidantes en disoluciones simples. Se establecerán los metales más adecuados para la cuantificación de antioxidantes mediante la técnica de voltametría de pulsos. También se evaluarán distintas metodologías de compresión de los datos generados mediante dicha técnica. Así mismo, se estudiarán los efectos de interferencia de los antioxidantes en disoluciones binarias determinando la capacidad de discriminación del sistema diseñado.
- Evaluación de la capacidad de la técnica de voltametría de pulsos combinada con metales nobles y no nobles de cuantificar el contenido de glifosato en disoluciones simples. Se determinará cuáles de estos metales presentan mejor capacidad de detección del glifosato. Se utilizarán electrodos rotatorios (RDE) combinados con la voltametría de pulsos para intentar mejorar la resolución de la cuantificación del glifosato.

Capítulo 1. Desarrollo del sistema de medida

1. Antecedentes. Especificaciones del diseño

En 2008 el IDM diseñó un equipo para la implementación de la técnica de espectroscopía de impedancias. Dicho equipo permitía realizar ensayos de espectroscopía de impedancias en un rango de frecuencias de 1 Hz a 1 MHz, a 2 electrodos (no disponía de potenciostato) y con 4 escalas de corriente. Posteriormente, y ya en el marco de esta tesis, este equipo se modificó para permitir la implementación de voltametría de pulsos. Sin embargo, la aplicación del equipo a medidas de voltametría planteó una serie de problemas. En primer lugar, el equipo no disponía de potenciostato y, por tanto, las medidas debían hacerse a 2 electrodos, lo que implicaba que las medidas variaban mucho en función de las condiciones de ensayo puesto que no se disponía de un electrodo de referencia (ver apartado 4.2 de la Introducción). Por otro lado, el rango de tensión de salida para el que se había fabricado el equipo [-0,5 V; +0,5 V] era demasiado bajo para algunos ensayos de voltametría de pulsos.

Por todo ello, en 2009 se decidió iniciar el diseño de un nuevo equipo que permitiese la implementación de las técnicas de espectroscopía de impedancias, de voltametría cíclica y de voltametría de pulsos. Dicho equipo debía incorporar un potenciostato que permitiese realizar las medidas a 3 electrodos. En voltametría el equipo debía ser capaz de llevar a cabo ensayos sobre un máximo de 10 electrodos de trabajo multiplexados. Por último se incrementó el número de escalas de corriente hasta 32 y se estableció un rango de tensión de trabajo de [-0,5 V; +0,5 V] para espectroscopía de impedancias y de [-2 V; +2 V] para voltametría. Dado que se deseaban alcanzar frecuencias de hasta 10 MHz para espectroscopía de impedancias el diseño se basó en una tarjeta de procesamiento digital de señal de ALTERA (*Cyclone II DSP Development Board*) que incorporaba una FPGA de gama alta (EP2C70F672-C6) y convertidores D/A (DAC904E) y A/D (ADS5550) de alta velocidad. Además de esta tarjeta el equipo diseñado contenía una placa con las etapas de adaptación de señal y el potenciostato. Desgraciadamente, cuando el diseño del equipo concluyó y se construyó el primer prototipo, ALTERA dejó de fabricar la tarjeta de procesamiento digital de señal lo que imposibilitaba la construcción de nuevas unidades del equipo diseñado necesarias para el gran número de experiencias que debían ponerse en marcha.

Fue entonces cuando se decidió rediseñar el sistema de medida basándose en componentes estándar y evitando el uso de tarjetas de desarrollo. Por otro lado, se intentó reducir al máximo el coste del equipo manteniendo las prestaciones del anterior, reduciendo únicamente la frecuencia máxima de trabajo para espectroscopía de impedancias de 10 MHz a 200 kHz, lo que permitió sustituir la FPGA por un μ C.

Para este nuevo equipo se plantearon una serie de especificaciones basadas en la experiencia que el IDM había adquirido en el campo de las citadas técnicas electroquímicas de medida.

Especificaciones generales:

- Sistema flexible, que permita la implementación tanto de espectroscopía de impedancias como de voltametría cíclica y de pulsos.
- Sistema portátil, cuyas reducidas dimensiones permitan realizar medidas in situ.
- Sistema de fácil manejo para el usuario, que no requiera personal cualificado.
- Sistema dotado de aplicación software que almacene los datos recogidos y que proporcione herramientas que permitan un rápido y cómodo análisis de las medidas realizadas.
- Sistema fiable, que posea la precisión y exactitud necesarias para obtener una medida de calidad y confianza.
- Sistema económico, con un diseño adaptado para lograr operatividad con el menor coste posible.

Especificaciones técnicas:

- Voltametría cíclica:
 - Generación de señales triangulares configurables. Se podrán configurar los valores de la tensión inicial, la tensión de pico máxima y la tensión de pico mínima. Dichas tensiones podrán tomar valores entre -2 V y 2 V. Asimismo se podrá configurar la velocidad de barrido con valores comprendidos entre 2 mV/s y 10 V/s.
 - Muestreo de la señal de tensión aplicada al electrodo de trabajo y de la señal de corriente que circula por el mismo.
 - Representación de la curva I/V (voltaograma).
 - Almacenamiento de los datos de tensión y corriente.

- Voltimetría de pulsos:
 - Generación de un tren de hasta 50 pulsos cuya amplitud deberá ser configurable en el rango de -2 V hasta +2 V. La duración de los pulsos también deberá ser configurable con valores comprendidos entre 1 ms y 800 ms.
 - Muestreo de la señal de tensión aplicada al electrodo de trabajo y de la señal de corriente que circula por el mismo.
 - Representación gráfica de la evolución temporal de las señales de tensión y corriente muestreadas.
 - Almacenamiento de la evolución temporal de la señal de corriente muestreada.
- Espectroscopía de impedancias:
 - Generación de señales senoidales cuya amplitud deberá ser configurable en el rango de -0,5 V hasta +0,5 V. La frecuencia de la señal senoidal podrá variar entre 1 Hz y 200 kHz.
 - Muestreo de la señal de tensión aplicada al electrodo de trabajo y de la señal de corriente que circula por el mismo.
 - Representación gráfica de la evolución temporal de las señales de tensión y corriente muestreadas.
 - Posibilidad de realizar ensayos individuales para una frecuencia individual o barridos en frecuencia.
 - Cálculo del módulo y la fase de la impedancia medida para cada frecuencia.
 - Representación gráfica de los diagramas de Bode (módulo y fase de la impedancia en función de la frecuencia).
- Potenciostato de voltametría cíclica y de pulsos:
 - Posibilidad de trabajar a 2 electrodos (contraelectrodo y electrodo de trabajo) o a 3 electrodos (contraelectrodo, electrodo de referencia y electrodo de trabajo).
 - Posibilidad de realizar medidas en hasta 10 electrodos de trabajo multiplexados.
 - Hasta 32 escalas de corriente (desde 10 μ A hasta 20 mA).
 - Hasta 9 niveles de estabilización del potenciostato.
- Potenciostato de espectroscopia de impedancias:
 - Posibilidad de trabajar a 2 electrodos (contraelectrodo y electrodo de trabajo) o a 2 electrodos (contraelectrodo, electrodo de referencia y electrodo de trabajo).
 - Hasta 32 escalas de corriente (desde 3 μ A hasta 5 mA).
 - Hasta 9 niveles de estabilización del potenciostato.

- Aplicación software:
 - Configuración de los ensayos voltametría (selección del electrodo de trabajo, selección de la escala de corriente, selección del nivel de estabilización del potencióstato, secuenciación de los ensayos de voltametría de pulsos para los electrodos de trabajo configurados, generación de los patrones de pulsos).
 - Configuración de los ensayos de espectroscopía de impedancias (rango de frecuencias, amplitud de señal, escala de corriente, modo del potencióstato, nivel de estabilización del potencióstato).
 - Representación gráfica de los datos muestreados.
 - Almacenamiento de los datos muestreados.
 - Pre-procesado (eliminación, promediado y otros) de los datos recogidos y generación de los ficheros de datos para el posterior análisis estadístico.

1.1. Diagrama general del sistema de medida

El sistema de medida se compone de tres elementos:

- Aplicación software
- Equipo Electrónico de Medida
- Electrodos

El funcionamiento de la aplicación software depende de la técnica seleccionada. Para voltametría cíclica el usuario debe establecer en el formulario correspondiente de la aplicación de PC la velocidad de barrido y los valores inicial, máximo y mínimo de la señal triangular; además tiene que seleccionar el electrodo de trabajo sobre el que se va a hacer la medida, la escala de corriente y el modo (2 o 3 electrodos) y nivel de estabilización del potencióstato. Los valores digitales de la evolución temporal de la señal triangular junto con el resto de datos necesarios para configurar el ensayo son transmitidos a través del puerto USB al Equipo Electrónico de Medida, éste aplica la señal triangular al electrodo seleccionado y muestrea las señales de corriente y tensión. Dichas muestras son enviadas al PC donde son representadas gráficamente (gráfica I/V) y almacenadas.

En voltametría de pulsos se pueden secuenciar ensayos en varios electrodos de trabajo. El usuario debe diseñar previamente el patrón de pulsos que será

aplicado seleccionando el número de pulsos, la duración de los mismos y la amplitud de cada uno de ellos. A continuación debe establecer sobre qué electrodos de trabajo se va a llevar la secuencia de ensayos, la escala de corriente, así como el modo y el nivel de estabilización del potencióstato. Para cada uno de los electrodos, la información de ensayo (evolución temporal del tren de pulsos y datos de configuración del ensayo) es transmitida al Equipo Electrónico de Medida; el cual aplica el tren de pulsos al electrodo y muestrea las señales de tensión y corriente. Los datos de las muestras son enviados al PC donde son almacenados; a continuación la aplicación repite el mismo procedimiento para el resto de electrodos de trabajo de la secuencia configurada.

Finalmente para los ensayos de espectroscopía de impedancias se debe establecer el rango de frecuencias y la amplitud de las señales senoidales que se aplicarán al electrodo de trabajo. La aplicación software secuencia un ensayo por cada frecuencia del espectro. Los datos de la evolución temporal de la señal senoidal para la frecuencia correspondiente junto con el resto de información del ensayo (escala de corriente, modo y nivel de estabilización del potencióstato) son enviados al Equipo Electrónico de Medida para cada uno de los ensayos. La señal senoidal es aplicada al electrodo y las señales de tensión y corriente son muestreadas. Los datos de las muestras son enviados al PC donde mediante una Transformada Discreta de Fourier (DFT), se calcula el módulo y la fase de la impedancia de la muestra. Una vez completado este proceso para todas las frecuencias configuradas la aplicación almacena los datos en un fichero. Los resultados del ensayo pueden ser representados gráficamente en diagramas de Bode.

El Equipo Electrónico de Medida recibe la información enviada por el PC y la guarda en memoria. A continuación establece la configuración del potencióstato (electrodo de trabajo, escala de corriente, modo de trabajo y nivel de estabilización) y genera las señales correspondientes a la técnica seleccionada que serán aplicadas a la muestra a través del electrodo. Simultáneamente, muestrea la tensión en el electrodo de trabajo y la corriente que circula por el mismo, almacenando los datos para posteriormente enviarlos al PC.

Para simplificar el diseño de la etapa de procesamiento digital y abaratar el coste del equipo se decidió utilizar un microcontrolador de 16 bits como procesador del Equipo Electrónico de Medida. El uso de este tipo de dispositivos limita la frecuencia máxima de las señales que pueden ser generadas/muestreadas por el

equipo. Sin embargo, el microcontrolador elegido permite cumplir con las especificaciones funcionales establecidas. La técnica más exigente en cuanto a requerimientos de tiempos de respuesta es la espectroscopía de impedancias en la que se deben generar señales de senoidales de hasta 200 kHz. El microcontrolador elegido puede trabajar hasta una frecuencia de 16 MHz lo que, teniendo en cuenta las tareas que se deben llevar a cabo en el ciclo de muestreo, le permite muestrear señales de 200 kHz con 10 muestras/periodo.

Para convertir los valores digitales que maneja el microcontrolador a señales analógicas y viceversa se han utilizado un convertidor digital-analógico (DAC) de 12 bits y dos convertidores analógico-digital (ADC) de 12 bits. Dichos convertidores van acompañados de una serie de bloques de adaptación de señales diseñados con amplificadores operacionales para adecuar los niveles de tensión con los que trabaja el potencióstato a los niveles de tensión de los convertidores.

Una de las partes más complejas del desarrollo del Equipo Electrónico de Medida fue el diseño del potencióstato cuya misión es aplicar la tensión que corresponda a los electrodos. Como se vio en el apartado 4.2 de la Introducción para realizar medidas fiables, reproducibles y de precisión en una celda electroquímica es necesaria la utilización de 3 electrodos:

- El contraelectrodo encargado de suministrar la corriente a la celda.
- El electrodo de trabajo donde se producen los procesos electroquímicos que se desean caracterizar y donde se mide la señal de corriente.
- El electrodo de referencia con respecto al cual se aplica la tensión al electrodo de trabajo.

En algunas aplicaciones puede resultar inviable la utilización del electrodo de referencia, y en tal caso, la configuración debe reducirse a 2 electrodos (contraelectrodo y electrodo de trabajo). El potencióstato diseñado permite trabajar en las configuraciones de 2 ó 3 electrodos. Además los potencióstatos son circuitos intrínsecamente inestables que en determinadas condiciones de trabajo pueden producir oscilaciones en la señal que imposibilitan la medida. Es por tanto necesario habilitar mecanismos de estabilización que puedan activarse cuando las condiciones de funcionamiento del potencióstato así lo requieran.

En la Figura 31 se muestra el diagrama de bloques general del sistema de medida desarrollado.

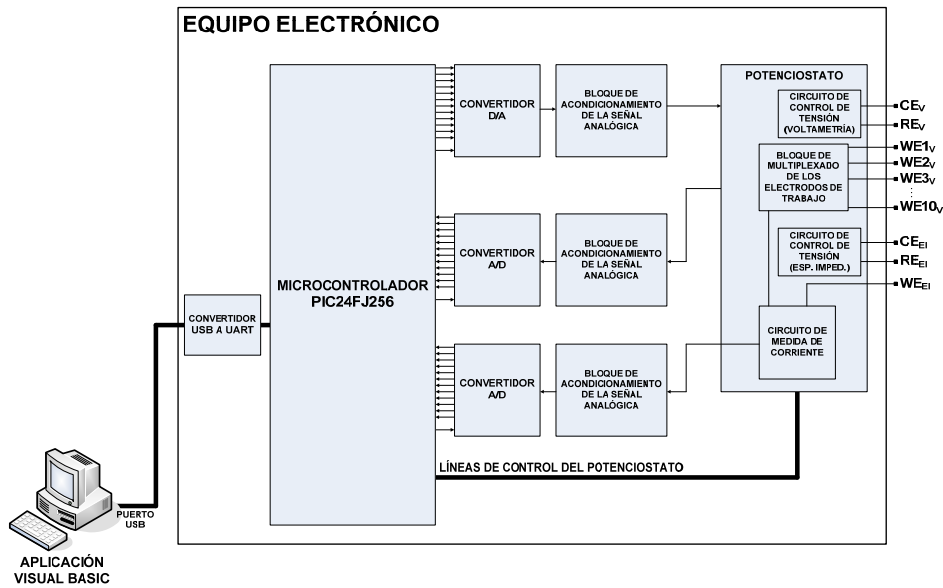


Figura 31. Diagrama de bloques del sistema de medida

En la Figura 32 se observa la placa electrónica del equipo.

Resumiendo, el Equipo Electrónico de Medida presenta los siguientes elementos:

- Un bloque de procesamiento digital compuesto por un convertidor USB-UART y el microcontrolador (μC) de 16 bits PIC24FJ256.
- Un bloque de interconexión entre el bloque de procesamiento digital y las etapas analógicas dotado de dos convertidores A/D y un convertidor D/A.
- Un bloque analógico integrado por amplificadores operacionales que llevan a cabo la adaptación de señales de los convertidores A/D y D/A.
- Un potencióstato formado por amplificadores operacionales, resistencias, condensadores y relés que permiten establecer las diferentes configuraciones de trabajo. El potencióstato contiene dos circuitos de control de tensión: uno para voltametría y otro para espectroscopía de impedancias; además incorpora un circuito de medida de corriente en configuración de puente autobalanceado con 32 escalas de corriente. Para la técnica de voltametría, el potencióstato incluye un circuito de multiplexación de los electrodos de trabajo (hasta 10 electrodos de

trabajo para las técnicas voltamétricas). Tanto los dos circuitos de control de tensión como el circuito de medida de corriente disponen de circuitos de estabilización compuestos por una serie de condensadores.

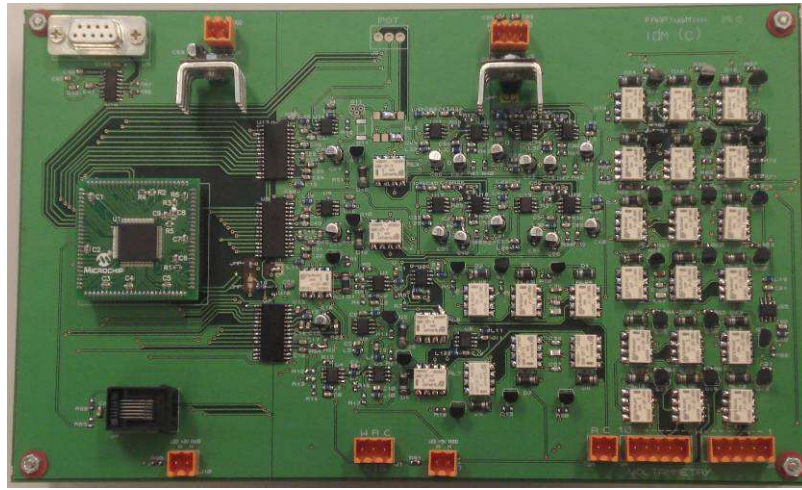


Figura 32. Detalle de la placa electrónica del equipo de medida

2. Descripción del hardware del Equipo Electrónico de Medida

2.1. *Bloque de procesamiento digital*

En las especificaciones del equipo se estableció que éste debía ser capaz de generar señales senoidales de hasta 200 kHz, trenes de pulsos con un ancho de pulso mínimo de 1 ms y señales triangulares con una pendiente máxima de 10 V/s. De todos estos requerimientos el más exigente desde el punto de vista de respuesta temporal es la generación de señales senoidales de 200 kHz. Si a dicha frecuencia la señal senoidal se representa mediante 10 puntos, el sistema debe ser capaz de generar una muestra cada 500 ns. Para implementar esta temporización caben varias opciones:

- Una FPGA con una memoria no volátil externa de configuración.
- Una CPLD con una memoria RAM externa.
- Un SoC (*System on Chip*) o PSoC (*Programmable System on Chip*).

- Un microcontrolador de 16 bits.

Por motivos de familiaridad con las herramientas de desarrollo de microcontroladores PIC y para simplificar el diseño del hardware del sistema se decidió utilizar un microcontrolador de Microchip de la familia PIC24.

En la Figura 33 se muestra la estructura del bloque de procesamiento digital. Se compone un μ C PIC24FJ256 y un convertidor de UART-USB.

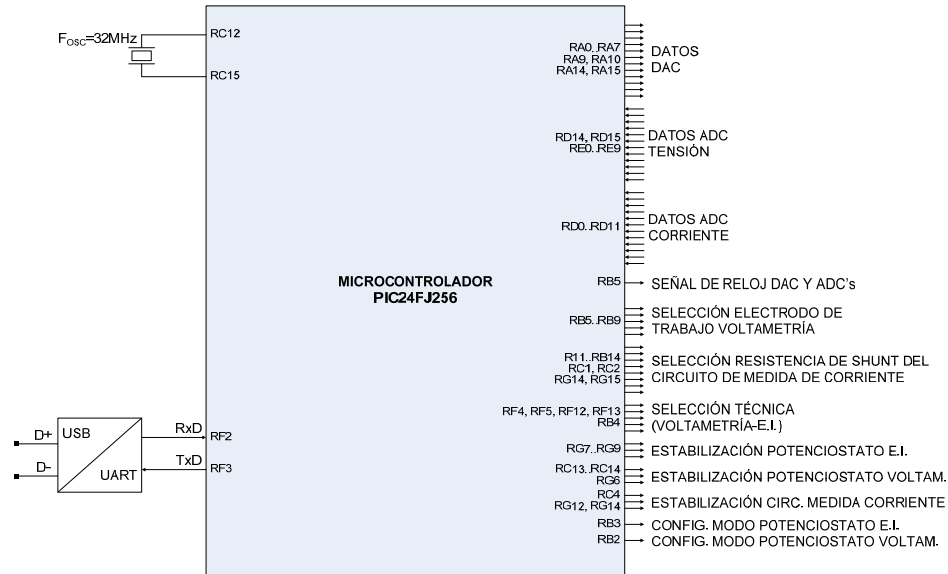


Figura 33. Diagrama del bloque de procesamiento digital

El convertidor de UART-USB convierte la interfaz de comunicación serie UART del microcontrolador en una interfaz USB. Además este convertidor permite que la aplicación del PC vea el puerto USB como un puerto COM; es decir, el uso del convertidor UART-USB permite que tanto la aplicación del PC como el código del μ C trabajen con una interfaz serie UART aunque físicamente las señales se transmitan a través de una interfaz USB. Esto simplifica los códigos del PC y del μ C evitando la necesidad de disponer de un puerto COM físico en el PC.

Las características principales del microcontrolador PIC24FJ256 son:

- 256 kBytes de memoria flash de programa.
- 16 kBytes de memoria RAM de datos.
- Arquitectura Harvard modificada.
- Frecuencia máxima de trabajo: 32 MHz (16 MIPS).
- Señal de reloj de la CPU configurable.
- Modos de bajo consumo (sleep, idle y doze).
- Multiplicador hardware 17-Bit por 17-Bit de un ciclo de instrucción.
- Divisor hardware de 32-Bit por 16-Bit.
- 16 registros de trabajo de 16-Bit.
- Set de instrucciones optimizado para compilador C con modos de direccionamiento flexibles.
- Hasta 83 líneas de E/S distribuidas en 7 puertos (A, B, C, D, E, F y G).
- 16 canales de conversión A/D multiplexados de 10 bits con una velocidad máxima de 500 ksps.
- 3 módulos SPI.
- 3 módulos I2C.
- 4 módulos UART.
- 1 módulo USB.
- 5 temporizadores de 16-Bit.
- 9 módulos de comparación/captura/PWM de 16-Bit.

Aunque la mayoría de las características mencionadas no son utilizadas en el diseño actual, la elección de este microcontrolador permitirá en el futuro la incorporación de nuevas funcionalidades al equipo sin necesidad de cambiar de procesador.

Para generar la señal de reloj del μC se utiliza un cristal oscilador de 32 MHz. A partir de dicho cristal el μC genera internamente la señal de reloj que marca el ritmo de trabajo tanto de los periféricos como de la CPU. Para algunos ensayos en los que se requieran tiempos de muestreo bajos la frecuencia de trabajo de la CPU se puede reducir mediante la configuración de un registro de función especial. Se necesitan 2 ciclos de la señal de reloj para la ejecución de una instrucción en este microcontrolador, por tanto, el tiempo mínimo de ejecución de una instrucción será: $T_{CY} = 62,5 \text{ ns}$.

De las 83 líneas de E/S del microcontrolador se utilizan 68 líneas para realizar las siguientes funciones:

- Líneas de salida de datos al DAC: se trata de las líneas mediante las cuales el μC transmite al convertidor D/A el valor digital correspondiente a la tensión que se desea aplicar al electrodo de trabajo. Las líneas utilizadas son RA0...RA7, RA9, RA10, RA14 y RA15.
- Líneas de entrada de datos del ADC de tensión: se trata de las líneas a través de las cuales el μC recibe el valor digital generado por el convertidor A/D que mide la tensión en el electrodo de trabajo. Las líneas utilizadas son RD0...RD11.
- Líneas de entrada de datos del ADC de corriente: se trata de las líneas a través de las cuales el μC recibe el valor digital generado por el convertidor A/D que mide la tensión correspondiente a la corriente que circula por el electrodo de trabajo. Las líneas utilizadas son RD14, RD15, RE0...RE9.
- Línea de la señal de reloj: tanto el DAC como los dos ADC's necesitan una señal de reloj para funcionar. Dicha señal es generada por el μC a través de la línea RB5 que incorpora como función secundaria REFO (Reference Clock Output) que permite la generación de una señal derivada del oscilador principal y cuya frecuencia puede establecerse mediante los bits RODIV del registro REFOCON. Existen 16 posibles configuraciones de la frecuencia a partir del oscilador principal.
- Líneas de selección del electrodo de trabajo para la técnica de voltimetría: el equipo puede llevar a cabo medidas de voltimetría sobre hasta 10 electrodos de trabajo. Sin embargo, solo se dispone de un potencióstato y de un circuito de medida de corriente. Los 10 electrodos de trabajo están, por tanto, multiplexados mediante un circuito constituido por una serie de relés que se controla mediante 5 líneas de salida del μC (RB5...RB9).
- Líneas de selección de las resistencias de shunt del circuito de medida de corriente: debido a la variabilidad de las muestras que pueden ser medidas con el equipo, es necesario que éste esté preparado para poder trabajar con un amplio rango de corrientes. El circuito de medida de corriente dispone de 32 escalas de corriente que corresponden a 32 combinaciones de 16 resistencias de shunt. La selección de la combinación de resistencias de shunt para cada escala de corriente se lleva a cabo mediante 8 líneas de salida del μC (RB11...RB14, RC1, RC2, RG14 y RG15).
- Líneas de selección de la técnica de medida (espectroscopía de impedancias y voltimetría): aunque el diseño incorpora circuitería específica para cada una de las técnicas, existen subcircuitos en la placa

que son comunes a ambas técnicas (convertidor D/A, convertidores A/D, circuito de medida de corriente). Es por tanto necesario realizar en algunos puntos del sistema una multiplexación para establecer las conexiones oportunas en función de la técnica que se desea implementar. Dicha multiplexación es llevada a cabo por el μ C mediante 5 líneas de salida: RF4 (selecciona si la señal de salida del DAC se direcciona al potencióstato de espectroscopía de impedancias o al de voltametría), RF5 (selecciona si la señal de entrada del ADC que mide la tensión en el electrodo de trabajo proviene del potencióstato de espectroscopía de impedancias o del de voltametría), RF12 (selecciona si la señal de entrada del ADC que mide la corriente por el electrodo de trabajo proviene del potencióstato de espectroscopía de impedancias o del de voltametría), RF13 (selecciona si la salida del circuito de medida de corriente va al circuito de adaptación de señal de espectroscopía de impedancias o al de voltametría) y RB4 (selecciona si la entrada al circuito de medida de corriente proviene del electrodo de trabajo de espectroscopía de impedancias o de voltametría de pulsos).

- Líneas de configuración de la estabilización del potencióstato de espectroscopía de impedancias: un potencióstato es un circuito electrónico inestable que en determinadas condiciones puede entrar en oscilación. Uno de los métodos de estabilización es colocar en paralelo al bucle de realimentación un condensador. Con el fin de disponer de diferentes niveles de estabilización se ha implementado un circuito compuesto por 3 condensadores y una serie de relés que permite establecer 4 niveles de estabilización: sin estabilización (condensadores de estabilización desconectados), estabilización débil (conexión del condensador de valor bajo), estabilización media (conexión del condensador de valor medio) y estabilización fuerte (conexión del condensador de valor alto). La selección del nivel de estabilización del potencióstato de espectroscopía de impedancias se lleva a cabo mediante 3 líneas de salida del μ C: RG7...RG9.
- Líneas de configuración de la estabilización del potencióstato de voltametría: el potencióstato de voltametría también incorpora un circuito de estabilización que se controla mediante 3 líneas de salida del μ C: RC13, RC14 y RG6.
- Líneas de configuración de la estabilización del circuito de medida de corriente: en ocasiones las oscilaciones en las medidas provienen del circuito de medida de corriente. En este caso, la estabilización se consigue colocando un condensador en paralelo con las resistencias de

shunt. El nivel de estabilización del circuito de medida de corriente se controla mediante 3 líneas de salida del μ C: RC4, RG12 y RG14.

- Línea de configuración del modo de trabajo de los potenciostatos: aunque el potenciostato es un circuito diseñado para realizar medidas a 3 electrodos, en algunas aplicaciones puede resultar interesante medir en configuración de 2 electrodos. Ambos potenciostatos han sido diseñados para poder trabajar a 2 o 3 electrodos. La configuración del modo de trabajo del potenciostato de espectroscopía de impedancias se lleva a cabo mediante la línea de salida del μ C RB3, mientras que para el potenciostato de voltimetría el modo se establece mediante la línea RB2.
- Líneas de transmisión y recepción del canal de comunicación serie UART: el μ C se comunica con el PC a través de un canal UART que incorpora una línea de transmisión (TxD/RF3) y una línea de recepción (RxD/RF2).

Dado que el microcontrolador se alimenta con una tensión de +3,3 V todas las líneas de E/S trabajan con niveles lógicos referidos a dicha tensión.

El μ C dispone de una memoria RAM de datos de 16 kBytes. La aplicación requiere un total de 6043 bytes distribuidos de la siguiente forma:

- 33 bytes para variables.
- 10 bytes para datos de configuración del ensayo.
- 2000 bytes para el búfer de recepción de los datos enviados por el PC correspondientes a los valores digitales que describen la evolución temporal de la señal que se quiere generar. Para representar las señales se utilizan como máximo 1000 valores de 12 bits, lo que obliga a disponer de 2000 bytes para su almacenamiento.
- 2000 bytes para el búfer de transmisión de los datos correspondientes al muestreo de la señal de tensión en el electrodo de trabajo (máximo 1000 valores de 12 bits).
- 2000 bytes para el búfer de transmisión de los datos correspondientes al muestreo de la señal de corriente en el electrodo de trabajo (máximo 1000 valores de 12 bits).

El trabajo que desarrolla el bloque de procesado digital es:

- Recepción y almacenamiento en memoria RAM de los datos enviados por el PC para la generación de la señal.

- Configuración del ensayo a partir de la información recibida del PC: selección de la técnica de medida (espectroscopía de impedancias o voltametría), selección del modo de trabajo (2 o 3 electrodos) y configuración del nivel de estabilización del potencióstato, selección del electrodo de trabajo para las técnicas voltamétricas y configuración de la resistencia de shunt del circuito de medida de corriente.
- Envío en paralelo al DAC de la secuencia de valores digitales almacenados en la RAM con la cadencia correspondiente al tipo de señal que se desea generar.
- Lectura en paralelo y almacenamiento en RAM de los datos digitales provenientes de los ADC's que muestrean las señales de tensión y corriente.
- Envío al PC de los datos almacenados.

2.2. Módulo del convertidor digital-analógico (DAC)

La generación de las señales analógicas que se aplican a la celda electroquímica se lleva a cabo mediante el convertidor digital-analógico (DAC) THS5661 de Texas Instruments. Las características fundamentales de este convertidor son:

- Resolución: 12 bits.
- Frecuencia máxima de trabajo: 125 Msps.
- Salida en corriente diferencial escalable entre 2 mA y 20 mA.
- Tensión de referencia interna de 1,20 V compensada térmicamente.
- Interfaz digital compatible CMOS +3 V y +5 V.

El módulo del convertidor D/A se muestra en la Figura 34. El convertidor D/A dispone de un regulador de tensión de referencia interno que se activa conectando el pin EXTLO a AGND (deshabilitando la referencia externa) y conectando un condensador de desacoplo de 100 nF al pin EXTIO. Para cumplir con los requerimientos de estabilidad del convertidor es necesario compensar el amplificador de control interno conectando un condensador de 100 nF entre el pin COMP1 y +5V AVDD, así como desacoplar los conmutadores de corriente de salida mediante un condensador de 100 nF entre el pin COMP2 y AGND.

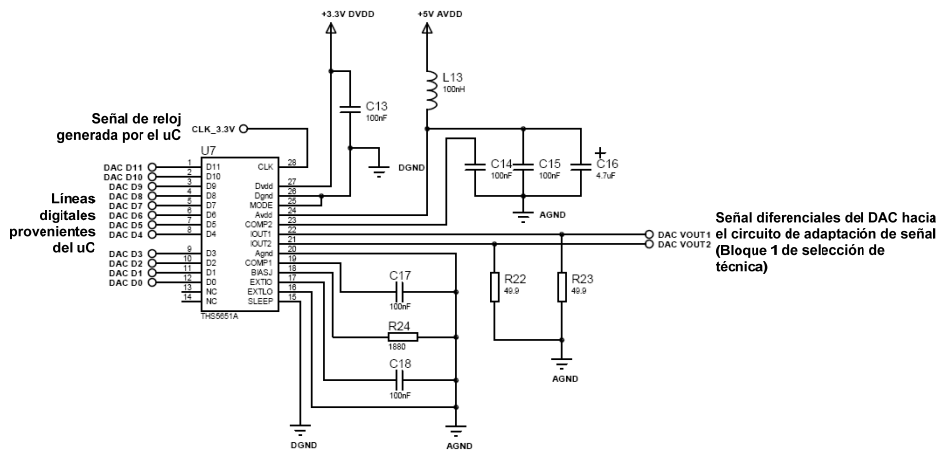


Figura 34. Módulo del convertidor D/A

A partir de la tensión de referencia interna de 1,2 V es posible establecer el fondo de escala de la corriente de salida mediante una resistencia (R24) que se conecta entre el pin BIASJ y AGND. El valor del fondo de escala será 32 veces el valor de la corriente que circule por dicha resistencia. Teniendo que la tensión en el pin BIASJ es la tensión de referencia interna, el fondo de escala de la corriente de salida vendrá dado por la Ecuación 15.

$$I_{OUTFS} = 32 \cdot \frac{1,2}{R_{24}} \quad \text{Ecuación 15}$$

Si elegimos una resistencia R24 de 1880 Ω el fondo de escala será de 20,42 mA. Por otro lado, se han colocado unas resistencias (R22 y R23) conectadas entre AGND y las salidas en corriente IOUT1 e IOUT2 que convertirán las corrientes de salida en tensiones (VOUT1 y VOUT2) cuyo rango de variación será [0 V; IOUTFS/R22 V] y [0 V; IOUTFS/R23 V] respectivamente. Si elegimos R22=R23=49,9 Ω el rango de variación de ambas tensiones de salida será [0 V; 1,02 V].

La relación entre el valor digital de entrada VALDIG y las corrientes de salida es la que aparece en la Ecuación 16 y en la Ecuación 17:

$$IOUT1 = IOUTFS \cdot \frac{VALDIG}{4096} \quad \text{Ecuación 16}$$

$$IOUT2 = IOUTFS \cdot \frac{(4095 - VALDIG)}{4096} \quad \text{Ecuación 17}$$

Por tanto, las tensiones de salida tendrán las expresiones que se reflejan en la Ecuación 18 y en la Ecuación 19.

$$VOUT1 = IOUTFS \cdot \frac{VALDIG}{4096} \cdot R22 \quad \text{Ecuación 18}$$

$$VOUT2 = IOUTFS \cdot \frac{(4095 - VALDIG)}{4096} \cdot R23 \quad \text{Ecuación 19}$$

Considerando todo ello, la relación entre el valor digital de entrada del DAC y su salida diferencial en tensión VOUT1-VOUT2 sería la que se muestra en la Tabla 1:

Valor digital a la entrada del DAC (DAC D11..DAC D0)	Tensión diferencial de salida del DAC (DAC VOUT1-DAC VOUT2)
4095	+1,01899 V
2048	0,00025 V
0	-1,01899 V

Tabla 1. Tensión diferencial de salida del DAC en función de los valores digitales de entrada

Es decir, el convertidor D/A es capaz de generar una señal de tensión diferencial entre -1 V y +1 V aproximadamente. Dicha señal se transmite a los circuitos de adaptación de señal que se encargan de adecuar este rango a los requerimientos de cada técnica (rango [-0,5 V; +0,5 V] para espectroscopía de impedancias y [-2 V; +2 V] para voltametría).

El conversor dispone de dos alimentaciones: una analógica *AVDD*, conectada a la alimentación analógica de +5 V (+5V *AVDD*) y otra digital *DVDD*, conectada a la alimentación digital de +3 V (+3V *DVDD*). La alimentación

digital se desacopla mediante un condensador de 100 nF (C13) mientras que la alimentación analógica se filtra mediante una ferrita (L13) y dos condensadores (C15 de 100 nF y C16 de 4,7 μ F).

2.3. Módulo del convertidor analógico-digital (ADC)

Las señales de la tensión y la corriente en el electrodo de trabajo son muestreadas por sendos convertidores A/D (ADC) AD9220 de Analog Devices. Las características más relevantes de este convertidor son:

- Resolución: 12 bits.
- Frecuencia máxima de trabajo: 10 Msps.
- Alimentación analógica única de +5 V.
- Circuito de muestreo y retención y tensión de referencia internos.
- Interfaz digital compatible CMOS +3 V y +5 V.

Dado que la frecuencia máxima de muestreo requerida es 2 MHz (correspondiente al muestreo de 10 puntos en un periodo de una señal senoidal de 200 kHz) este convertidor cumple con los requerimientos del diseño.

El circuito correspondiente al convertidor A/D que muestrea la señal de corriente en el electrodo de trabajo se muestra en la Figura 35. El muestreo de la señal de tensión se lleva a cabo con un circuito análogo.

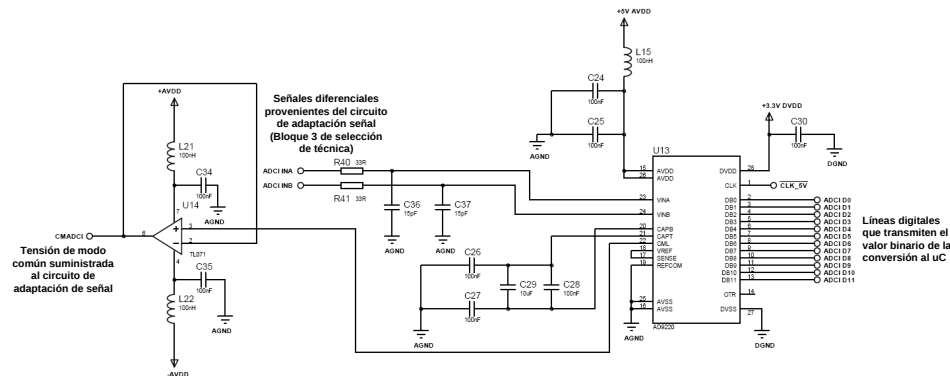


Figura 35. Módulo del convertidor A/D

El AD9220 dispone de una tensión de referencia interna V_{REF} mediante la cual se establece el rango de variación de la señal de entrada diferencial V_{INA} - V_{INB} . Dicha tensión de referencia puede ser configurada con diversos valores entre 1 y 2,5. Para mejorar las prestaciones a nivel de ruido y de linealidad de DC el fabricante aconseja trabajar con el rango máximo de variación de la señal de entrada diferencial, razón por la cual se ha elegido trabajar con una tensión de referencia de 2,5 V. Por otro lado, el fabricante también aconseja desacoplar la tensión de referencia mediante la conexión de una red de condensadores ($C26$, $C27$, $C28$ y $C29$) conectada a los pines $CAPT$ y $CAPB$.

Las redes RC conectadas a las entradas V_{INA} ($R40$ y $C36$) y V_{INB} ($R41$ y $C37$) permiten filtrar el ruido de alta frecuencia a la entrada del convertidor. Los valores elegidos son los recomendados por el fabricante para disminuir la distorsión armónica y mejorar la relación señal-ruido (SNR).

El ADC genera una tensión en modo común (pin CML) cuyo valor es igual a la mitad de la tensión de alimentación analógica ($AVDD/2$), es decir, 2,5 V. Esta tensión es utilizada por los circuitos de adaptación de señal para elevar la tensión que se quiere muestrear a los niveles de entrada del convertidor A/D (ver apartado 2.5 de este capítulo). Con objeto de evitar que la conexión a los circuitos de adaptación de señal pueda cargar la tensión en modo común se ha conectado un amplificador en modo seguidor ($U14$) al pin CML .

Como se ha comentado anteriormente, la tensión de referencia establece el rango de variación de la señal diferencial de entrada de forma que siempre se debe cumplir la condición de la Ecuación 20.

$$-V_{REF} \leq (V_{INA} - V_{INB}) \leq +V_{REF} \quad \text{Ecuación 20}$$

Por otra parte, la relación entre el valor digital de salida del ADC y la tensión diferencial de entrada es la que aparece en la Ecuación 21:

$$VALDIG = \frac{(V_{INA} - V_{INB}) + V_{REF}}{V_{REF}} \cdot 2048 \quad \text{Ecuación 21}$$

Teniendo en cuenta que la tensión de referencia configurada V_{REF} es de 2,5 V, se puede construir la Tabla 2 que muestra el valor digital generado por el convertidor A/D para distintas tensiones diferenciales de entrada.

Tensión diferencial de entrada del ADC (VINA-VINB)	Valor digital de salida del ADC (DB11..DB0)
<-2,5 V	0000 0000 0000
-2,5 V	0000 0000 0000
0 V	1000 0000 0000
+2,5 V	1111 1111 1111
>+2,5 V	1111 1111 1111

Tabla 2. Valor digital del ADC en función de la tensión diferencial de entrada

Los pines de alimentación analógica del conversor A/D (AVDD) se conectan a la alimentación analógica de +5 V de la placa (+5V AVDD) mientras que la alimentación digital (DVDD) se conecta a la alimentación digital de +3,3 V de la placa (+3V DVDD). Para el filtrado de la alimentación analógica se utiliza un filtro compuesto por una ferrita (L15) y dos condensadores (C24 de 100 nF y C25 de 100 nF) uno para cada pin de alimentación. La alimentación digital se desacopla mediante un condensador (C30 de 100 nF) entre DVDD y DVSS.

2.4. Circuitos de selección de técnica

El equipo diseñado permite la implementación de dos técnicas electroquímicas con requerimientos eléctricos muy distintos. El rango de tensión de trabajo para espectroscopia de impedancias es [-0,5 V; +0,5 V] mientras que para voltametría es [-2 V; +2 V]. Por otro lado, cada una de las técnicas dispone de sus propios electrodos. Y, si bien parte del hardware se ha duplicado para adaptarlo a las necesidades de cada técnica (circuitos de adaptación de señal y circuitos de control de tensión del potencióstato), algunos subsistemas deben ser compartidos por las dos técnicas (convertidor D/A, convertidores A/D y circuito de medida de corriente). Esto hace que se hayan tenido que incorporar una serie de circuitos que permitan direccionar las señales por el hardware correspondiente a la técnica seleccionada.

En la Figura 36 se muestra la conexión entre los convertidores D/A y A/D y el resto de la circuitería analógica (circuitos de adaptación de señal y potencióstato). En dicha figura se pueden apreciar los 5 bloques de selección

que permite establecer la configuración del sistema para cada una de las dos técnicas.

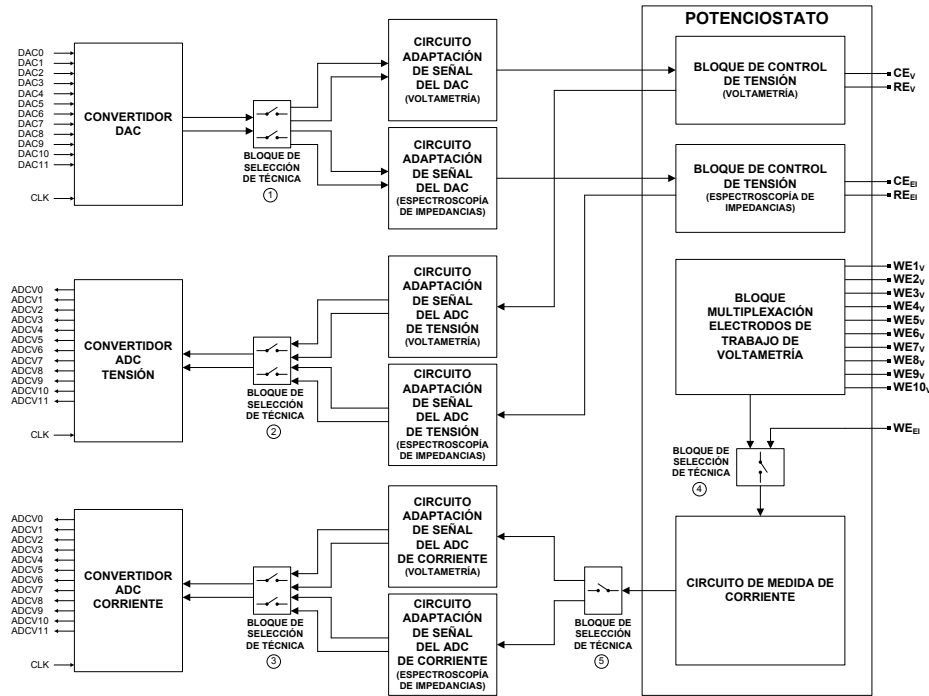


Figura 36. Esquema de conexión de los convertidores D/A y A/D, los circuitos de adaptación de señal y el potencióstato

El μC transmite en paralelo al convertidor D/A el valor digital correspondiente a la tensión que se desea generar. El bloque 1 de selección de técnica (ver Figura 37) se encarga de direccionar la señal analógica diferencial generada por el convertidor D/A al bloque de adaptación de señal que corresponda.

La salida de cada uno de estos circuitos de adaptación de señal está conectada a la entrada del bloque de control de tensión correspondiente, donde dicha tensión es aplicada a la celda electroquímica. Los bloques de control de tensión de cada una de las técnicas miden la tensión aplicada y la transmiten al correspondiente circuito de adaptación de señal. Estos circuitos adaptan dicha tensión a los requerimientos de entrada del convertidor A/D (tensiones diferenciales positivas). El bloque 2 de selección de técnica (Figura 38) establece cuál de las

salidas diferenciales de los dos circuitos de adaptación se conecta a la entrada del ADC de tensión.

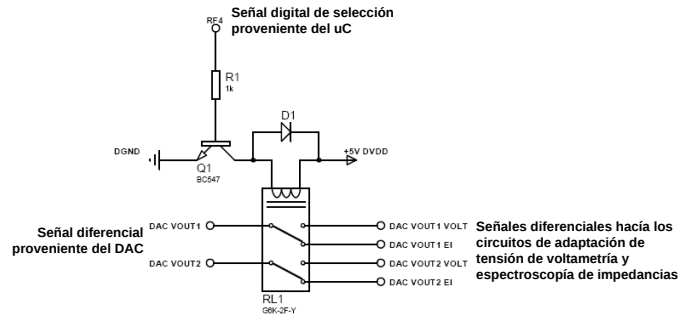


Figura 37. Bloque 1 de selección de técnica

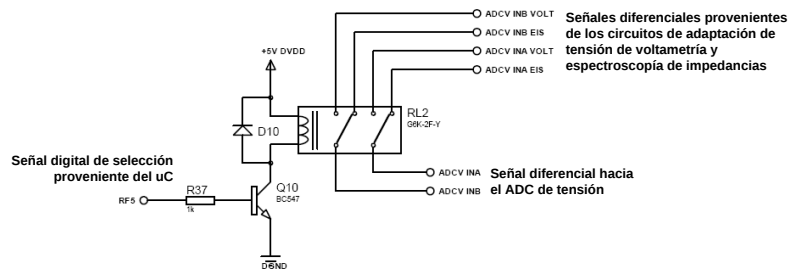


Figura 38. Bloque 2 de selección de técnica

Por otra parte, dentro del potencióstato se dispone de un solo circuito de medida de corriente. El bloque 4 de selección de técnica (Figura 39) determina si la corriente medida proviene del electrodo de trabajo de espectroscopia de impedancias o del bloque de multiplexación de los electrodos de trabajo de voltametría. Dado que cada una de las técnicas trabaja con rangos de tensión diferentes y que el circuito de medida de corriente está configurado en modo de puente autobalanceado, la tensión de salida del circuito de medida de corriente tendrá rangos de variación diferentes en función de la técnica. Por ello, son necesarios sendos circuitos de adaptación de señal que acondicionen dicha señal a los requerimientos del convertidor A/D de corriente. El bloque 5 de selección de técnica (Figura 40) enruta la señal de salida del circuito de medida de corriente al circuito de adaptación de señal que corresponda.

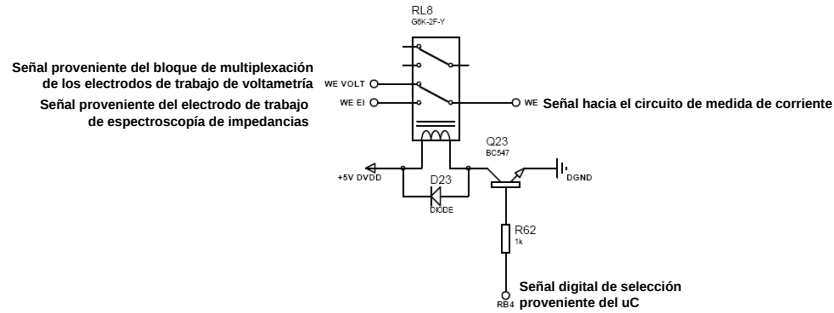


Figura 39. Bloque 4 de selección de técnica

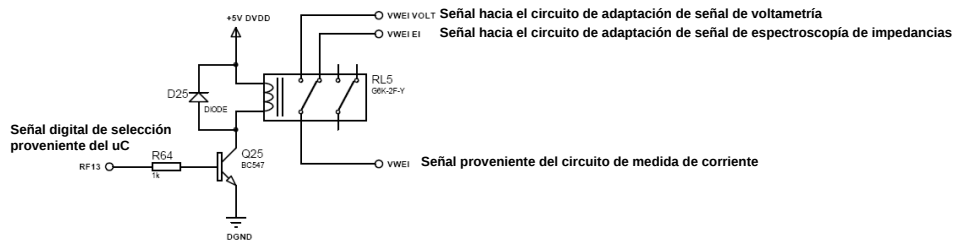


Figura 40. Bloque 5 de selección de técnica

Por último, el bloque 3 de selección de técnica (Figura 41) establece cuál de los circuitos de adaptación de la señal de corriente se conecta al ADC de corriente.

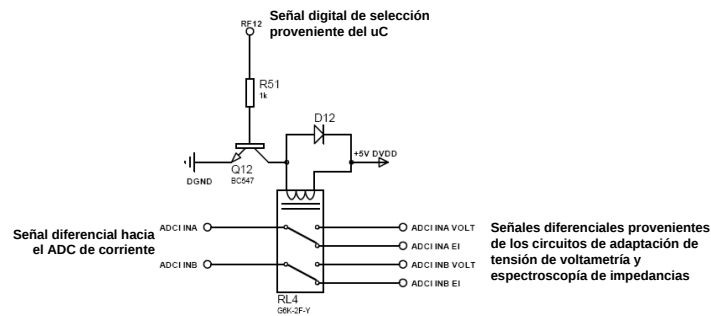


Figura 41. Bloque 3 de selección de técnica

Todos los bloques de selección de técnica tienen una estructura análoga. Se trata de un relé conmutador de dos contactos G6K-2F-Y5DC de OMRON disparado mediante un transistor BJT BC547. Se ha elegido un relé en lugar de un

conmutador analógico electrónico ya que estos últimos presentan siempre una pequeña resistencia en conducción que afectaría a la señal analógica que se desea enrutar. Los bloques 1, 2 y 3 utilizan los dos contactos del relé mientras que los bloques 4 y 5 solo utilizan uno. El circuito incorpora además una resistencia que limita la corriente de entrada a la base y un diodo en antiparalelo a la bobina del relé que evita picos de tensión en el colector del transistor cuando éste se conmuta a OFF, permitiendo la circulación de la corriente almacenada en la bobina del relé. La resistencia de base del transistor se ha diseñado de forma que garantice la saturación del transistor cuando la línea digital proveniente del μC se pone a nivel alto.

2.5. Circuitos de adaptación de señal

Tal y como se aprecia en la Figura 36 en la placa hay un total de 6 circuitos de adaptación de señal:

- Circuito de adaptación de la señal proveniente del DAC para la técnica de voltametría.
- Circuito de adaptación de la señal proveniente del DAC para la técnica de espectroscopía de impedancias.
- Circuito de adaptación de la señal que va al ADC que mide la señal de tensión proveniente del circuito de control de tensión de voltametría.
- Circuito de adaptación de la señal que va al ADC que mide la señal de tensión proveniente del circuito de control de tensión de espectroscopía de impedancias.
- Circuito de adaptación de la señal del ADC que mide la señal de la corriente que circula por el electrodo de trabajo de voltametría.
- Circuito de adaptación de la señal del ADC que mide la señal de la corriente que circula por el electrodo de trabajo de espectroscopía de impedancias.

Los dos circuitos de adaptación de señal del DAC son idénticos con excepción de las resistencias que establecen las ganancias de los mismos.

Los 4 circuitos de adaptación de señal de los ADC's son también equivalentes entre si con la salvedad de que los dos circuitos correspondientes a la técnica de

voltimetría presentan una ganancia diferente a los de la técnica de espectroscopía de impedancias.

Circuito de adaptación de señal del convertidor D/A

El DAC genera dos señales diferenciales positivas DAC VOUT1 y DAC VOUT2 que cumplen con la condición que aparece en la Ecuación 22 (ver Tabla 1).

$$-1,019 \text{ V} \leq \text{DAC VOUT1} - \text{DAC VOUT2} \leq +1,019 \text{ V} \quad \text{Ecuación 22}$$

Estas dos señales deben ser convertidas en una señal unipolar que se aplicará a los bloques de control de tensión del potenciómetro. Para voltimetría la señal unipolar debe variar en el rango de $[-2 \text{ V}; +2 \text{ V}]$ mientras que para espectroscopía de impedancias el rango de variación de la señal debe ser $[-0,5 \text{ V}; +0,5 \text{ V}]$.

En la Figura 42 se muestra el esquema eléctrico de la etapa de amplificación utilizada a la salida del convertidor D/A para voltimetría (para espectroscopía de impedancias el circuito es idéntico cambiando únicamente el valor de las resistencias que establecen la ganancia).

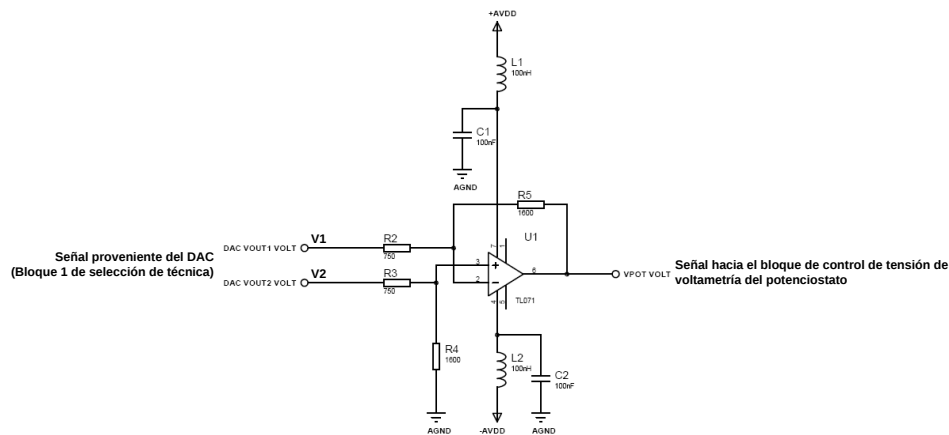


Figura 42. Circuito de adaptación de señal del convertidor D/A para voltimetría

Se ha elegido una configuración de entrada diferencial para la etapa amplificadora mediante el amplificador operacional TL071. Las características fundamentales de este operacional son: alta impedancia de entrada, alto slew rate, baja corriente de pérdidas, baja tensión de offset y baja corriente en reposo (I_{CCQ}). Estas características garantizan una buena respuesta temporal del amplificador con una buena estabilidad tanto en frecuencia como en temperatura.

Con objeto de simplificar las ecuaciones, denominamos V_1 la tensión en la entrada DAC VOUT1 VOLT y V_2 la tensión en la entrada DAC VOUT2 VOLT. La tensión de salida de la etapa amplificadora viene dada por la Ecuación 23.

$$VPOTVOLT = \frac{R_2 + R_5}{R_3 + R_4} \cdot \frac{R_4}{R_2} \cdot V_2 - \frac{R_5}{R_2} \cdot V_1 \quad \text{Ecuación 23}$$

Eligiendo $R_2 = R_3$ y $R_4 = R_5$ se obtiene la Ecuación 24.

$$VPOTVOLT = \frac{R_4}{R_2} \cdot (V_2 - V_1) \quad \text{Ecuación 24}$$

Para obtener la ganancia requerida en esta etapa se eligieron los valores $R_2=R_3=750 \, \Omega$ y $R_4=R_5=1600 \, \Omega$, de manera que el rango de variación de la tensión aplicada al bloque de control de tensión del potenciómetro para voltimetría es el reflejado por la Ecuación 25.

$$-2,174 \, V \leq VPOTVOLT \leq +2,174 \, V \quad \text{Ecuación 25}$$

Siguiendo el mismo razonamiento se diseñaron las resistencias del circuito de adaptación de señal del DAC para espectroscopía de impedancias eligiendo los siguientes valores de resistencias: $R_{12}=R_{13}=1300 \, \Omega$ y $R_{14}=R_{15}=750 \, \Omega$ (R_{12} , R_{13} , R_{14} y R_{15} se corresponden en la Ecuación 24 y en la Ecuación 25 con R_2 , R_3 , R_4 y R_5 respectivamente). Con estos valores el rango de variación de la tensión aplicada al bloque de control de tensión del potenciómetro para espectroscopía de impedancias quedaría como aparece en la Ecuación 26.

$$-0,588 \, V \leq VPOT EI \leq +0,588 \, V \quad \text{Ecuación 26}$$

Analizando los rangos de la Ecuación 25 y de la Ecuación 26 se observa que en ninguno de los dos casos se obtienen los valores exactos fijados en las especificaciones del diseño. Esto se debe en parte a la imposibilidad de obtener valores estándar de resistencias que permitan establecer las ganancias requeridas con total exactitud. Por otro lado, aunque fuese posible encontrar resistencias que proporcionasen los valores exactos de ganancias dichas resistencias siempre tendrían una tolerancia que provocaría un error en la ganancia. Además, la tensión de offset de los operacionales también provocaría un cambio en los rangos de variación de la tensión de salida. Todo ello hace muy complicado obtener, mediante el diseño del hardware, exactitud en la tensión aplicada a la celda electroquímica. Dado que dicha exactitud es una condición fundamental de las técnicas electroquímicas, en el presente trabajo se ha optado por implementar una calibración software de la tensión aplicada la celda electroquímica que permita corregir todas las desviaciones introducidas en el diseño del hardware. Dicha calibración se lleva a cabo desde la aplicación de PC y será explicada en el apartado 4.1.3 de este capítulo.

Circuitos de adaptación de señal de los convertidores A/D

Con objeto de homogeneizar y simplificar el diseño se decidió que los rangos de variación de las señales provenientes del circuito de control de tensión del potenciómetro y del circuito de medida de corriente fuesen los mismos. Obviamente dichos rangos variarán según la técnica ($[-2\text{ V}; +2\text{ V}]$ para voltimetría y $[-0,5\text{ V}; +0,5\text{ V}]$ para espectroscopía de impedancias). Por lo tanto, los circuitos de adaptación de señal para el ADC de tensión y para el ADC de corriente serán, para cada una de las técnicas, los mismos. Por otro lado, la única diferencia de estos circuitos entre una técnica y otra será la ganancia de los mismos.

La función de estos circuitos es adaptar la señal unipolar de alterna que proviene del circuito de control de tensión o del circuito de medida de corriente en señales diferenciales que cumplan con los requerimientos de entrada de los respectivos convertidores A/D. Estas señales diferenciales deben ser positivas y deben cumplir la condición de la Ecuación 20. Por tanto, la misión del circuito de adaptación de señal es elevar y amplificar la señal de entrada con una ganancia que dependerá de la técnica.

En la Figura 43 se muestra el circuito de adaptación de señal del convertidor A/D de corriente para voltimetría.



El bloque seguidor funciona como adaptador de impedancias para evitar que la siguiente etapa cargue a la anterior. Dado que la señal de entrada al circuito de adaptación proviene del circuito de medida de corriente del potencióstato es muy importante que la impedancia de entrada de este bloque seguidor sea muy alta; ya que como se comentó en el apartado 4.3.2 de la Introducción el potencióstato es un circuito electrónico muy sensible a los comportamientos no ideales de los amplificadores operacionales utilizados para su implementación. El operacional utilizado en este bloque es un TL071 que presenta una resistencia de entrada de $10^{12} \Omega$.

97

de Texas Instruments. Se trata de un amplificador con entrada/salida diferencial de alta velocidad y bajo ruido cuya aplicación típica es la conexión de señales monopares a circuitos con entrada diferencial.

A pesar de ser un amplificador diferencial tanto a la entrada como a la salida, en este caso se ha establecido una configuración de entrada monopolar. Las expresiones de las tensiones de salida V_{OUT+} y V_{OUT-} para este circuito son las que aparecen en la Ecuación 27 y en la Ecuación 28 (siendo A_D la ganancia del amplificador).

$$V_{OUT+} = V_{CM} + \frac{1}{2} \cdot A_D \cdot V_{IN} \quad \text{Ecuación 27}$$

$$V_{OUT-} = V_{CM} - \frac{1}{2} \cdot A_D \cdot V_{IN} \quad \text{Ecuación 28}$$

En consecuencia, la expresión de la salida diferencial de tensión del amplificador será el que se indica en la Ecuación 29:

$$V_{OD} = A_D \cdot V_{IN} \quad \text{Ecuación 29}$$

Si en el circuito de la Figura 43 se elige $R_{38}=R_{42}$ y $R_{39}=R_{43}$ la ganancia de la etapa amplificadora viene dada por la expresión de la Ecuación 30.

$$A_D = \frac{R_{39}}{R_{38}} \quad \text{Ecuación 30}$$

Teniendo en cuenta que $R_{39}=2700 \, \Omega$ y $R_{38}=2200 \, \Omega$ y que el rango de variación de la señal de entrada monopolar para el circuito de la Figura 43 es $[-2 \, \text{V}; +2 \, \text{V}]$ obtendríamos un rango de variación de la señal diferencial de salida $[-2,45 \, \text{V}; +2,45 \, \text{V}]$. Siguiendo este mismo razonamiento se obtienen los rangos de variación de la tensión diferencial de salida para el resto de circuitos de adaptación de los convertidores A/D.

En la Tabla 3 se indican cuáles son los rangos de salida diferencial para cada uno de los 4 circuitos de adaptación de los convertidores A/D.

Circuito de adaptación de señal	Ganancia	Tensión diferencial de salida
ADC de tensión de voltametría	$A_G = \frac{R_{26}}{R_{25}} = \frac{2700}{2200} = 1,23$	[-2,45 V; +2,45 V]
ADC de corriente de voltametría	$A_G = \frac{R_{39}}{R_{38}} = \frac{2700}{2200} = 1,23$	[-2,45 V; +2,45 V]
ADC de tensión de espectroscopía de impedancias	$A_G = \frac{R_{32}}{R_{31}} = \frac{7500}{1500} = 5$	[-2,5 V; +2,5 V]
ADC de tensión de espectroscopía de impedancias	$A_G = \frac{R_{45}}{R_{44}} = \frac{7500}{1500} = 5$	[-2,5 V; +2,5 V]

Tabla 3. Valor digital del ADC en función de la tensión diferencial de entrada

El rango de variación de la tensión diferencial de los circuitos de adaptación de señal para los convertidores A/D de voltametría [-2,45 V; +2,45 V] no se corresponde con el rango de la señal diferencial de entrada al ADC [-2,5 V; +2,5 V]. Por otro lado, las tolerancias de las resistencias que fijan la ganancia de los amplificadores y la tensión de offset de los operacionales podrían provocar cierta desviación en los rangos de variación calculados teóricamente, lo que provocaría a su vez un error en el valor digital capturado de los convertidores A/D. Para compensar todas esas posibles desviaciones se ha establecido un procedimiento de calibración software de las lecturas de los convertidores A/D. Dicha calibración se lleva a cabo desde la aplicación software y será explicada en el apartado 4.1.3 de este capítulo.

2.6. Potenciostato

Como se explicó en el apartado 4.3 de la Introducción, el objeto de un potenciostato es aplicar una tensión controlada al electrodo de trabajo con respecto al electrodo de referencia y medir la corriente que circula por él. Tal y como se muestra en la Figura 20, el potenciostato consta de un circuito de control de tensión y un circuito de medida de corriente. El circuito de control de tensión debe ser capaz de aplicar una tensión entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia de forma que dicha tensión no se vea afectada por los procesos electroquímicos que puedan producirse durante la medida. En cuanto

al circuito de medida de corriente, éste genera una señal de tensión que es proporcional al valor de la corriente que circula por el electrodo de trabajo.

Por otro lado, dada la naturaleza inestable del potencióstato, es necesario incorporar mecanismo de estabilización del mismo. Dichos mecanismos presentan el inconveniente de modificar las señales que se aplican y se miden. Por ello, a la hora de introducir mecanismos de estabilización debe tenerse en cuenta lo siguiente:

- La estabilización debe aplicarse únicamente cuando sea necesario.
- Si existen varios niveles de estabilización siempre se debe trabajar en el nivel que, garantizando la estabilidad de sistema, afecte lo menos posible a las señales aplicadas/medidas.

El potencióstato diseñado incorpora dos sistemas de estabilización tal y como se indica en la Figura 22: uno para el circuito de control de tensión y otro para el circuito de medida de corriente.

2.6.1. Circuito de control de tensión

En la Figura 44 se muestra el circuito de control de tensión para el potencióstato de voltametría. En él se aprecia la estructura básica del circuito de control de la Figura 22 formado por los amplificadores operacionales U2 y U3 y por las resistencias R6 y R7.

Una cuestión importante que se debe tener en cuenta cuando se diseña un potencióstato es que la impedancia de entrada de los amplificadores operacionales utilizados sea alta. En este caso se han utilizado los amplificadores operacionales OPA551 que presentan una impedancia de entrada de $10^{13} \Omega$. Otras características de estos operacionales son su alta corriente de salida (200 mA) y su amplio rango de salida en tensión (hasta 60 V). Aunque la tensión de salida que se quiere aplicar al electrodo de trabajo está dentro del rango de $[-2 \text{ V}; +2 \text{ V}]$, el voltaje que debe aplicarse al electrodo auxiliar puede ser mayor en función de las características de la celda electroquímica. Por otra parte, cuando se trabaja a determinadas corrientes el rango de tensión de salida del operacional OPA551 puede llegar a ser de $[-AVDD+3,5 \text{ V}; +AVDD-3,5 \text{ V}]$ cuando la corriente de salida alcanza su valor máximo de 200mA. Por todo ello, y con el objetivo de evitar saturaciones en la señal de tensión en el electrodo auxiliar, se decidió alimentar los amplificadores operacionales a -8 V/+8 V. El

único inconveniente de trabajar con tensiones de alimentación altas es que, si la corriente en reposo del amplificador operacional es grande, se puede producir un incremento de la disipación de potencia en el operacional en reposo, lo que puede provocar su calentamiento y las consiguientes desviaciones en las medidas debidas a la deriva térmica. El operacional utilizado presenta una corriente en reposo relativamente baja ($I_Q=8,5\text{ mA}$) lo que limita el efecto de calentamiento por disipación de potencia en reposo.

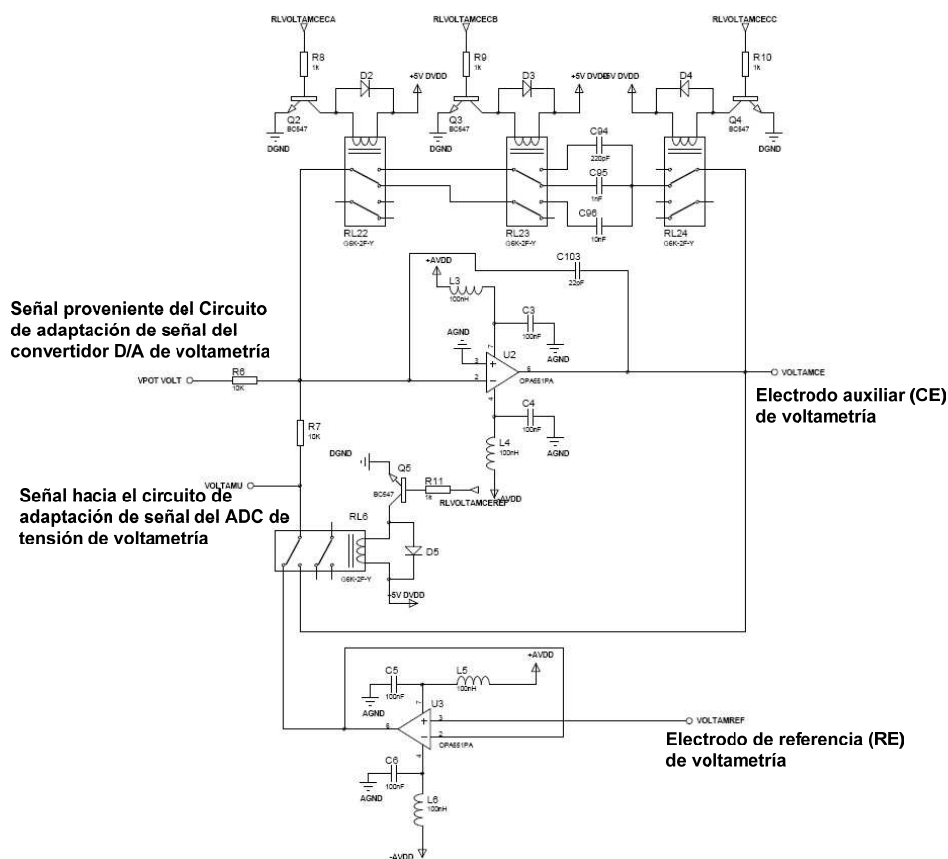


Figura 44. Circuito de control de tensión del potencióstato de voltametría

En algunas aplicaciones puede resultar inviable el uso de un electrodo de referencia (por ejemplo en muestras sólidas o sistemas de tamaño reducido). Por otra parte, en algunas aplicaciones las medidas a 3 electrodos resultan más ruidosas e inestables que las medidas a 2 electrodos. Para darle más flexibilidad

al sistema diseñado se decidió incorporar un mecanismo que permitiese configurar el potencióstato en un modo de trabajo de 2 electrodos (en el que el electrodo de referencia desaparece) o en el modo estándar de 3 electrodos. Este mecanismo consiste en un relé (RL6) que se conmuta desde el μC . Cuando el relé está en la posición de reposo la salida del operacional U3 queda conectada a la resistencia R7 y el sistema funcionará en modo de 3 electrodos, tal y como aparece en la Figura 20. Sin embargo, si se conmuta el relé, es la salida del operacional U2 la que se conecta a la resistencia R7. De esta forma el bloque del operacional U2 se comporta como un amplificador de ganancia 1 mientras que el bloque del operacional U3 queda desconectado del resto de circuito; es decir, la señal a la entrada del potencióstato se aplicaría directamente al electrodo auxiliar mientras que el electrodo de referencia queda desconectado del sistema; estaríamos, por tanto, en el modo de 2 electrodos: el electrodo auxiliar y el electrodo de trabajo.

Por último, el circuito de control de tensión del potencióstato incorpora un mecanismo de estabilización. Tal y como se explicó en el apartado 4.3.2 uno de los métodos de estabilización de un potencióstato consiste en la colocación de un condensador en paralelo con el amplificador operacional que aplica la señal al electrodo auxiliar. El valor de dicho condensador dependerá del nivel de inestabilidad que presente el sistema que a su vez está relacionado con las características de los electrodos y de la muestra. Dicho condensador afecta a la medida realizada y por tanto conviene utilizar siempre el menor valor de capacidad que permita eliminar la inestabilidad alterando lo menos posible las señales aplicadas/medidas. Para dar mayor flexibilidad al mecanismo de estabilización se han incorporado 4 condensadores. Uno de ellos (C103 de valor 22 pF) está permanentemente conectado. Dado que su valor es muy pequeño su capacidad de afectar a las medidas es muy limitada, aunque solo permitirá estabilizar el sistema en condiciones de trabajo favorables. Cuando el sistema presenta inestabilidades más importantes es necesario aumentar el valor de la capacidad. Para ello, se han añadido los otros 3 condensadores (C94, C95 y C96) que pueden ser conectados y desconectados del circuito mediante tres relés (RL22, RL23 y RL24) controlados por el μC a través de sendas líneas de salida. Se pueden establecer, por tanto, 4 niveles de estabilización, tal y como se indica en la Tabla 4:

- Un primer nivel de estabilización por defecto en el cual el único condensador que actúa es el C103 de valor 22 pF que apenas afecta a las medidas y apenas tiene capacidad de estabilización.

- Un nivel de estabilización débil en el cual al condensador C103 se le conecta en paralelo el condensador C94. En este caso el valor de capacidad resultante es de 242 pF lo que permite solventar problemas de inestabilidades débiles afectando ligeramente a las medidas.
- Un nivel de estabilización media que corresponde a la asociación en paralelo del condensador C103 y el condensador C95. Dicha asociación da lugar a un valor de capacidad de 1,022 nF. Su efecto sobre las medidas empieza a resultar perceptible para señales con temporizaciones cortas.
- Un nivel de estabilización fuerte en el que el condensador C103 se asocia en paralelo con el condensador C96. El valor de capacidad resultante es de 10,022 nF. Esta capacidad puede alterar notablemente las medidas y su uso debe limitarse a situaciones de alta inestabilidad.

ESTABILIZACIÓN VOLTAMETRÍA	RL22	RL23	RL24	CONDENSADORES	VALOR CAPACIDAD
Por defecto	OFF	OFF	ON	C103	22 pF
Débil	ON	ON	OFF	C103//C94	242 pF
Media	ON	OFF	OFF	C103//C95	1,022 nF
Fuerte	OFF	ON	OFF	C103//C96	10,022 nF

Tabla 4. Niveles de estabilización del circuito de control del potencióstato de voltametría

El circuito de control de tensión para espectroscopía de impedancias es análogo al de voltametría con la diferencia de que en el bloque de estabilización los valores de los condensadores son menores (ver Tabla 5), dado que la medida de espectroscopía a altas frecuencias es mucho más sensible a la presencia de estas capacitancias que la de voltametría. Además, por defecto, el circuito de control de tensión de espectroscopía de impedancia no presenta ninguna capacidad de estabilización.

ESTABILIZACIÓN ESPEC. DE IMPECANCIAS	RL25	RL26	RL27	CONDENSADORES	VALOR CAPACIDAD
Por defecto	OFF	OFF	ON	C104	0 pF
Débil	ON	ON	OFF	C104//C97	22 pF
Media	ON	OFF	OFF	C104//C98	220 nF
Fuerte	OFF	ON	OFF	C104//C99	1 nF

Tabla 5. Niveles de estabilización del circuito de control del potencióstato de espectroscopía de impedancias

2.6.2. Circuito de medida de corriente

En la Figura 45 se muestra el esquema eléctrico del circuito de medida de corriente del potencióstato.

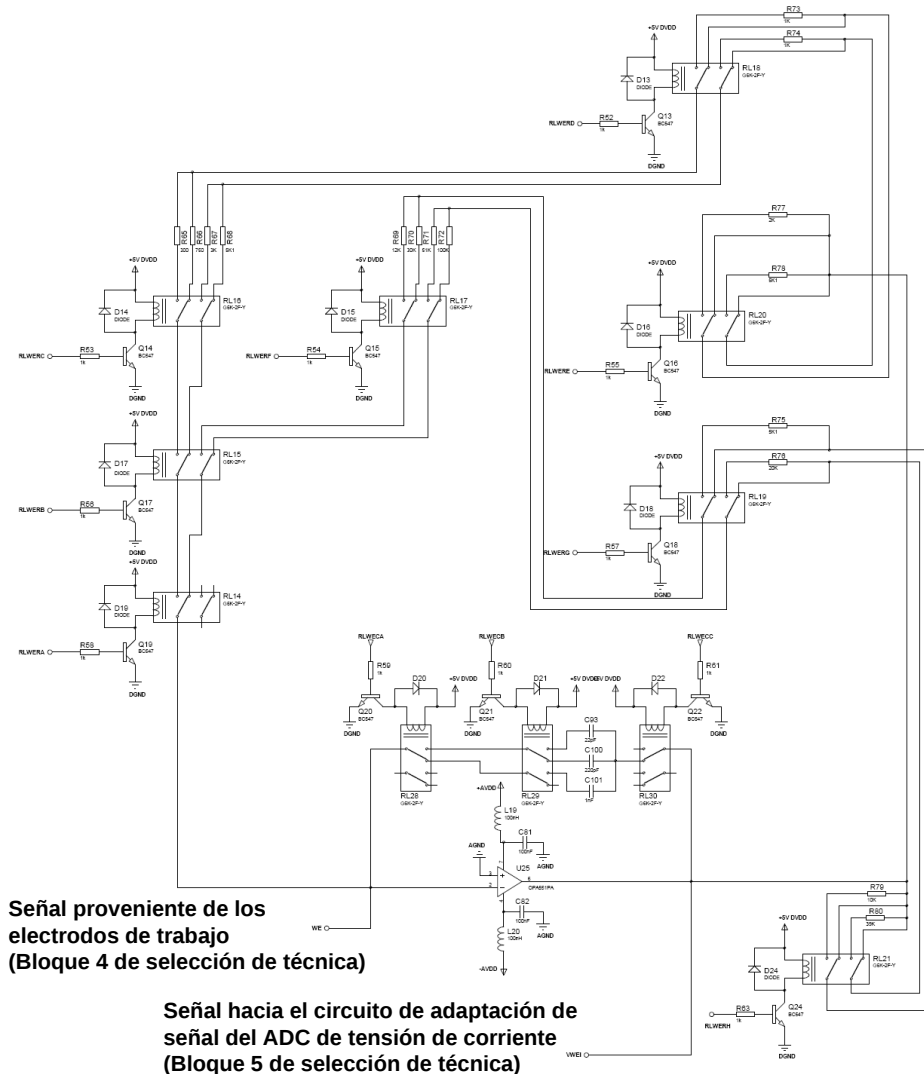


Figura 45. Circuito de medida de corriente del potencióstato

Básicamente su estructura es la que aparece en la Figura 22, solo que en lugar de una sola resistencia de shunt, el circuito incorpora hasta 16 resistencias (R65 a R80) que pueden ser asociadas y seleccionadas mediante 8 relés (RL14 a

RL21) de forma que se pueden obtener hasta 32 valores diferentes de resistencia de shunt (R_{SHUNT}) tal y como se indica en la Tabla 6.

ESTADO RELÉS								R_{SHUNT}
RL14	RL15	RL16	RL17	RL18	RL19	RL20	RL21	
OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	R72
OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	R72+R80
OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	R72+R76
OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	R72+R76+R80
OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	R71
OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON	R71+R80
OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF	OFF	R71+R76
OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON	R71+R76+R80
OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	R70
OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	R70+R79
OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	R70+R75
OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	R70+R79+R75
OFF	ON	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	R69
OFF	ON	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON	R69+R79
OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF	OFF	R69+R75
OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON	R69+R79+R75
ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	R68
ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	R68+R78
ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	R68+R74
ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF	R68+R78+R74
ON	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	R67
ON	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	R67+R78
ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	R67+R74
ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF	R67+R78+R74
ON	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	R66
ON	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	R66+R77
ON	ON	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	R66+R73
ON	ON	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF	R66+R77+R73
ON	ON	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	R65
ON	ON	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	R65+R77
ON	ON	ON	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	R65+R73
ON	ON	ON	OFF	ON	OFF	ON	OFF	R65+R77+R73

Tabla 6. Valores de las resistencias de shunt

El circuito genera una tensión de salida V_i que está relacionada con la corriente que circula por el electrodo de referencia según se indica en la Ecuación 7.

En base a los 32 valores de resistencia de shunt se pueden construir 32 escalas de corrientes. Los valores de estas escalas dependen de los valores de las 16 resistencias y de la técnica; para voltimetría el valor de cada una de las escalas de corriente se obtiene aplicando los distintos valores de R_{SHUNT} a la expresión de la Ecuación 31, mientras que para espectroscopía de impedancias debería

aplicarse la expresión de la Ecuación 32. Estas expresiones se derivan de la Ecuación 7 y del hecho de que las tensiones máximas que se generan en voltametría y en espectroscopia de impedancias son +2 V y +0,5 V respectivamente.

$$Escala\ corriente\ voltametría = \frac{2}{R_{SHUNT}} \quad \text{Ecuación 31}$$

$$Escala\ corriente\ espectroscopia\ de\ impedancias = \frac{0,5}{R_{SHUNT}} \quad \text{Ecuación 32}$$

Por otro lado, el circuito de medida de corriente incorpora un circuito de estabilización que es análogo al del circuito de control de tensión. Se trata de 3 condensadores (C93, C100 y C101) situados en paralelo con el bloque de selección de resistencia de shunt y que pueden ser seleccionados mediante 3 relés (RL28, RL29 y RL30). En este caso no hay ningún condensador conectado por defecto. La relación entre el estado de los relés y el valor de la capacidad del bloque de estabilización se refleja en la Tabla 7.

ESTABILIZACIÓN CIRC. MEDIDA DE CORRIENTE	RL28	RL29	RL30	CONDENSADOR	VALOR CAPACIDAD
Ninguna	OFF	OFF	ON	-	0 pF
Débil	ON	ON	OFF	C93	22 pF
Media	ON	OFF	OFF	C100	220 nF
Fuerte	OFF	ON	OFF	C101	1 nF

Tabla 7. Niveles de estabilización del circuito de medida de corriente

2.6.3. Bloque de multiplexación de electrodos de trabajo

Para la técnica de voltametría el sistema permite llevar a cabo medidas sobre un total de 10 electrodos de trabajo. Dado que solo hay un circuito de medida de corriente se ha incorporado un bloque de multiplexación que conecta los 10 electrodo de trabajo con el circuito de medida de corriente (ver Figura 46).

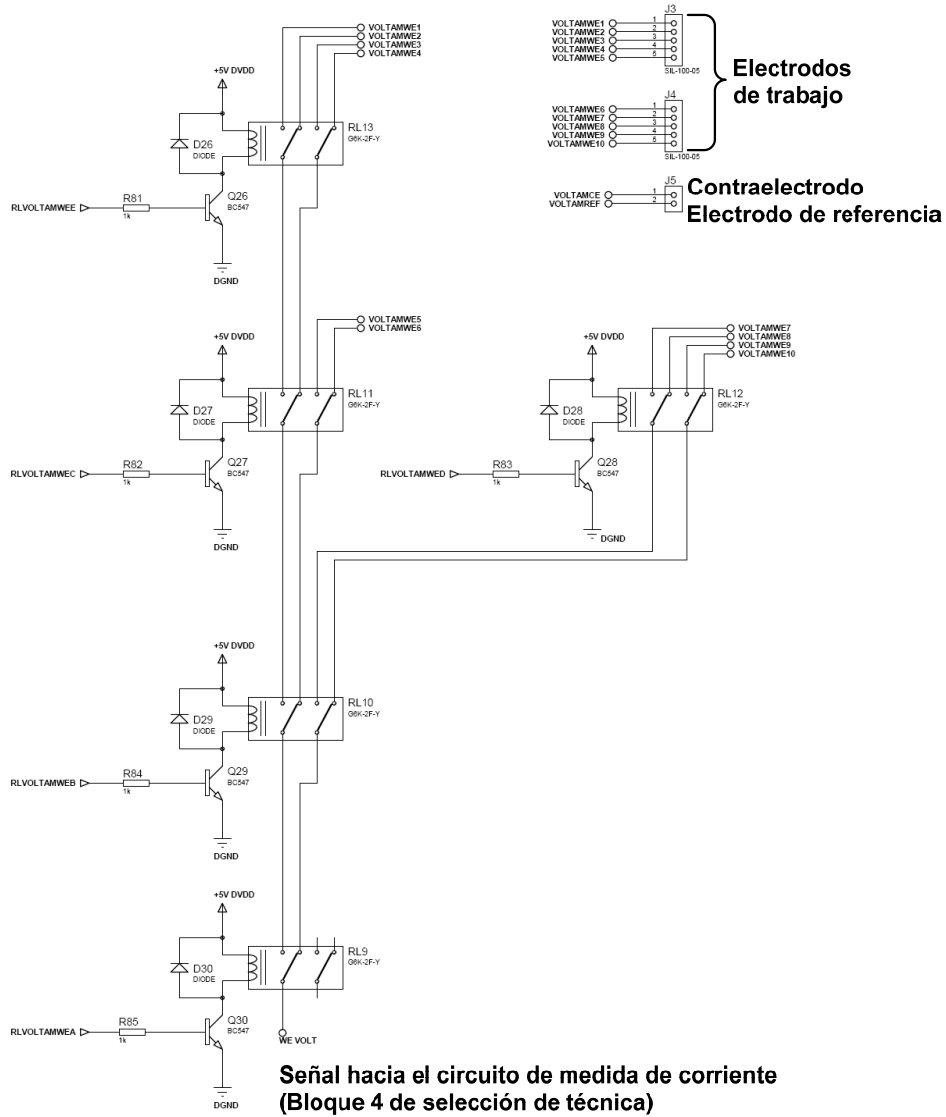


Figura 46. Bloque de multiplexación de electrodos de trabajo

Este circuito se compone de 5 relés con sus correspondientes circuitos de disparo (transistor, resistencia de base y diodo) a través de los cuales el μC puede llevar a cabo la selección del electrodo de trabajo sobre el que quiere realizar la medida. En la Tabla 8 se detalla cuál debe ser el estado de los relés para seleccionar cada uno de los 10 electrodos de trabajo.

RL9	RL10	RL11	RL12	RL13	ELECTRODO DE TRABAJO
ON	ON	ON	OFF	ON	WE1 _v
ON	ON	ON	OFF	OFF	WE2 _v
ON	ON	OFF	OFF	ON	WE3 _v
ON	ON	OFF	OFF	OFF	WE4 _v
ON	OFF	ON	OFF	OFF	WE5 _v
ON	OFF	OFF	OFF	OFF	WE6 _v
OFF	ON	OFF	ON	OFF	WE7 _v
OFF	ON	OFF	OFF	OFF	WE8 _v
OFF	OFF	OFF	ON	OFF	WE9 _v
OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	WE10 _v

Tabla 8. Selección del electrodo de trabajo en voltametría

2.7. Alimentación del equipo

En el sistema diseñado conviven señales analógicas con señales digitales y, dado que las señales analógicas son muy sensibles al ruido electromagnético generado por las señales digitales de alta frecuencia, se decidió que la alimentación de los bloques analógico y digital fuera independiente. Sin embargo, las masas de todos los circuitos son comunes ya que aislar galvánicamente ambos bloques (mediante optoacopladores por ejemplo) habría resultado excesivamente costoso y complejo. Con el fin de evitar bucles de tierra en el diseño del PCB se generaron planos de masa independientes para los circuitos analógicos y digitales que se unieron en un único punto (a la altura de los convertidores D/A y A/D).

Las necesidades de alimentación de los distintos elementos que componen la placa del Equipo Electrónico de Medida son las siguientes:

- Tensiones de alimentación de los circuitos digitales:
 - Tensión de +3,3 V (+3.3V DVDD) para la alimentación del μC , del convertidor UART-USB y de la parte digital tanto del convertidor D/A como de los convertidores A/D.
 - Una tensión de +5 V (+5V DVDD) para la alimentación de los relés.
- Tensiones de alimentación de los circuitos analógicos:

- o Una tensión de +5 V (+5V AVDD) para la alimentación del bloque analógico del convertidor D/A y de los convertidores A/D.
- o Unas tensiones de -8 V y +8 V (-AVDD y +AVDD) para la alimentación de todos los amplificadores operacionales. En la mayoría de los casos las tensiones que manejan dichos amplificadores están en el rango [-2 V; +2 V]. Sin embargo, los amplificadores operacionales que aplican la tensión al contraelectrodo en los circuitos de control de tensión del potenciómetro pueden, en función de las características de la celda electroquímica, manejar tensión fuera de ese rango. Como además los operacionales utilizados no son rail-to-rail, para evitar problemas de saturación de señales, se decidió alimentarlos con tensiones simétricas de -8 V y +8 V.

En la Figura 47 se muestra el bloque de alimentación del circuito. Las tensiones de alimentación de la parte digital de la placa del Equipo Electrónico de Medida se obtienen a partir de una fuente de alimentación lineal de +5 V 1 A (FE3 de CEBEK). Dicha fuente se conecta al conector J7. La tensión generada por esta fuente se utiliza directamente para alimentar los relés (+5V DVDD) y además para generar la tensión de alimentación de +3,3 V (+3.3 DVDD) mediante un regulador de tensión LM3940 (U12).

Las tensiones de alimentación de los circuitos analógicos se obtienen mediante una fuente de alimentación lineal con salida de tensión simétrica +8 V/-8 V. Dicha fuente se construyó a partir de una fuente lineal simétrica de -5 V/+5 V 500 mA (FE8 de CEBEK) sustituyendo los reguladores 7805 y 7905 por reguladores 7808 y 7908 y aumentando el valor de los condensadores de filtro. Las tensiones generadas por esta fuente se conectan al conector J6 y son directamente utilizadas para proveer de alimentación a todos los amplificadores operacionales (-AVDD y +AVDD). Por otro lado, la tensión de +8 V se utiliza para generar mediante un regulador de tensión 7085 (U11) la tensión +5 V AVDD.

2.8. Tratamiento del ruido

En un sistema electrónico en el que se procesan señales analógicas es crítico proteger dichas señales del ruido electromagnético ya sea inducido o conducido. En un circuito electrónico el ruido puede provenir del propio circuito o de una

fuente externa: por tanto, para reducirlo los esfuerzos deben ir encaminados tanto a hacer nuestro sistema más inmune al ruido como a atenuar el nivel de ruido que él mismo genera.

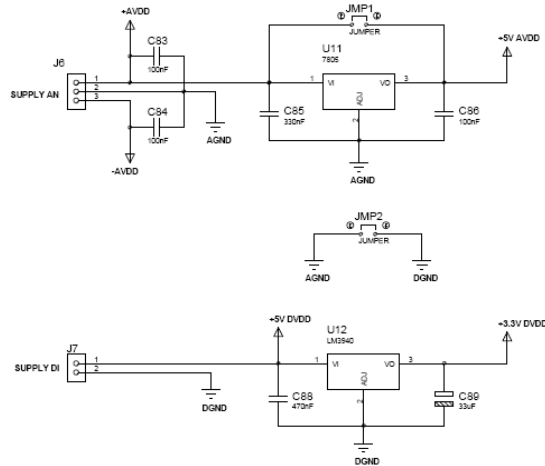


Figura 47. Bloque de alimentación

La generación de ruido electromagnético en sistemas electrónicos tiene que ver con la conmutación de corriente, y está relacionado tanto con la magnitud de la corriente que se conmuta (a mayor corriente mayor nivel de ruido) como con la velocidad a la que se conmuta (a mayor frecuencia mayor nivel de ruido). Los circuitos electrónicos más propensos a la generación de ruido electromagnético son los circuitos de potencia que conmutan corrientes altas a velocidades medias-bajas o los circuitos digitales de alta velocidad que conmutan corrientes bajas a frecuencias altas. En nuestro caso, el Equipo Electrónico de Medida incorpora un bloque digital formado esencialmente por un μC que trabaja con un cristal oscilador de 32 MHz y que puede generar señales de hasta 16 MHz. Las señales de alta frecuencia que el μC maneja son: las líneas de salida de datos hacia el convertidor D/A, las líneas de entrada de datos provenientes de los convertidores A/D y la línea de salida REFO mediante la cual el μC genera la señal de reloj de los convertidores. En el diseño del PCB se ha cuidado especialmente la colocación de los componentes y el trazado de las pistas de forma que las líneas de datos de los convertidores D/A y A/D sean lo más cortas posibles y no pasen cerca de ninguna señal analógica. El mismo cuidado se ha tenido en el trazado de la señal REFO. Por otro lado, la frecuencia de la señal REFO se ha reducido al máximo adaptándola a las necesidades de cada ensayo

tal y como se explica en el 3.5 de este capítulo. De esta forma cuando se trabaja con señales de voltametría o de espectroscopía de impedancias que presentan temporizaciones largas la frecuencia de la señal REFO se reduce considerablemente, disminuyendo el nivel de ruido generado por el bloque digital. Además, para el ruteado de las pistas correspondientes a estas señales se ha evitado el uso de ángulos rectos que son más propensos a la radiación electromagnética.

Todos los componentes del bloque digital incorporan uno o varios (caso del μC) condensadores de desacoplo de 100 nF, lo que ayuda a atenuar el ruido que estos circuitos pueden generar y recibir. Dichos condensadores se han ubicado lo más cerca posible de los pines de alimentación.

Una vez minimizado el ruido generado por los circuitos digitales, el siguiente paso es evitar que dicho ruido afecte a las señales analógicas. En primer lugar es aconsejable utilizar alimentaciones diferentes y separar físicamente los circuitos analógicos de los circuitos digitales. En la Figura 48 se muestra la disposición de los componentes en la placa del Equipo Electrónico de Medida. En la parte izquierda de la placa se sitúan los componentes digitales mientras que en la parte derecha están los analógicos. En medio de ambos se hallan los convertidores D/A y A/D. Las líneas que conectan el μC con los convertidores están todas ubicadas en la parte izquierda de forma que no afecten a las señales analógicas. Las únicas líneas digitales que pasan a la parte derecha de la placa son las líneas de control de los relés; pero por estas líneas se transmiten señales digitales cuasi-estáticas que solo se conmutan antes de iniciar el ensayo por lo que no generan ningún ruido que pueda afectar a los circuitos analógicos durante la medida.

Por otro lado, como se explicó en el apartado anterior, se utilizan alimentaciones distintas para los circuitos analógicos y digitales. Sin embargo, debido a la dificultad y el coste que supondría el diseño de un aislamiento galvánico entre la parte analógica y la parte digital, las masas de ambos bloques están conectadas. Esta conexión podría representar un problema ya que se podría producir el efecto de bucle de tierra. Dicho efecto ocurre cuando dos subsistemas comparten la misma masa y el retorno de las señales de uno de los subsistemas se puede realizar por varios caminos incluyendo zonas de masa que corresponden al otro subsistema. En nuestro caso el subsistema digital comparte masa con el subsistema analógico lo que podría provocar que el retorno de las señales digitales (que presentan un alto nivel de ruido) transcurriese por zonas

de masa que estén cerca de los circuitos analógicos, lo que producirá perturbaciones en las señales analógicas. Para evitar este efecto, el diseño del PCB se ha realizado con dos planos de masa independientes, tal y como se indica en la Figura 48 (uno en la zona de circuitos analógicos y otro en la zona de circuito digitales). Dichos planos están unidos en un solo punto a la altura de los convertidores D/A y A/D. De esta forma el retorno de las señales digitales de alta frecuencia solo se hará por el plano de masa digital no afectando a las señales analógicas. Las únicas señales digitales cuyo retorno transcurre por el plano de masa analógico son las señales de disparo de los relés que, como se ha comentado anteriormente, se conmutan antes de realizar los ensayos y, por tanto, no afectan a las medidas.

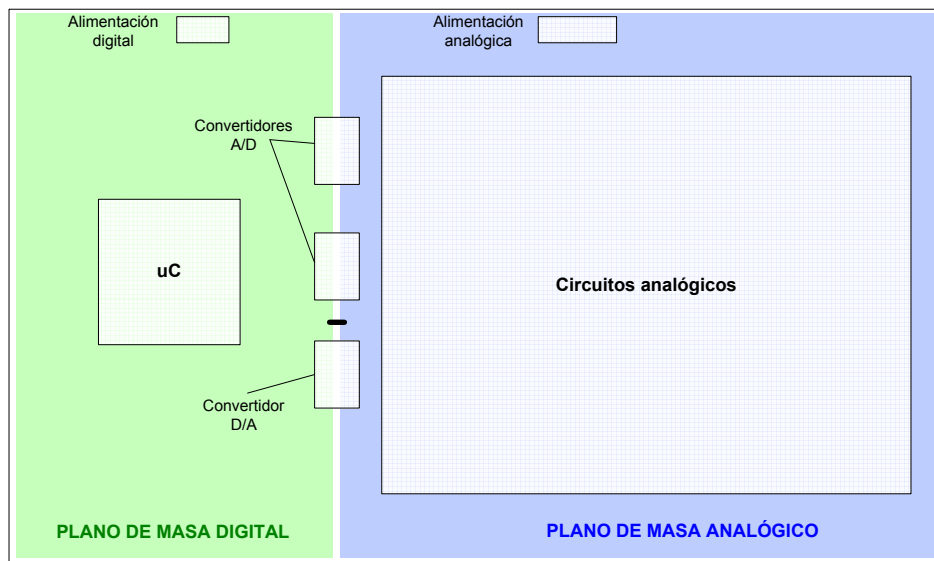


Figura 48. Disposición de componentes y planos de masa

Las alimentaciones de todos los circuitos analógicos (+5V AVDD para los convertidores D/A y A/D y +AVDD y –AVDD para los amplificadores operacionales) se filtran mediante una red LC compuesta por una ferrita de 100nH y un condensador de 100 nF ubicada lo más cerca posible de los pines de alimentación de los circuitos.

Cualquier parte metálica de un componente que no esté debidamente apantallada es susceptible de comportarse como una pequeña antena, recogiendo radiación electromagnética o radiando ella misma cuando la señal

que la recorre es de alta frecuencia. Este es el caso de los pines y los terminales de los distintos componentes. Con objeto de reducir el tamaño de estos terminales todos los componentes utilizados en el diseño (con excepción de los conectores, los reguladores de tensión y los transistores de disparo de los relés) son de montaje superficial (SMT). De esta forma, se evita que los componentes digitales generen radiación electromagnética y que los componentes analógicos la recojan.

Dada la complejidad del circuito y las limitaciones a la hora de colocar los componentes (derivada de la necesidad de separar los componentes analógicos de los digitales) el diseño del PCB se llevó a cabo a 4 capas, lo que también permitió la colocación de amplios planos de masa y alimentación. La distribución de las señales y los planos de masa y alimentación en las 4 capas se hizo conforme se especifica en [142] de la siguiente forma:

- Capa Top: señales analógicas y digitales y planos de masa analógica y digital en las zonas no ocupadas por señales.
- Capa Inner 1: planos de masa analógica y digital.
- Capa Inner 2: planos de alimentación analógica y digital y algunas señales analógicas y digitales (aquellas que no pudieron ser ubicadas en las capas Top y Bottom).
- Capa Bottom: señales analógicas y digitales y planos de masa analógica y digital en las zonas no ocupadas por señales.

El tratamiento del ruido no solo se realizó en el diseño de la placa del Equipo Electrónico de Medida, sino que también hubo que cuidar los aspectos relacionados con el trayecto de las señales desde los electrodos hasta los conectores de la placa. En este sentido, todas las conexiones provenientes de los electrodos (electrodos de referencia, contraelectrodo y electrodos de trabajo) están apantalladas y las pantallas de los cables están conectadas al chasis del Equipo Electrónico de Medida que, a su vez, está conectado a la tierra de la instalación. El apantallamiento se realizó tanto en el trayecto de las señales de los electrodos al panel frontal como del panel frontal a los conectores de la placa.

3. Descripción del software del Equipo Electrónico de Medida.

3.1. *Herramientas de desarrollo*

Para la elaboración del código del microcontrolador se ha utilizado el entorno de desarrollo de Microchip MPLAB. Se trata de un software gratuito que permite trabajar con toda la gama de microcontroladores de Microchip. Este entorno de desarrollo permite integrar distintos tipos de compiladores, tanto los oficiales de Microchip como de otros desarrolladores. Con objeto de facilitar la tarea de programación, la mayor parte del software del μC se ha escrito en lenguaje C; sin embargo, aquellas partes que requieren un mayor control de los tiempos de ejecución (generación y muestreo de señales) se han desarrollado en lenguaje ensamblador. El compilador de C utilizado ha sido el C30 de Microchip.

Por otro lado, para las tareas de grabación del código máquina en la memoria de programa del μC y de depuración del software se ha utilizado el equipo ICD2 de Microchip. Se trata de un dispositivo que permite no solo la programación del microcontrolador sino también la ejecución paso a paso del programa, la visualización de variables y registros de función especial y la introducción de puntos de ruptura (hasta 5 puntos de ruptura para el μC PIC24FJ256).

3.2. *Descripción general del código del μC*

En la Figura 49 se muestra el flujograma simplificado del programa del μC . Cuando arranca el sistema se lleva a cabo la inicialización de los periféricos que consiste básicamente en la configuración las líneas de E/S del μC según corresponda a la función que deben desempeñar. Además se establece la configuración de la señal de reloj externa que se genera desde el μC para los convertidores D/A y A/D.

El bucle principal es el que se encarga de gestionar el funcionamiento del sistema. Dado que todas las tareas que debe realizar el μC son secuenciales (primero se deben recibir los datos del ensayo, a continuación realizar el ensayo y por último transmitir los valores muestreados) no es necesario el uso de las interrupciones del canal serie para recibir y transmitir los datos.

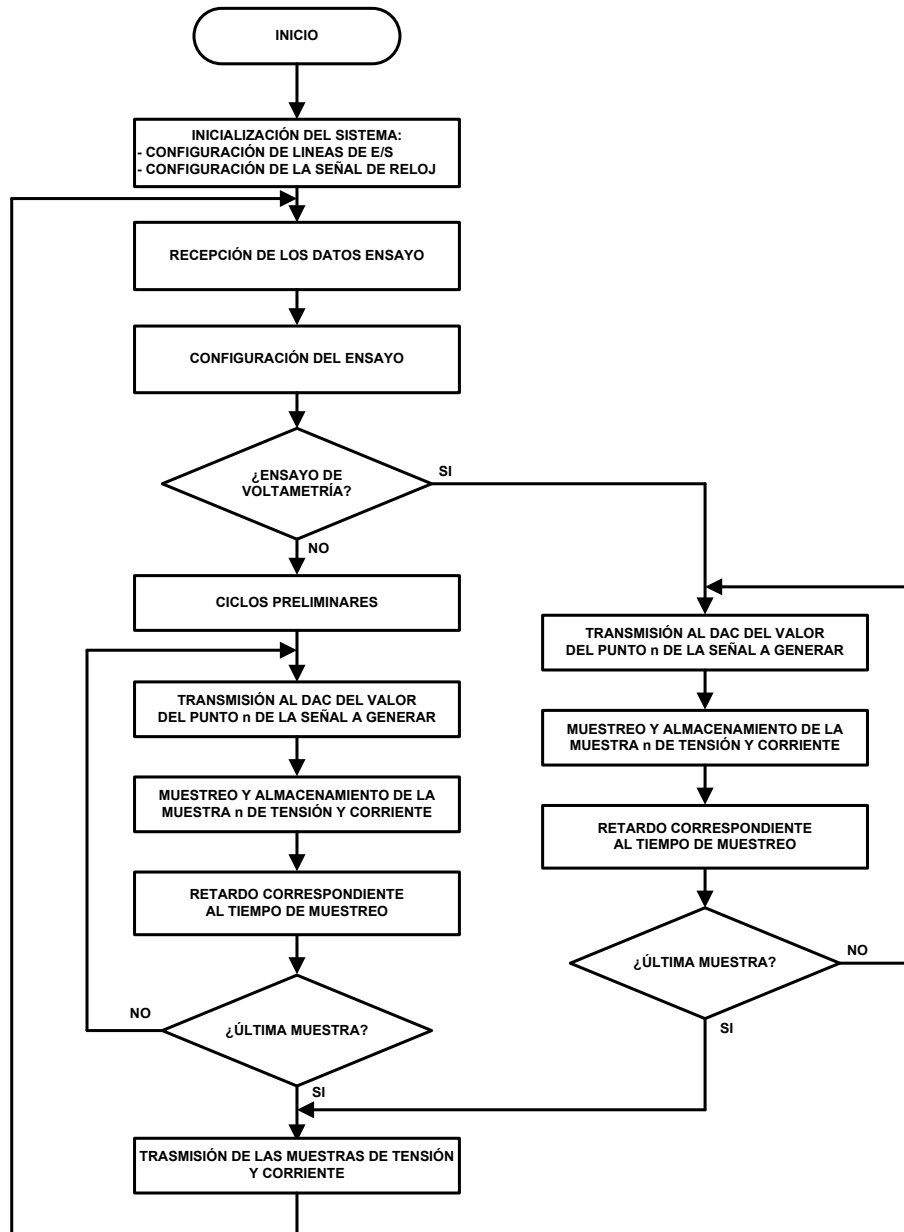


Figura 49. Flujograma simplificado del programa del μC

Por otro lado, las temporizaciones correspondientes a algunas de las señales pueden llegar a ser muy cortas (en espectroscopía de impedancias la generación

de una señal 200 kHz con 10 puntos por periodo requiere temporizaciones de 500 ns). Esto hace inviable el uso de la interrupción de temporizador para generar dichas temporizaciones, ya que el tiempo de tratamiento de la interrupción sería mayor que la temporización que se desea lograr.

La primera tarea que se lleva a cabo en el bucle principal es la recepción y almacenamiento en memoria RAM de los datos transmitidos por el PC. Estos datos incluyen la configuración del ensayo y los valores digitales de 12 bits correspondientes a la evolución temporal de señal que se desea generar.

A continuación se realiza la configuración del ensayo a partir de los datos recibidos. Es decir, se fija el nivel lógico de las líneas de salida del μC que conmutan los relés encargados de:

- Seleccionar el electrodo de trabajo para las técnicas voltamétricas.
- Seleccionar el valor de la resistencia de shunt del circuito de medida de corriente.
- Rutear las señales analógicas desde el DAC al potencióstato y desde el potencióstato hasta los ADC's por los circuitos de adaptación de señal que corresponda según la técnica electroquímica que se desea implementar.
- Establecer el modo de trabajo de los potencióstatos (2 o 3 electrodos).
- Establecer el nivel de estabilización de los potencióstatos.

Una vez se ha establecido la configuración del ensayo se determina qué técnica se debe realizar. Para la técnica de voltametría los tiempos de muestreo son más largos y, por tanto, el proceso de generación y muestreo de las señales se lleva a cabo mediante un código específico. La técnica de espectroscopía de impedancias requiere tiempos de muestreo menores y su implementación debe realizarse mediante una rutina diferente. Aunque en términos generales para ambas técnicas el proceso es el mismo:

- Primero se coloca en las líneas de salida conectadas al DAC el valor digital correspondiente al punto de la señal analógica que se quiere aplicar al potencióstato.
- Seguidamente se lee a través de las líneas de entrada conectadas a los ADC's los valores de las muestras de las señales de tensión y corriente en el electrodo de trabajo.

- A continuación se lleva a cabo un bucle de espera cuya duración depende del tiempo de muestreo establecido.
- Por último, se comprueba si la operación se ha llevado a cabo para todas las muestras requeridas. Si no es así se repite una nueva iteración de generación y muestreo.

La diferencia entre voltametría y espectroscopía de impedancias es que los tiempos de muestreo pueden llegar a ser muchos más largos. Por otro lado, en la técnica de espectroscopía de impedancias puede resultar interesante no empezar a tomar muestras hasta que se le hayan aplicado a la muestra una serie de ciclos de la señal senoidal. Por ello, se ha preparado una rutina de ciclos preliminares previa al proceso de generación y muestreo.

Una vez concluido el proceso de muestreo se procede a la transmisión al PC de las muestras recogidas.

3.3. Organización de la memoria

En la Figura 50 se muestra la organización de la memoria RAM de datos del μ C. El PIC24FJ256 dispone de 16 kBytes de memoria RAM ubicados entre las posiciones 800H y 47FFH de la memoria de datos. La zona de memoria de datos situada entre las direcciones 0H a 800H está reservada a los registros de función especial (registros de la CPU del μ C y registros de control de los periféricos internos).

En la zona baja de la memoria RAM de datos (a partir de la dirección 800H) el compilador de C ha colocado las variables del programa. En total se han declarado 17 variables que ocupan un total de 33 bytes.

Por otro lado, se han definido 4 búfers de memoria con las siguientes funciones:

- Búfer de datos de configuración de ensayo: 2000H-200AH. Se trata de una zona de 10 bytes donde se almacenan algunos de los datos de configuración de ensayo como la técnica, el número de puntos, el tiempo de muestreo o el número de ciclos preliminares
- Búfer de datos de generación de la señal: 2010H-27DFH. Se trata de una zona de 2000 bytes en la que se ubican los valores digitales correspondientes a la evolución temporal de la señal analógica que se

quiere aplicar al potenciostato. Estos datos son generados en el PC y transmitidos al μC que los almacena. Durante el proceso de generación de la señal estos datos son leídos del búfer y transmitidos al convertidor D/A.

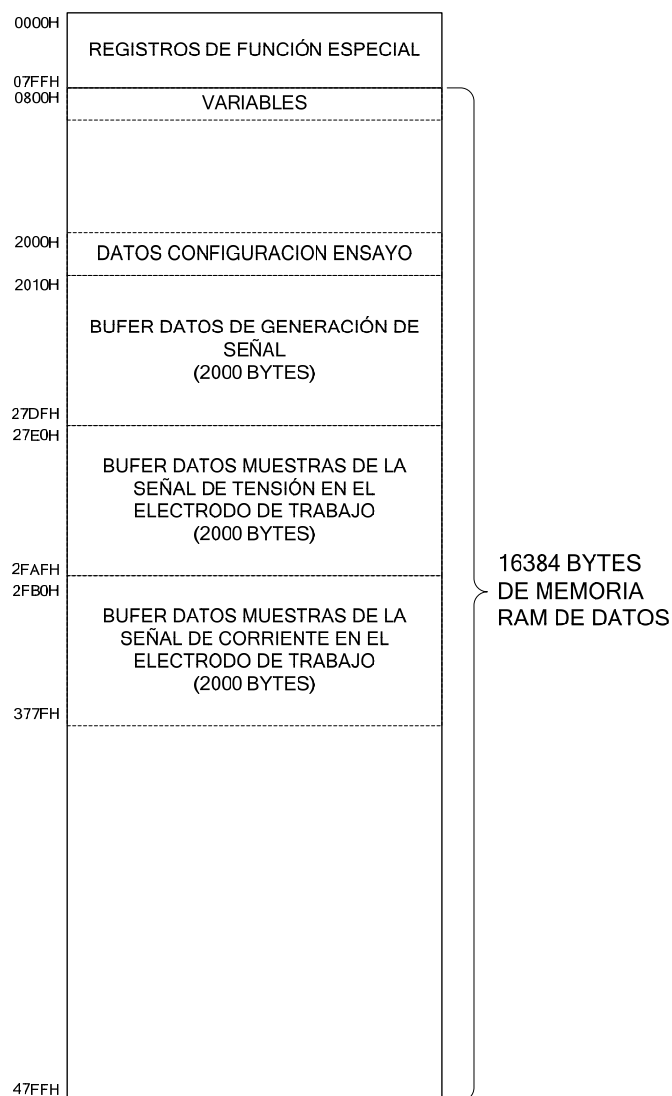


Figura 50. Organización de la memoria de datos del μC

- Búfer de datos de las muestras de la señal de tensión en el electrodo de trabajo: 27E0H-2FAFH. Se trata de una zona de 2000 bytes en la que se ubican los valores digitales correspondientes a la evolución temporal de la señal que se muestrea a la salida del circuito de control de tensión del potencióstato. Estos datos son leídos del convertidor A/D de tensión y almacenados en el búfer durante el proceso de muestreo. Una vez concluido dicho proceso los datos son transmitidos al PC.
- Búfer de datos de las muestras de la señal de corriente que circula por el electrodo de trabajo: 2FB0H-377FH. Se trata de una zona de 2000 bytes en la que se ubican los valores digitales correspondientes a la evolución temporal de la señal de proveniente del circuito de medida de corriente del potencióstato. Estos valores son leídos del convertidor A/D de corriente y almacenados en el búfer durante el proceso de muestreo. Una vez concluido dicho proceso los datos son transmitidos al PC junto con los datos de las muestras de la señal de tensión.

El acceso a estos búfers se realiza en el programa tanto en las partes escritas en C como en las partes escritas en ensamblador. El acceso desde el código en C se lleva a cabo mediante un puntero *ramptr* declarado como una variable global. En cuanto al acceso desde código ensamblador se realiza mediante direccionamiento indirecto a través de los punteros de trabajo de la CPU (W0..W15).

3.4. Módulo de comunicación

Aunque la comunicación con el PC se lleva a cabo mediante USB dentro del Equipo Electrónico de Medida hay un convertidor USB a RS-232 que permite que el μ C pueda recibir y enviar datos a través del canal de comunicación serie UART embebido. En la Figura 51 se muestra la conexión entre el PC y el μ C. Los datos salen del PC a través del bus USB. Dentro del Equipo Electrónico de Medida un convertidor se encarga de transformar el bus USB en un bus RS-232. Por último, dentro de la placa electrónica se ha incorporado un circuito que convierte los niveles RS-232 a los niveles TTL +3 V que maneja el μ C.

Por lo tanto, desde el punto de vista del μ C la comunicación con el PC se realiza a través de una interfaz UART con la siguiente configuración:

- Bits de datos: 8
- Bits de paridad: ninguno
- Bits de stop: 1
- Velocidad de comunicación: 38400 baudios

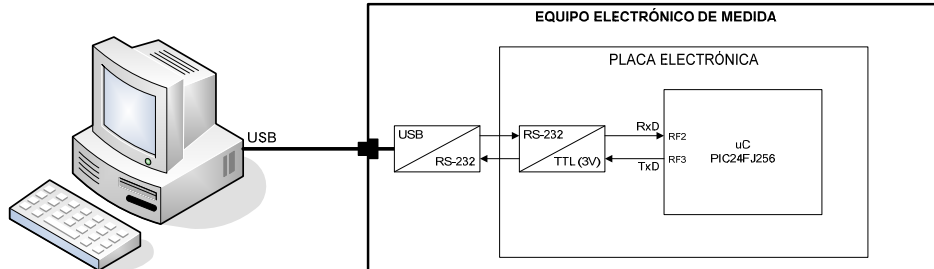


Figura 51. Interfaz de comunicación serie entre el PC y el μ C

Proceso de recepción

Para la realización de cada ensayo el PC debe transmitir una trama con la información del ensayo al μ C. Una vez acabado el ensayo, el μ C contesta al PC con una trama en la que se incluye la información recogida en el proceso de muestreo de las señales de tensión y corriente. La técnica de voltimetría requiere temporizaciones más largas que la espectroscopía de impedancias; por tanto, los datos de configuración del tiempo de muestreo para las dos técnicas serán diferentes. En la Figura 52 se muestra el formato de la trama enviada del ordenador al Equipo Electrónico de Medida con la información del ensayo para la técnica de espectroscopía de impedancias. En la Figura 53 aparece el formato de esta misma trama para la técnica de voltimetría. La única diferencia entre ambas radica en la información correspondiente al tiempo de muestreo y los ciclos preliminares. Para la espectroscopía de impedancias las temporizaciones son más cortas y, por tanto, el tiempo de muestreo puede configurarse mediante una sola variable de 16 bits. Sin embargo, en la técnica de voltimetría las temporizaciones pueden ser muy largas por lo que para fijar el tiempo de muestreo se utilizan 2 variables de 16 bits. Por otra parte, para espectroscopía de impedancias se ha reservado una variable de 16 bits que permite configurar el número de ciclos preliminares que deben ser aplicados antes de empezar a muestrear.

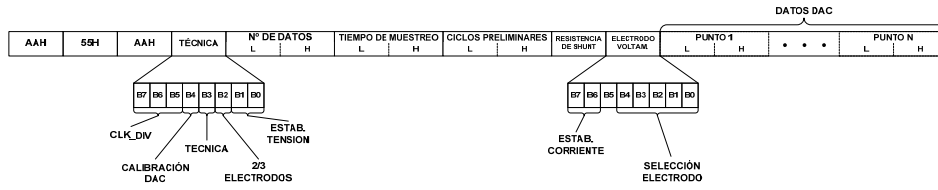


Figura 52. Trama de envío de datos del ensayo del PC al μ C para espectroscopia de impedancias

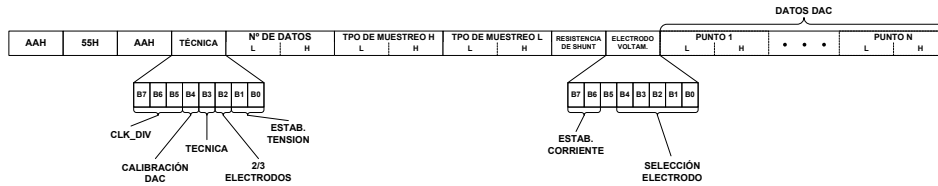


Figura 53. Trama de envío de datos del ensayo del PC al μ C para voltametría

La información contenida en estas tramas es:

- Cabecera de trama: Se trata de tres bytes que se colocan al principio de la trama y cuyos valores son AAH, 55H y AAH. Su misión es permitir al μ C detectar el inicio de la trama. En el proceso de recepción de la trama el receptor debe leer estos tres bytes de forma consecutiva antes de empezar a leer el resto de la información.
- Campo de técnica: se trata de un byte en el que se especifican los siguientes parámetros de configuración del ensayo:
 - o Estabilización del circuito de control de tensión del potenciostato (B1 y B0): hay tres niveles de estabilización: B1B0=00 estabilización desactivada, B1B0=01 estabilización débil, B1B0=10 estabilización media y B1B0=11 estabilización fuerte.
 - o Selección modo de trabajo (B2): el potenciostato trabaja en modo de 3 electrodos si B2=0 y en modo de 2 electrodos si B2=1.
 - o Técnica (B3): se configura el sistema para realizar ensayos de voltametría si B3=0 y de espectroscopia de impedancias si B3=1.
 - o Modo de calibración del DAC (B4): en el modo de calibración del DAC es necesario que el Equipo de Medida Electrónico mantenga la tensión aplicada para que el usuario pueda registrar el valor de dicha tensión. En el resto de modos de trabajo, cuando concluye el ensayo

dicha tensión debe hacerse cero. Si B4=1 se activa el modo de calibración del DAC.

- o Configuración señal de reloj (B7, B6 y B5): con el fin de reducir el ruido electromagnético producido por la señal de reloj externa que el μC genera para los convertidores D/A y A/D la frecuencia de dicha señal se adapta a la duración del tiempo de muestreo. Cuando se requieren tiempos de muestreo largos la frecuencia de la señal de reloj se disminuye. Por otro lado en la técnica de espectroscopía para lograr temporizaciones largas (correspondientes a las señales de frecuencia baja) también se reduce la frecuencia de trabajo de la CPU del μC (de forma que las instrucciones tardan más tiempo en ejecutarse). La configuración de la frecuencia de la señal de reloj externa y de la CPU viene dada por el valor de los bits B7, B6, y B5 del campo de técnica (ver apartado 3.5 de este capítulo).
- Campo de número de puntos: el PC le indica al μC mediante estos dos bytes cuántos puntos se van a incluir en el campo de datos. Cada punto se representa mediante dos bytes.
- Campo de tiempo de muestreo: para espectroscopía de impedancias este campo consta solo de 2 bytes mientras que para voltimetría se trata de un campo de 4 bytes. Este campo establece el límite de veces que debe repetirse el bucle de retardo mediante el cual se implementa el tiempo de muestreo.
- Campo de ciclos preliminares (solo para la técnica de espectroscopía de impedancias): mediante este campo se establece cuántos ciclos preliminares de la señal senoidal deben aplicarse antes de iniciar el proceso de muestreo.
- Campo de selección de la escala de corriente: establece qué combinación de resistencias de shunt del circuito de medida de corriente se activan. Cada uno de los 8 bits de este campo establece el estado de cada uno de los 8 relés de configuración del circuito de medida de corriente.
- Campo de selección del electrodo de trabajo: este campo tiene dos misiones:
 - o Selección del electrodo de trabajo (solo para voltimetría): mediante los bits B4, B3, B2, B1 y B0 de este campo se establece el estado de los 5 relés que permiten seleccionar uno de los 10 electrodos de trabajo.
 - o Estabilización del circuito de medida de corriente (B7 y B6): hay tres niveles de estabilización: B7B6=00 estabilización desactivada,

B7B6=01 estabilización débil, B7B6=10 estabilización media y B7B6=11 estabilización fuerte.

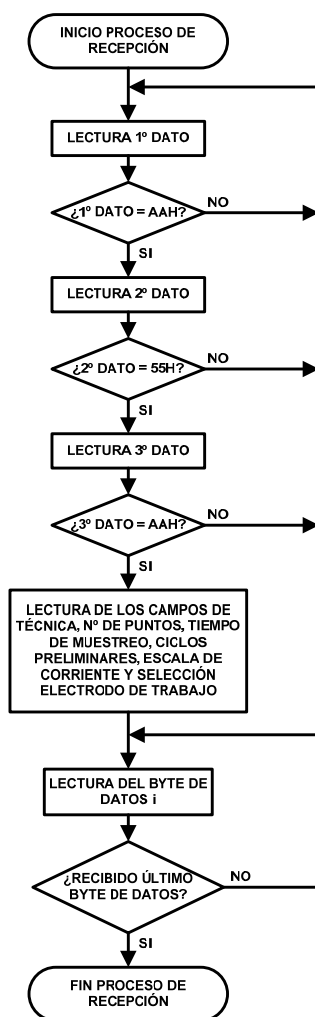


Figura 54. Flujograma simplificado del proceso de recepción de datos

- Campo de datos del DAC: en este campo se transmiten los valores digitales correspondientes a la evolución temporal de la señal que se quiere aplicar al electrodo de referencia. Cada uno de los puntos que establecen dicha evolución temporal se representa mediante dos bytes (ya que el convertidor D/A es de 12 bits). El tamaño de este campo viene

determinado por el dato enviado en el campo de número de puntos. El número máximo de puntos que se pueden utilizar para representar una señal es de 1000; por tanto, la longitud máxima de este campo de 2000 bytes. Estos datos son almacenados en el búfer situado entre las direcciones 2010H y 27DFH de la memoria de datos de donde serán leídos posteriormente durante el proceso de generación de la señal.

En la Figura 54 se muestra un flujograma simplificado del proceso de recepción. Al no utilizarse la interrupción del canal serie UART, la recepción de cada uno de los bytes de la trama se compone de dos fases: bucle de espera a que el flag de interrupción (U1RXIF) se ponga a '1' y luego lectura del byte recibido del registro U1RXREG.

Proceso de transmisión

En la Figura 55 aparece la trama de envío de datos del μ C al PC. En dicha trama el μ C incluye los valores digitales correspondientes a las muestras de las señales de tensión y corriente en el electrodo de trabajo.

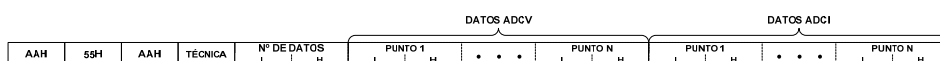


Figura 55. Trama de envío de resultados del ensayo del μ C al PC

Más concretamente la trama se compone de los siguientes campos:

- Cabecera de trama: se trata de tres bytes que se colocan al principio de la trama y cuyos valores son AAH, 55H y AAH. Este campo permite al PC detectar el inicio de la trama.
- Campo de técnica: aunque este campo no es necesario puesto que el PC ya conoce su contenido, se retransmite desde el μ C al PC a efectos de comprobación del buen funcionamiento de la comunicación.
- Campo de número de puntos: el μ C le indica mediante estos dos bytes al PC el número de puntos que van a incluirse en los campos de datos (dos bytes por cada punto).
- Campo de datos del ADCV: en este campo se incluyen los valores de las muestras recogidas por el convertidor A/D de tensión. Estas muestras se corresponden con la evolución temporal de la señal de tensión en el

electrodo de trabajo con respecto al electrodo de referencia. Los datos enviados se leen del búfer de memoria de datos situado entre las direcciones 27E0H y 2FAFH.

- Campo de datos del ADCI: en este campo se incluyen los valores de las muestras recogidas por el convertidor A/D de corriente. Estas muestras se corresponden con la evolución temporal de la señal de corriente que circula por electrodo de trabajo. Estos datos son leídos del búfer de memoria de datos situado entre las direcciones 2FB0H y 377FH

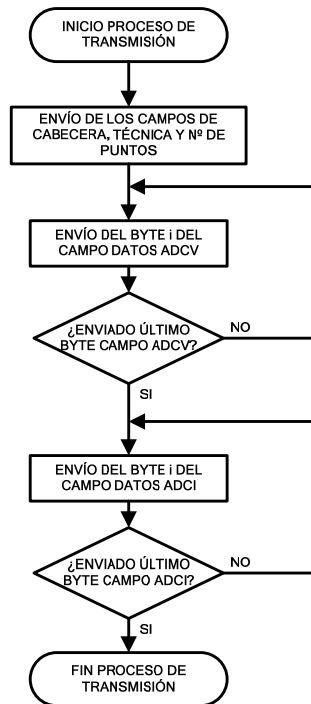


Figura 56. Flujograma simplificado del proceso de transmisión

En la Figura 56 aparece el flujograma simplificado del proceso de transmisión de datos del μC al PC. Dado que la transmisión se realiza sin el uso de interrupciones y con el fin de evitar sobrescribir el búfer de transmisión del canal serie UART, para la transmisión de cada byte se llevan a cabo dos operaciones: un bucle de espera a que el búfer de transmisión quede libre (bit U1TXBF a '0') y la escritura del dato en el registro U1TXREG para que sea transmitido.

3.5. Módulo de configuración del ensayo

Cuando el μC ha recibido la trama enviada por el PC, antes de proceder a la operación de generación y muestreo, debe configurar el ensayo, es decir, establecer los modos de trabajo de los distintos módulos que intervienen en el proceso.

Configuración de la técnica

La configuración de la técnica consiste en la conmutación de los relés que establecen el ruteado de las señales analógicas entre los convertidores D/A y A/D y los circuitos de adaptación de señal y entre los circuitos de adaptación de señal y los circuitos del potencióstato. Este ruteado se implementa mediante 5 relés controlados por las líneas RB4, RF4, RF5, RF12 y RF13 (ver Figura 37, Figura 38, Figura 39, Figura 40 y Figura 41). Antes de iniciar el ensayo el μC debe establecer el estado de los relés para que el ruteado corresponda a la técnica seleccionada. En la Tabla 9 se muestra cómo debe configurar el μC las líneas de salida que controlan los relés para cada una de las técnicas.

TÉCNICA	RB4	RF4	RF5	RF12	RF13
Voltametría	OFF	ON	ON	ON	ON
Espectroscopía de Impedancias	ON	OFF	OFF	OFF	OFF

Tabla 9. Configuración de las líneas de salida del μC para la selección de la técnica

Modo de trabajo del potencióstato

En el potencióstato tanto el circuito control de tensión de espectroscopía de impedancias como el de voltametría pueden trabajar en modo de 3 electrodos (modo estándar de trabajo) o en modo de dos electrodos (para situaciones en las que las inestabilidades de la configuración a 3 electrodos hagan inviables los ensayos o no sea posible la utilización del electrodo de referencia). La selección del modo de trabajo de los circuitos de control de tensión se lleva a cabo mediante un relé controlado por las líneas de salida RB2 y RB3. En la Tabla 10 se muestra el estado que deben tener dichas líneas para configurar el modo de trabajo deseado.

MODO POTENCIOTATO VOLTAMETRÍA	RB2	MODO POTENCIOTATO ESPECTR. IMPEDANCIAS	RB3
3 Electrodo	OFF	3 Electrodo	OFF
2 Electrodo	ON	2 Electrodo	ON

Tabla 10. Configuración de las líneas de salida del μ C para la configuración del modo de trabajo del potencioestado

Estabilización del potencioestado

Como se vio en el apartado 4.3.2 de la introducción el potencioestado es un circuito electrónico que en determinadas condiciones de trabajo puede presentar inestabilidades que le hagan entrar en oscilación. La oscilación puede deberse a inestabilidades producidas tanto en el circuito de control de tensión como en el circuito de medida de corriente. Para estabilizar el circuito de control de tensión se han colocado tres condensadores de distintos valores en paralelo con el bucle de realimentación (ver Figura 44) que pueden ser activados mediante 3 relés controlados por líneas de salida del μ C. Esto permite establecer 4 grados de estabilización: sin estabilización (ningún condensador conectado), estabilización débil, media y fuerte. En la Tabla 11 aparece la configuración de las líneas de salida que permite establecer los distintos grados de estabilización del circuito de control de tensión del potencioestado de voltametría (en el caso de voltametría el circuito incorpora un condensador de 22 pF que está conectado por defecto, incluso cuando no se configura ninguna estabilización), mientras que en la Tabla 12 se muestra dicha configuración para espectroscopía de impedancias.

ESTAB. POTENCIOTATO VOLTAMETRÍA	RC14	RC13	RG6
Ninguna	OFF	OFF	ON
Débil	ON	ON	OFF
Media	ON	OFF	OFF
Fuerte	OFF	ON	OFF

Tabla 11. Configuración de las líneas de salida del μ C para la selección del nivel de estabilización del circuito de control de tensión del potencioestado de voltametría

ESTAB. POTENCIOSTATO ESPECTR. IMPEDANCIAS	RG7	RG8	RG9
Ninguna	OFF	OFF	ON
Débil	ON	ON	OFF
Media	ON	OFF	OFF
Fuerte	OFF	ON	OFF

Tabla 12. Configuración de las líneas de salida del μC para la selección del nivel de estabilización del circuito de control de tensión del potenciómetro de espectroscopía de impedancias

El circuito de medida de corriente también puede presentar inestabilidades. Para corregirlas se ha diseñado un circuito formado por tres condensadores de distintos valores cuya activación se controla mediante tres líneas de salida del μC a través de tres relés (ver Figura 45). La configuración de estas líneas de salida para seleccionar los distintos niveles de estabilización aparece en la Tabla 13.

ESTAB. CIRCUITO DE MEDIDA CORRIENTE	RG13	RG12	RC4
Ninguna	OFF	OFF	ON
Débil	ON	ON	OFF
Media	ON	OFF	OFF
Fuerte	OFF	ON	OFF

Tabla 13. Configuración de las líneas de salida del μC para la selección del nivel de estabilización del circuito de medida de corriente

Selección del electrodo de trabajo de voltametría

En la técnica de voltametría se pueden llevar a cabo ensayos sobre hasta 10 electrodos de trabajos que son multiplexados a través de un circuito formado por 5 relés controlados por sendas líneas de salida del μC (ver Figura 46). Antes de iniciar un ensayo de voltametría el μC debe establecer el nivel de dichas líneas de forma que quede seleccionado el electrodo de trabajo sobre el que se quiere llevar a cabo el ensayo (ver Tabla 14).

ELECTRODO DE TRABAJO SELECCIONADO	RB5	RB6	RB7	RB8	RB9
WE1	ON	ON	ON	OFF	ON
WE2	ON	ON	ON	OFF	OFF
WE3	ON	ON	OFF	OFF	ON
WE4	ON	ON	OFF	OFF	OFF
WE5	ON	OFF	ON	OFF	OFF
WE6	ON	OFF	OFF	OFF	OFF
WE7	OFF	ON	OFF	ON	OFF
WE8	OFF	ON	OFF	OFF	OFF
WE9	OFF	OFF	OFF	ON	OFF
WE10	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF

Tabla 14. Configuración de las líneas de salida del μ C para la selección del electrodo de trabajo de voltametría

Selección de la escala de corriente

Dada la variabilidad de los ensayos que van a realizarse con el equipo, el circuito de medida de corriente debe permitir llevar a cabo medidas de precisión en un amplio rango de escalas de corriente. Para ello, se ha dispuesto un circuito compuesto por 8 relés que permite seleccionar uno de los 32 posibles valores de la resistencia de shunt del circuito de medida de corriente. El μ C establece para cada ensayo la escala de corriente fijando el nivel de las líneas de salida que controlan los relés (ver Tabla 15).

La escala de corriente viene determinada por la relación entre la resistencia de shunt elegida y el fondo de escala de cada una de las técnicas (ver Ecuación 31 y Ecuación 32).

Configuración de la señal de reloj

El μ C genera a través de la línea REFO (línea de salida RB15) la señal de reloj requerida por los convertidores D/A y A/D para su funcionamiento. Dicha señal debe ser de alta frecuencia para tiempos de muestreo cortos, pero su frecuencia puede reducirse cuando las temporizaciones de las señales son más largas. La reducción de la señal de reloj redundará en una disminución del ruido electromagnético generado. Por otro lado, para la obtención de temporizaciones largas en la técnica de espectroscopía de impedancias es necesario reducir la frecuencia de trabajo de la CPU del μ C de forma que el bucle de pérdida de tiempo que fija el tiempo de muestreo sea más largo. Por tanto, para cada ensayo es necesario adecuar tanto la frecuencia de la señal de reloj externa

generada por el μC como la frecuencia de trabajo de la CPU. La configuración de estas frecuencias se establece desde la aplicación del PC en función de la temporización de la señal que se debe generar, y se transmite al μC en los bits B7, B6 y B5 del campo de técnica. Se pueden establecer 8 niveles configuración de las mencionadas frecuencias.

RESISTENCIA DE SHUNT	RG14	RG15	RC1	RB14	RC2	RB13	RB12	RB11
R72	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
R72+R80	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
R72+R76	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
R72+R76+R80	ON	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF
R71	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF
R71+R80	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF
R71+R76	OFF	ON	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF
R71+R76+R80	ON	ON	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF
R70	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF
R70+R79	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF
R70+R75	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF
R70+R79+R75	ON	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF
R69	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF
R69+R79	ON	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF
R69+R75	OFF	ON	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF
R69+R79+R75	ON	ON	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF
R68	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON
R68+R78	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	OFF	ON
R68+R74	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON
R68+R78+R74	OFF	OFF	ON	ON	OFF	OFF	OFF	ON
R67	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON
R67+R78	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	ON	OFF	ON
R67+R74	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	OFF	ON
R67+R78+R74	OFF	OFF	ON	ON	OFF	ON	OFF	ON
R66	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	ON
R66+R77	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	OFF	ON	ON
R66+R73	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	ON	ON
R66+R77+R73	OFF	OFF	ON	ON	OFF	OFF	ON	ON
R65	OFF	OFF	OFF	OFF	OFF	ON	ON	ON
R65+R77	OFF	OFF	ON	OFF	OFF	ON	ON	ON
R65+R73	OFF	OFF	OFF	ON	OFF	ON	ON	ON
R65+R77+R73	OFF	OFF	ON	ON	OFF	ON	ON	ON

Tabla 15. Configuración de las líneas de salida del μC para la selección de la escala de corriente

En la Tabla 16 se muestran los valores de la frecuencia de trabajo de la CPU, de la duración del ciclo de instrucción y de la frecuencia de la señal de reloj externa REFO para los distintos valores de los bits B7, B6 y B5 del campo técnica para el caso de espectroscopía de impedancias. La señal de reloj de la CPU se puede configurar desde su valor máximo 32 MHz (frecuencia del oscilador externo) hasta un valor de 0,25 MHz. A la frecuencia máxima cada

instrucción tarda en ejecutarse 62,5 ns mientras que a la velocidad mínima el tiempo de ejecución es de 8 us.

Para señales con temporizaciones cortas (señal senoidal de 200 kHz) la señal REFO tiene una frecuencia de 2 MHz, mientras que para señales con temporizaciones lentas (señal senoidal de 1 Hz) dicha frecuencia puede reducirse hasta 15,625 kHz (ver Tabla 16).

VALOR BINARIO DE B7B6B5 (TÉCNICA)	FRECUENCIA DE LA SEÑAL DE RELOJ DE LA CPU	DURACIÓN DE UN CICLO DE INSTRUCCIÓN ($T_{CY}=2T_{OSC}$)	FRECUENCIA SEÑAL DE RELOJ EXTERNA (F_{REFO})
000	$F_{OSC}=32$ MHz	62,5 ns	$F_{OSC}/16=2$ MHz
001	$F_{OSC}/2=16$ MHz	125 ns	$F_{OSC}/32=1$ MHz
010	$F_{OSC}/4=8$ MHz	250 ns	$F_{OSC}/64=0,5$ MHz
011	$F_{OSC}/8=4$ MHz	500 ns	$F_{OSC}/128=250$ kHz
100	$F_{OSC}/16=2$ MHz	1 us	$F_{OSC}/256=125$ kHz
101	$F_{OSC}/32=1$ MHz	2 us	$F_{OSC}/512=62,5$ kHz
110	$F_{OSC}/64=0,5$ MHz	4 us	$F_{OSC}/1024=31,25$ kHz
111	$F_{OSC}/128=0,25$ MHz	8 us	$F_{OSC}/2048=15,625$ kHz

Tabla 16. Configuración de la frecuencia de la señal de reloj de la CPU y de la señal externa de reloj REFO para espectroscopía de impedancias

VALOR BINARIO DE B7B6B5 (TÉCNICA)	FRECUENCIA SEÑAL DE RELOJ EXTERNA (F_{REFO})
000	$F_{OSC}/32=1$ MHz
001	$F_{OSC}/64=0,5$ MHz
010	$F_{OSC}/128=250$ kHz
011	$F_{OSC}/256=125$ kHz
100	$F_{OSC}/512=62,5$ kHz
101	$F_{OSC}/1024=31,25$ kHz
110	$F_{OSC}/2048=15,625$ kHz
111	$F_{OSC}/4096=7,8125$ kHz

Tabla 17. Configuración de la frecuencia de la señal externa de reloj REFO para voltimetría

En la Tabla 17 se muestra el valor de la frecuencia de la señal de reloj externa para los distintos valores de los bits B7, B6 y B5 del campo técnica para el caso de voltimetría. En el caso de esta técnica la frecuencia de trabajo de la CPU se configura siempre a su valor máximo es decir 16 MHz (duración de un ciclo de instrucción 62,5 ns)

3.6. Módulo de generación de señal y muestreo

Una vez concluida la configuración del ensayo el sistema está listo para empezar el proceso de muestreo. Dicho proceso es distinto según la técnica que se desea implementar. El μ C comprueba el bit B3 del campo técnica de la trama recibida, si es 0 ejecuta el código correspondiente al proceso de muestreo para voltametría y si es 1 ejecuta el código correspondiente a espectroscopía de impedancias.

El código del proceso de muestreo para ambas técnicas está escrito en ensamblador para tener mayor control sobre el tiempo de ejecución. El tiempo de muestreo se implementa mediante la repetición de instrucciones en ensamblador cuya duración es conocida, ya que depende únicamente de la frecuencia de trabajo de la CPU.

Antes de iniciar el proceso de muestreo los valores de los parámetros necesarios para la realización de los ensayos se guardan en registros de la CPU (W0...W15) para poder tener un acceso rápido a dicha información. Los registros de la CPU también se utilizan para tener acceso al búfer del que se leen los datos para el DAC y a los búfers en los que se escribe la información recogida de los ADC's.

Voltametría

En la Figura 57 se muestra el flujograma correspondiente al proceso de generación de señal y muestreo para voltametría. En primer, lugar deben inicializarse con el valor correspondiente los punteros mediante los cuales se va a acceder a los búfers de datos del DAC y de los ADC's. A continuación se inicializa W10 con la parte alta (los 2 bytes más significativos) del contador de tiempo de muestreo, mientras que W4 toma el valor de la parte baja. El siguiente paso es tomar el valor digital correspondiente a la tensión que deseamos generar para la muestra actual (dicho valor se toma del búfer de datos del DAC) y se vuelca en el puerto correspondiente. Seguidamente se lee el valor de 12 bits del ADC de tensión y se guarda en el búfer correspondiente. En la siguiente instrucción se realiza la misma operación para el ADC de corriente.

Cada una de estas tres acciones se lleva a cabo mediante una sola instrucción en la que además se incrementan los punteros que recorren los búfers. El siguiente paso es la implementación del retardo correspondiente al tiempo de retardo que nos permite establecer la temporización de la señal generada. En el bucle de

retardo primero se decrementa la parte baja y cuando ésta llega a cero se decrementa la parte alta y se inicializa la parte baja con el valor 65.535. Cuando concluye el bucle de retardo se comprueba si se ha alcanzado la última muestra. En caso afirmativo se da por concluido el proceso y se pasa a la transmisión de los datos recogidos. En caso contrario se procede a repetir el proceso con la siguiente muestra.

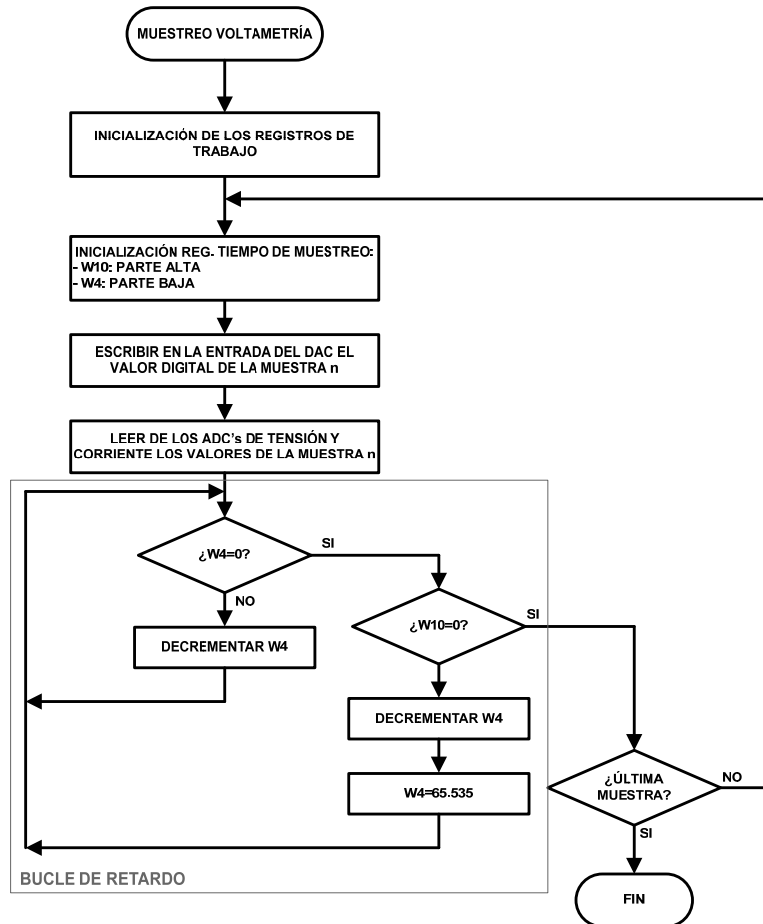


Figura 57. Flujograma del proceso de generación de señal y muestreo para voltametría

El algoritmo está implementado con instrucciones en ensamblador cuyo tiempo de ejecución es conocido. Gracias a ello es posible obtener la expresión de la

duración de un ciclo de muestreo en función de los registros W4 y W10. En la Ecuación 33 se refleja el valor de los ciclos máquinas correspondientes a un ciclo de muestreo.

$$\text{ciclos máquina} = 14 + W10 \cdot 327684 + W4 \cdot 5 \quad \text{Ecuación 33}$$

A partir de esta expresión la aplicación del PC puede calcular el valor de la parte alta (W10) y la parte baja (W4) del contador del bucle de retardo (ver apartado 4.2.2 de este capítulo).

Espectroscopía de impedancias

La Figura 58 muestra el flujograma correspondiente al proceso de generación de señal y muestreo para espectroscopía de impedancias.

En las medidas de espectroscopía de impedancias puede resultar interesante aplicar una serie de ciclos de la señal antes de empezar a muestrear. De esta forma la medida se lleva a cabo en estado estacionario y no en transición. Por ello, antes de la fase de muestreo se ha establecido la posibilidad de generar (sin llevar a cabo muestreo) una serie de ciclos preliminares. El número de ciclos preliminares puede ser establecido en la aplicación de PC.

El primer paso del proceso es la inicialización de los registros de trabajo (punteros a los búfers del DAC y ADC's). También se inicializa el registro W10 con el valor del número de ciclos preliminares que se desean generar y W4 con el contador del tiempo de muestreo.

A continuación se inicia el bucle de generación de los ciclos preliminares. Si el número de ciclos preliminares es 0 este bucle no se ejecuta. En este bucle se comprueba si W10 es 0. Si no lo es se vuelca en el puerto A (ver Figura 33) el valor digital de la tensión que se desea generar para la muestra actual. Después se implementa el retardo correspondiente al tiempo de muestreo que consiste en repetir una misma instrucción el número de veces establecido en el contador de retardo (W4). A continuación se comprueba si se ha alcanzado la última muestra del ciclo. Si no es así se repite el proceso para la siguiente muestra. Una vez alcanzada la última muestra se decrementa W10 (número de ciclos preliminares) y se vuelve a repetir todo el proceso. Cuando W10 llega a cero se pasa al proceso de generación de señal y muestreo.

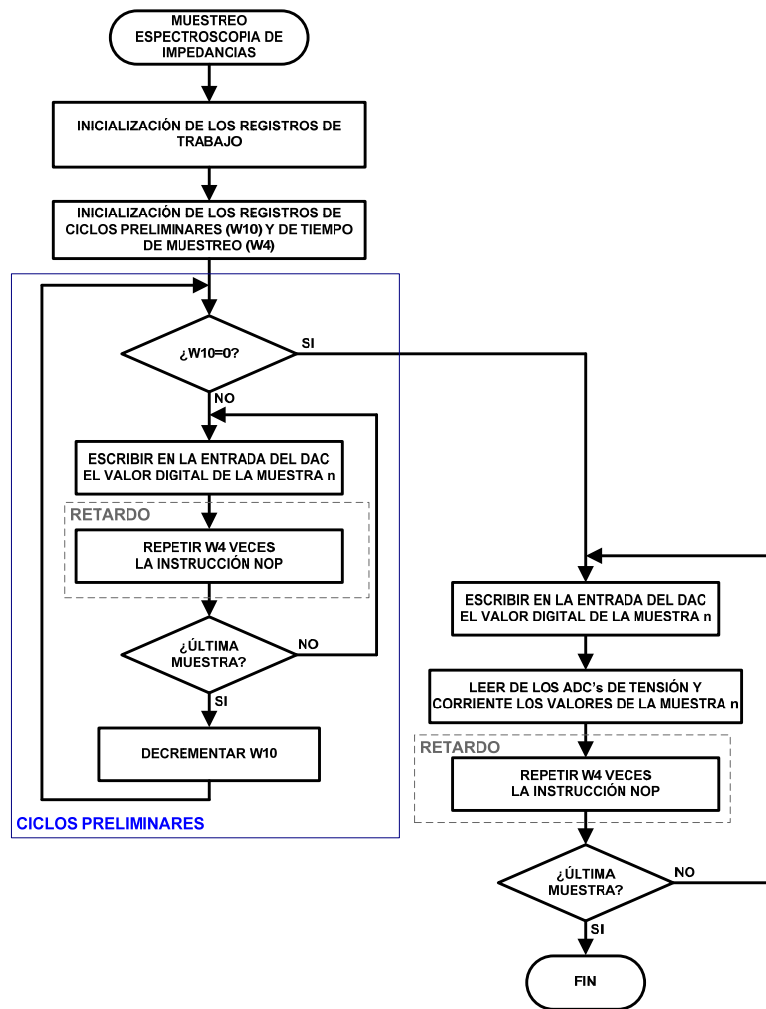


Figura 58. Flujograma del proceso de generación de señal y muestreo para espectroscopía de impedancias

En dicho proceso, en primer lugar, se vuelca a la entrada del DAC el valor de 12 bits correspondiente a la tensión que se desea generar para la muestra actual. A continuación se leen de los ADC's de tensión y corriente los valores de 12 bits de las muestras de tensión y corriente en el electrodo de trabajo. Seguidamente se establece el retardo equivalente al tiempo de muestreo mediante la repetición

de la instrucción NOP. La ejecución de dicha instrucción se repite el número de veces marcado por W4 (contador de tiempo de muestreo). Finalmente se comprueba si se ha alcanzado la última muestra y, en caso de no ser así, se repite el proceso.

Al igual que ocurre con voltimetría es posible establecer el número de ciclos máquina que se requieren para un ciclo de muestreo (ver Ecuación 34)

$$\text{ciclos máquina} = W4 \cdot 8 \qquad \text{Ecuación 34}$$

A partir de esta ecuación la aplicación de PC puede calcular el valor del contador de tiempo de muestreo correspondiente a la frecuencia de la señal senoidal que se quiere generar (ver apartado 4.4.2 de este capítulo).

4. Código de la aplicación de PC

La herramienta de desarrollo elegida para generar la aplicación de PC ha sido el software Visual Basic 6.0. Se trata de un compilador basado en el lenguaje de alto nivel *basic* que permite el desarrollo de aplicaciones con una interfaz gráfica de usuario vistoso (botones, cajas de texto, *sliders*, barras de progreso, gráficas, interfaz de comunicación, etc.).

El software dispone de 4 módulos:

- Módulo de configuración.
- Módulo de voltimetría de pulsos.
- Módulo de voltimetría cíclica.
- Módulo de espectroscopía de impedancias.

4.1. Módulo de Configuración

Este módulo permite la configuración de parámetros generales del sistema así como de parámetros específicos de algunos ensayos.

4.1.1. Configuración del puerto de comunicación serie

Aunque la comunicación entre el PC y el Equipo Electrónico de Medida se realiza mediante una conexión USB, el convertidor USB-UART permite que el PC vea el puerto USB como un puerto RS-232. Mediante esta opción el usuario puede seleccionar a través de cuál de los puertos COM disponibles se va a comunicar con el Equipo Electrónico de Medida. Esta selección se lleva a cabo mediante una lista desplegable en la que se muestran los puertos COM disponibles en el ordenador. La velocidad de comunicación y el resto de parámetros de configuración de la interfaz UART son fijos y no pueden ser modificados por el usuario (38400 baudios, 8 bits de datos, sin bit de paridad y un bit de stop).

4.1.2. Configuración de las resistencias de shunt del circuito de medida de corriente

Tal y como se vio en el apartado 2.6.2 de este capítulo el circuito de medida de corriente del potencióstato incorpora un total de 16 resistencias de shunt que permiten implementar hasta 32 escalas de corriente. En función de la aplicación es posible que sea necesario modificar el valor de alguna(s) de estas resistencias para modificar dichas escalas. Para ello, sería necesario cambiar físicamente las resistencias en la placa del Equipo Electrónico de Medida; pero además también deben actualizarse los valores de las resistencias cambiadas en la aplicación, puesto que los cálculos de los valores de corriente se llevan a cabo a partir de los valores de las resistencias de shunt configurados. Esta opción permite al usuario modificar los valores de estas resistencias dentro de la aplicación.

4.1.3. Calibración del Equipo Electrónico de Medida

En el apartado 2.2 de este capítulo se estudió que tanto en el proceso de conversión D/A como en el posterior tratamiento de la señal generada hasta que es aplicada a la celda electroquímica se producían ciertas inexactitudes en el valor analógico de dicha señal (ver Ecuación 25 y Ecuación 26). Dichas inexactitudes pueden verse acentuadas por las tolerancias de las resistencias utilizadas (1 %) y por el offset de los amplificadores operacionales. Con el fin de compensar el efecto de estas desviaciones en el valor de la señal aplicada al electrodo de trabajo se ideó un sistema de calibración del proceso de conversión D/A.

De igual modo y, por motivos análogos, en el procesado de las señales analógicas provenientes de los circuitos de control de tensión y de medida de corriente del potenciómetro y en la posterior conversión A/D de las señales se pueden producir desviaciones (ver apartado 2.3 de este capítulo). Esto haría que los valores digitales correspondientes a las muestras de las señales de tensión y corriente en el electrodo de trabajo pudiesen presentar errores o desviaciones. Por lo tanto, también fue necesaria la implementación de un sistema de calibración para el proceso de conversión A/D.

Calibración del proceso de conversión D/A

Aunque existe un formulario específico de calibración del D/A para voltimetría y otro para espectroscopía de impedancias, el proceso que se sigue en ambos casos es análogo. Para llevar a cabo la calibración de la conversión D/A es necesario colocar entre el terminal del electrodo de trabajo y el del contraelectrodo una resistencia (resistencia de calibración) de igual valor al valor de la resistencia de shunt R65. Además se debe conectar un multímetro en bornes de la resistencia de calibración para medir la tensión entre el WE y el CE.

Dentro del formulario de calibración D/A (ver Figura 59) el usuario selecciona la modalidad de 2 electrodos y el valor de resistencia de shunt más baja (de forma que los valores de la resistencia de calibración y la resistencia de shunt sean los mismos). A continuación el usuario inicia el proceso haciendo clic en el botón de CALIBRAR DAC. La aplicación envía al Equipo Electrónico de Medida una trama para que éste genere una señal de continua que se corresponda con el valor digital 4095. A continuación la aplicación le solicita al usuario que introduzca el valor de tensión real que el multímetro ha medido entre el WE y el CE. Una vez introducido dicho valor la aplicación representa esta medida en un gráfico que muestra el valor digital enviado en función de la tensión medida entre el WE y el CE. Este proceso se repite para otros 20 valores digitales distribuidos de forma lineal entre 4095 y 0 (3891, 3687, 3483, 3279, 3075, 2871, 2667, 2463, 2259, 2055, 1851, 1647, 1443, 1239, 1035, 831, 627, 423, 219 y 0). De este modo al final del proceso se obtiene una gráfica de 21 puntos que relaciona el valor digital que se escribe a la entrada del convertidor D/A con la tensión real que se genera entre el WE y el CE.

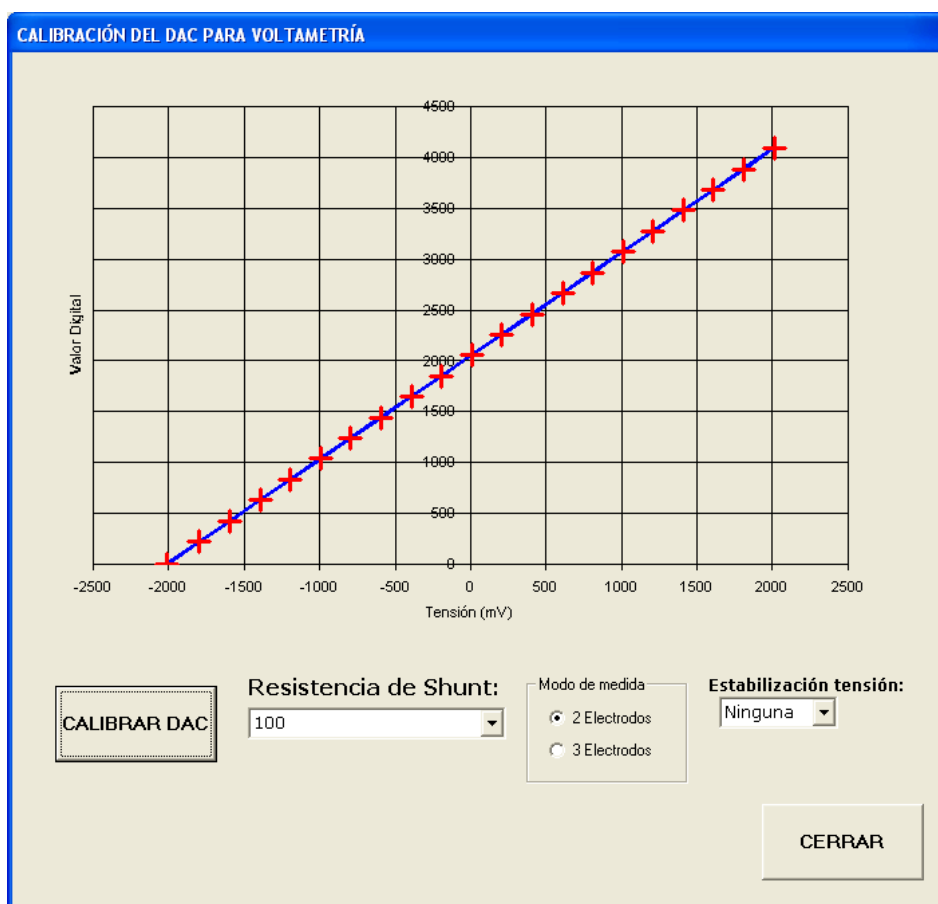


Figura 59. Formulario de calibración del proceso de conversión D/A para voltametría

Para voltametría, en el caso ideal debería cumplirse que, por ejemplo, si se escribe el valor 0 a la entrada del DAC la tensión generada debe ser -2 V y si se escribe 4095 la tensión debe ser +2 V. En el caso de espectroscopía de impedancias los valores deberían ser -0,5 V y +0,5V respectivamente. Sin embargo, por los motivos expuestos anteriormente esto no es así en la práctica. Por lo tanto, necesitamos establecer algún tipo de mecanismo que nos permita calcular cuál es el valor digital que debemos colocar a la entrada del convertidor D/A para que la tensión generada entre el WE y el CE sea la deseada. Para ello, la aplicación realiza una regresión lineal simple por mínimos cuadrados sobre

los 21 puntos medidos y establece la ecuación de la recta de regresión tal y como se indica en la Ecuación 35.

$$y = A_{DAC} \cdot x + B_{DAC} \quad \text{Ecuación 35}$$

Donde:

- y: valores digitales que deben escribirse en la entrada del convertidor D/A
- x: valores de la tensión que queremos aplicar al electrodo de trabajo
- A_{DAC} : pendiente de la recta
- B_{DAC} : ordenada en el origen

Una vez establecida dicha ecuación, cada vez que se desee generar una determinada tensión en el electrodo de trabajo basta con aplicar la Ecuación 35 para obtener el valor que debemos pasarle al convertidor D/A. En dicha transformación ya están incluidos todos los posibles errores o desviaciones ya que la ecuación de la recta se ha calculado a partir de datos experimentales.

Calibración del proceso de conversión A/D

Dado que el sistema mide la tensión y la corriente en el electrodo de trabajo deben llevarse a cabo dos calibraciones de conversión A/D. Además cada una de estas calibraciones puede realizarse tanto para voltimetría como para espectroscopía de impedancias. Por tanto, hay 4 formularios de calibración del proceso de conversión A/D. Sin embargo, el proceso que se sigue es el mismo para todos ellos. Para poder llevar a cabo una calibración del conversor A/D es necesario haber realizado una calibración del convertidor D/A previamente.

En primer lugar debe colocarse una resistencia (resistencia de calibración) de igual valor al valor de la resistencia de shunt R65 entre el terminal del electrodo de trabajo y el del contraelectrodo. En este caso no es necesario el uso del multímetro.

El formulario de calibración A/D para la medida de tensión correspondiente a voltimetría aparece en la Figura 60. Con dicho formulario abierto, el usuario debe seleccionar el modo de medida de 2 electrodos y la resistencia de shunt más baja. Al seleccionar la resistencia de shunt más baja, su valor coincidirá con el valor de la resistencia de calibración. De esta forma se consigue que el valor de la tensión a la salida del circuito de medida de corriente sea igual al

valor de la tensión aplicada al electrodo de trabajo, lo que facilita la calibración del proceso de conversión A/D para la medida de corriente.

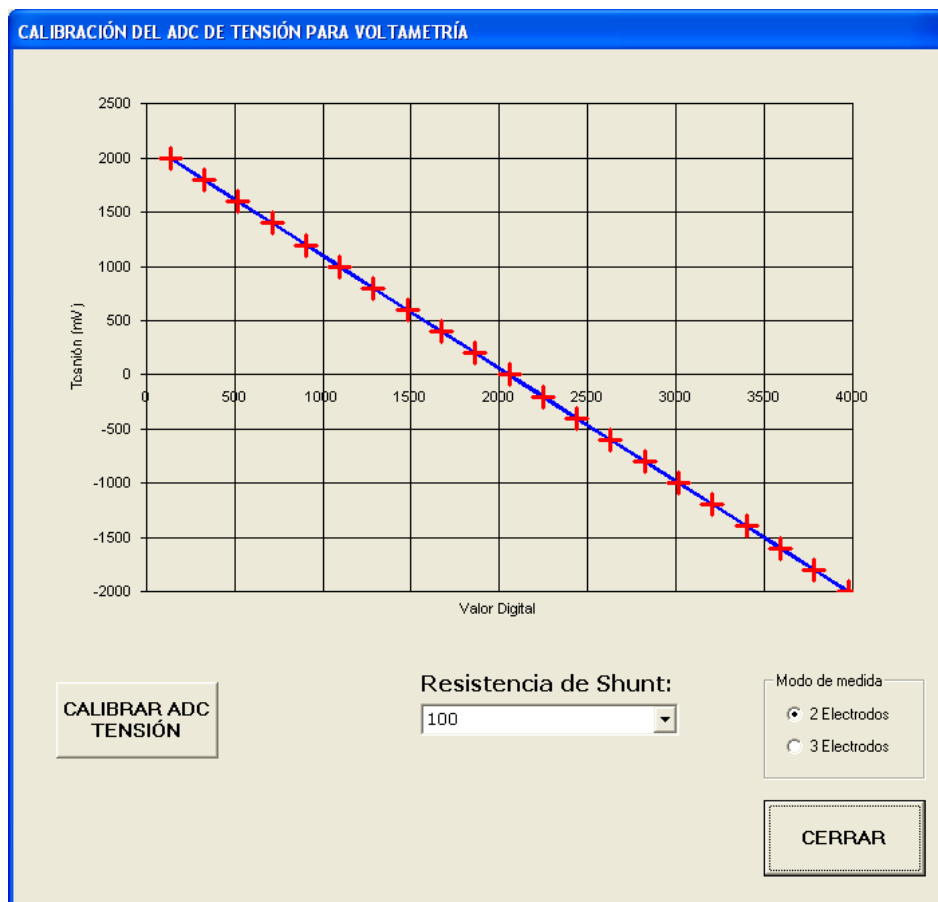


Figura 60. Formulario de calibración del proceso de conversión A/D para la medida de tensión correspondiente a voltametría

Una vez configurada la calibración el usuario inicia el proceso haciendo clic en el botón de CALIBRAR ADC TENSIÓN para el caso del convertidor A/D de tensión o CALIBRAR ADC CORRIENTE para el caso del de corriente. A continuación la aplicación envía una trama al equipo de medida para que genere una tensión constante de +2 V para la técnica de voltametría y +0,5 V para la de espectroscopía de impedancias. La aplicación utiliza la calibración del convertidor D/A realizada previamente para calcular los valores digitales que

permitan la generación de dicha tensión. El Equipo Electrónico de Medida aplica la tensión al electrodo de trabajo y muestrea las tensiones provenientes del circuito de control de tensión y del circuito de medida corriente del potencióstato. El proceso de generación y muestreo de las señales dura unos 100 ms durante los cuales se recogen 1000 muestras. Los valores digitales de dichas muestras son enviados a la aplicación que calcula la media de los 800 valores intermedios (se descartan los 100 primeros valores y los 100 últimos valores). A continuación la aplicación visualiza el dato en un gráfico que representa la tensión aplicada en función del valor digital leído del convertidor A/D correspondiente. El mismo proceso se repite 20 veces más disminuyendo en cada iteración la tensión aplicada 200 mV en el caso de voltametría y 50 mV en el de espectroscopia de impedancias. El proceso es automático y no requiere de la intervención del usuario. De esta forma se obtiene una gráfica de 21 puntos en la que se relacionan los valores de tensión aplicada con los valores leídos del convertidor A/D. Para voltametría el valor leído del A/D al aplicar una tensión de +2 V debería ser en teoría de 4095; mientras que para espectroscopia debería obtenerse ese mismo valor digital para una tensión de +0,5 V. Sin embargo, tal y como se ha explicado anteriormente, esto no tiene porque ser así en la práctica. Será necesario, por tanto, implementar algún mecanismo que permita a la aplicación establecer el valor de la tensión analógica medida en función del valor digital leído del convertidor A/D. Utilizando las 21 medidas realizadas se lleva a cabo una regresión lineal simple por mínimos cuadrados que permite establecer la ecuación de la recta de regresión. Para cada técnica (voltametría y espectroscopia de impedancias) se obtienen dos ecuaciones: una para la calibración del convertidor A/D que muestrea la tensión proveniente del circuito de control de tensión del potencióstato (Ecuación 36) y la otra para la calibración del convertidor A/D correspondiente a la tensión generada por el circuito de medida de corriente (Ecuación 37).

$$y = A_{ADCv} \cdot x + B_{ADCv} \quad \text{Ecuación 36}$$

Donde:

- y: valores de la tensión proveniente del circuito de control de tensión del potencióstato
- x: valores digitales leídos del convertidor A/D de tensión
- A_{ADCv} : pendiente de la recta
- B_{ADCv} : ordenada en el origen

$$y = A_{\text{ADCI}} \cdot x + B_{\text{ADCI}} \quad \text{Ecuación 37}$$

Donde:

- y: valores de la tensión proveniente del circuito de medida de corriente del potencióstato
- x: valores digitales leídos del convertidor A/D de tensión
- A_{ADCI} : pendiente de la recta
- B_{ADCI} : ordenada en el origen

Mediante estas 2 ecuaciones la aplicación podrá calcular, para cada una de las técnicas, los valores de tensión o de corriente en el electrodo de trabajo a partir de los valores digitales leídos de los convertidores A/D correspondientes. Dado que las ecuaciones se han construido a partir de datos experimentales en su expresión ya están contempladas las desviaciones debidas a la inexactitud en los valores de algunas de las resistencias utilizadas y a la tolerancia de los distintos componentes (resistencias y amplificadores operacionales).

Una vez concluida la calibración, los valores de las constantes A_{DAC} , B_{DAC} , A_{ADCV} , B_{ADCV} , A_{ADCI} y B_{ADCI} para cada una de las técnicas son almacenados en un fichero de calibración (*.cal) que se lee cada vez que se abre la aplicación. Cada equipo dispone de un fichero de calibración propio.

4.1.4. Configuración de los electrodos de trabajo de voltametría

El Equipo Electrónico de Medida permite llevar a cabo ensayos de voltametría en hasta 10 electrodos de trabajo. Dichos electrodos están conectados al potencióstato mediante un bloque de multiplexación que permite seleccionar el electrodo de trabajo sobre el que se va a llevar a cabo la medida. Dicho bloque se controla desde el μC mediante líneas de salida digitales. En los ensayos de voltametría cíclica el usuario puede seleccionar desde la aplicación sobre qué electrodo de trabajo quiere realizar la medida y en voltametría de pulsos se pueden secuenciar ensayos sobre varios electrodos. En el frontal del equipo hay dos conectores DIN de 6 polos (referencia 593-0600 de DELTRON). El polo central de cada uno de los conectores corresponde al contraelectrodo mientras que los otros 5 polos corresponden a los electrodos de trabajo. En total 10 electrodos de trabajo (5 por cada conector).

Mediante esta opción de configuración (ver Figura 61) el usuario puede establecer el número de electrodos de trabajo que se van a utilizar, su nombre y la posición que les corresponden en los conectores.

CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA

Puerto Serie Resistencias Shunt Calibración

Electrodos VC Configuración Frecuencias Varios

ELECTRODOS

Diagram showing 10 electrode positions (1-10) with labels 'CE' for positions 3 and 6.

Nombre	Posición
Ir	1
Rh	2
Pt	4
Au	5
Ag	6
Co	7
Cu	9
Ni	10

AÑADIR

ELIMINAR

ACEPTAR CANCELAR

Figura 61. Formulario configuración de los electrodos de trabajo para voltametría

Para incorporar un nuevo electrodo de trabajo a la lista el usuario debe hacer clic en el botón AÑADIR. La aplicación le solicita el nombre del nuevo electrodo y a continuación su posición en los conectores. Para eliminar un electrodo basta con seleccionarlo y hacer clic en el botón de ELIMINAR.

4.1.5. Configuración del espectro de frecuencias para espectroscopía de impedancias

Mediante esta opción de configuración se establece el espectro de frecuencia sobre el que se hace la medida de impedancia. El usuario establece la frecuencia inferior del espectro, la frecuencia superior y el número de frecuencias que desea incluir en el espectro. Además establece si la distribución de las frecuencias a lo largo del espectro debe ser lineal o logarítmica (ver Figura 62).

CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA

Puerto Serie Resistencias Shunt Calibración

Electrodos VC **Configuración Frecuencias** Varios

Número	Frec. Teórica
1	1,00
2	1,28
3	1,65
4	2,11
5	2,71
6	3,47
7	4,46
8	5,72
9	7,34
10	9,41
11	12,07
12	15,49
13	19,87
14	25,49
15	32,70
16	41,95
17	53,82
18	69,05

Frecuencia inferior: 1

Frecuencia superior: 200000

Número de puntos: 50

ESCALA

☐ Lineal

☒ Logarítmica

CALCULAR

ACEPTAR CANCELAR

Figura 62. Formulario de configuración del espectro de frecuencias para espectroscopía de impedancias

Por último, el usuario pulsa el botón de CALCULAR y la aplicación establece el valor de las frecuencias a lo largo del rango configurado.

4.1.6. Otras configuraciones

La aplicación permite también la configuración del símbolo que se va a utilizar para representar la separación entre el valor entero y los decimales ("," o ";") tanto para la generación de ficheros como para la lectura de los mismos. Esta opción se agregó a la aplicación con el fin de facilitar la compatibilidad de los datos generados con otros programas y con cualquier configuración del sistema operativo relacionada con el separado decimal.

4.1.7. Almacenamiento de los datos de configuración

Los datos de la configuración se almacenan en dos ficheros:

- Fichero `config.ini`: en este fichero se almacenan todos los datos que son comunes a todos los equipos, es decir: puerto de comunicación serie, número de frecuencias del espectro, valores de las frecuencias del espectro, número de electrodos de trabajo para voltametría, nombre y posición de los electrodos de trabajo, separador decimal para escritura y separador decimal para lectura.
- Ficheros `*.cal`: se trata de los ficheros de calibración. Cada equipo tiene su propio fichero de calibración. En él se incluyen datos específicos de cada equipo como los coeficientes de las rectas de calibración y los valores de las resistencias de shunt del circuito de medida de corriente.

Cada vez que se arranca la aplicación aparece una ventana en la que se solicita al usuario que identifica con qué Equipo Electrónico de Medida se van a realizar las medidas (los Equipos Electrónico de Medida fabricados hasta el momento se han identificado con números del 1 al 4). Cuando el usuario selecciona el número del Equipo Electrónico de Medida la aplicación lee el fichero de calibración correspondiente a ese equipo y a continuación lee el fichero de configuración.

4.2. Módulo de Voltametría de pulsos

La Figura 63 muestra el formulario correspondiente a la técnica de voltametría. En dicho formulario se pueden llevar a cabo las siguientes acciones:

- Generar o modificar patrones: mediante esta opción se accede a un formulario en el que se pueden confeccionar o editar los patrones correspondientes a las señales de tensión que se van a aplicar al electrodo de trabajo.

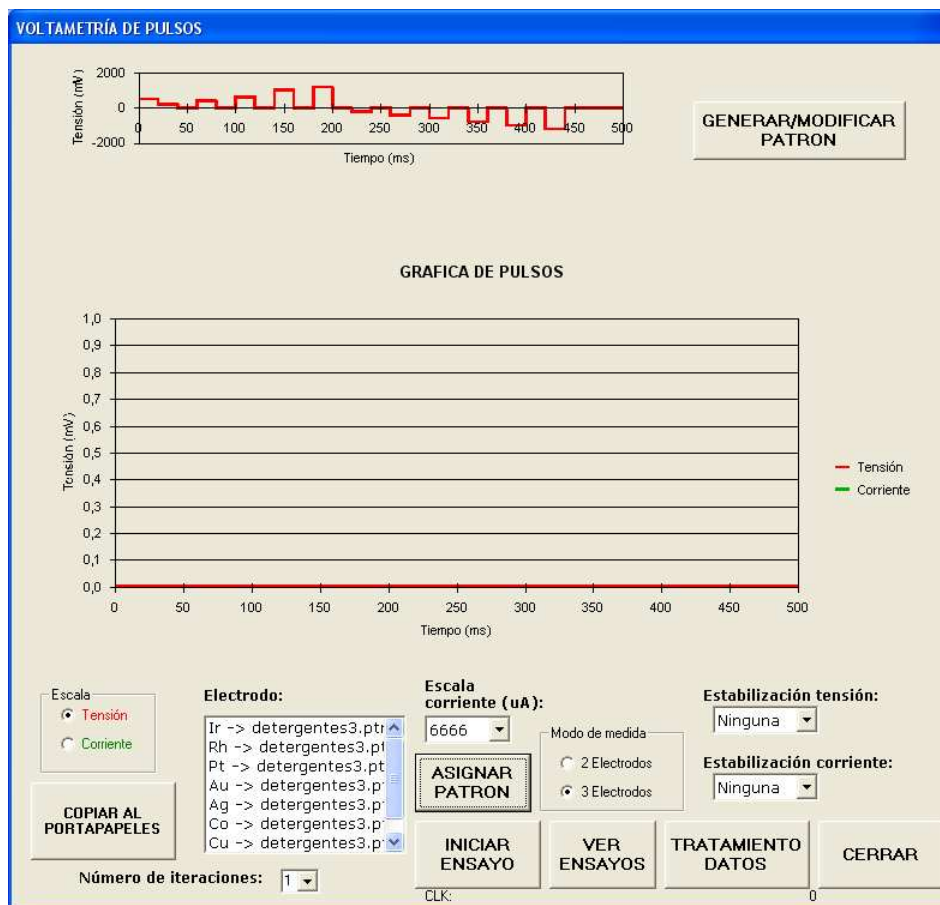


Figura 63. Formulario de voltametría de pulsos

- Asignar un determinado patrón a cada uno de los electrodos: esta asignación se puede llevar a cabo de forma individualizada o en grupo. Es decir, se puede asignar un patrón diferente a cada uno de los electrodos.
- Configurar los parámetros básicos del ensayo como la escala de corriente, el modo de trabajo del potencióstato (2 o 3 electrodos) o su nivel de estabilización. También se puede fijar el número de iteraciones, es decir, el número de veces que se va a repetir el ensayo de forma automática.

- Iniciar el ensayo lo que provocará que se realice de forma automática y secuenciada un ensayo de voltametría de pulsos por cada electrodo configurado. Cuando se ha configurado más de una iteración los ensayos se repetirán el número de veces fijado por el usuario.
- Visualizar en una gráfica las señales de tensión y corriente en el electrodo de trabajo. Una vez visualizada la gráfica también se puede copiar al portapapeles.
- Llevar a cabo el tratamiento de los datos recogidos: mediante esta opción el usuario accede a un formulario en el cual se pueden hacer una serie de operaciones sobre los datos recogidos durante los ensayos de voltametría de pulsos (visualizar gráficamente los datos, eliminar parte de los datos, realizar promedios sobre los datos, agrupar los datos en ficheros para su posterior tratamiento estadístico y otros).

4.2.1. Generación de patrones

Cuando se selecciona la opción GENERAR/MODIFICAR PATRON se abre el formulario (ver Figura 64)

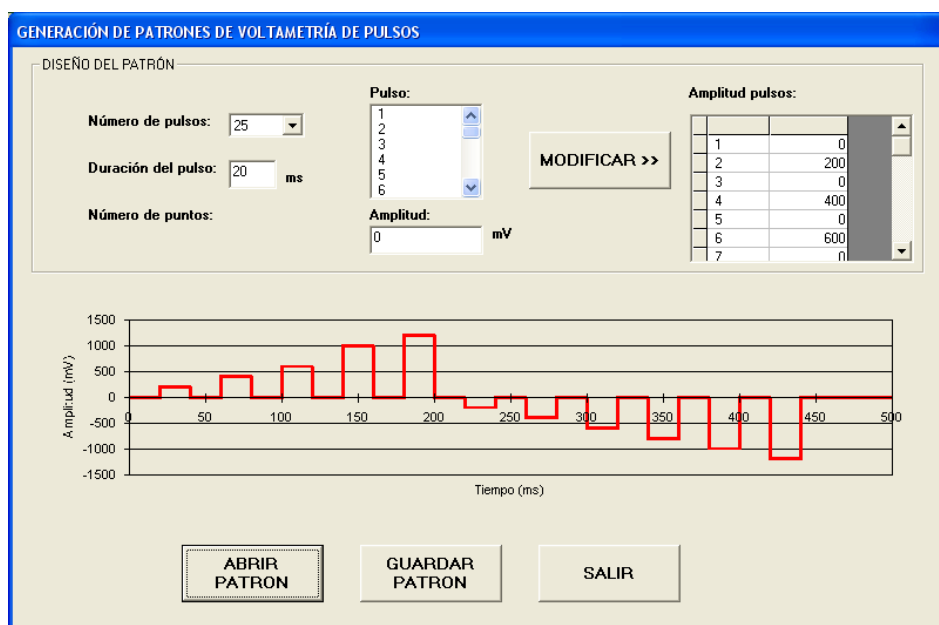


Figura 64. Formulario de generación de patrones de pulsos

Mediante el patrón de pulsos se establece cuál va a ser la amplitud y la duración de los pulsos que se van a aplicar a los distintos electrodos en cada ensayo. El sistema diseñado permite generar un patrón de hasta 50 pulsos, con amplitudes entre -2 V y +2 V y una duración que puede ir desde 1 ms hasta 800 ms.

Para construir el patrón el usuario debe en primer lugar establecer el número de pulsos y su duración. A continuación debe asignar a cada uno de los pulsos la amplitud deseada. La forma de onda del tren de pulsos se visualiza mientras éste se está construyendo. Una vez finalizada la construcción del patrón, éste puede guardarse. Los ficheros de patrón se almacenan con la extensión .ptr. Este formulario también permite abrir patrones creados anteriormente y modificarlos.

4.2.2. *Ensayo de voltametría de pulsos*

Antes de iniciar un ensayo de voltametría es necesario configurarlo. Para ello, se deben llevar a cabo las siguientes tareas:

- Asignar a cada uno de los electrodos configurados un fichero de patrón.
- Seleccionar la escala de corriente más adecuada para el ensayo. Se debe escoger una escala de corriente lo suficientemente grande como para que ninguna de las señales recogidas supere los límites de dicha escala; Pero, por otro lado, seleccionar una escala demasiado grande para medir señales pequeñas implicaría que dichas señales se verían muy afectadas por el ruido del sistema y su representación digital tendría menos resolución. Por tanto, es importante seleccionar la mayor de las escalas que permita obtener señales que no saturen la entrada del convertidor A/D. Por lo general, se hace una serie de ensayos previos para establecer la escala de corriente óptima para cada experiencia. En ocasiones puede ser necesario el cambio de escala al pasar de un ensayo a otro cuando se producen cambios en la amplitud máxima de las señales de corriente.
- Establecer el modo de trabajo del potencióstato: normalmente se debe trabajar a 3 electrodos ya que es el modo en el que mejor reproducibilidad se puede obtener y permite centrar el estudio en los fenómenos que ocurren en el electrodo de trabajo. Sin embargo, cuando por diversos motivos resulte imposible la utilización de un electrodo de referencia las medidas pueden hacerse en modo de 2 electrodos.
- Configurar el modo de estabilización del potencióstato: si al realizar las medidas se observan oscilaciones en la señal de corriente y/o en la señal

de tensión puede ser necesario activar el sistema de estabilización del potencióstato. Existen tres niveles de estabilización para el circuito de control de tensión y otros tres para el circuito de medida de corriente. La estabilización afectará ligeramente a las medidas que se lleven a cabo (deformará ligeramente las señales de tensión y corriente), por tanto, en la medida de lo posible debe evitarse; y si se aplica debe hacerse con el nivel más bajo posible. Por otro lado, una vez se ha establecido un nivel de estabilización, éste debe mantenerse para toda la experiencia de forma que todos los ensayos se vean afectados de la misma forma.

- Establecer el número de iteraciones, es decir, el número de veces que se va a repetir el ensayo. En principio si se selecciona una sola iteración se llevará a cabo una medida de voltametría de pulsos para cada electrodo de trabajo. Si se configuran más iteraciones, cuando concluya la medida del último electrodo de la lista se iniciará automáticamente de nuevo el proceso de medida para todos los electrodos. Este bucle se repetirá hasta que se haya completado el número de iteraciones establecido.

Una vez configurado el ensayo el usuario puede dar comienzo al mismo haciendo clic en el botón de INICIAR ENSAYO. En primer lugar la aplicación solicita al usuario que introduzca el nombre del fichero en el que se van a guardar los datos recogidos.

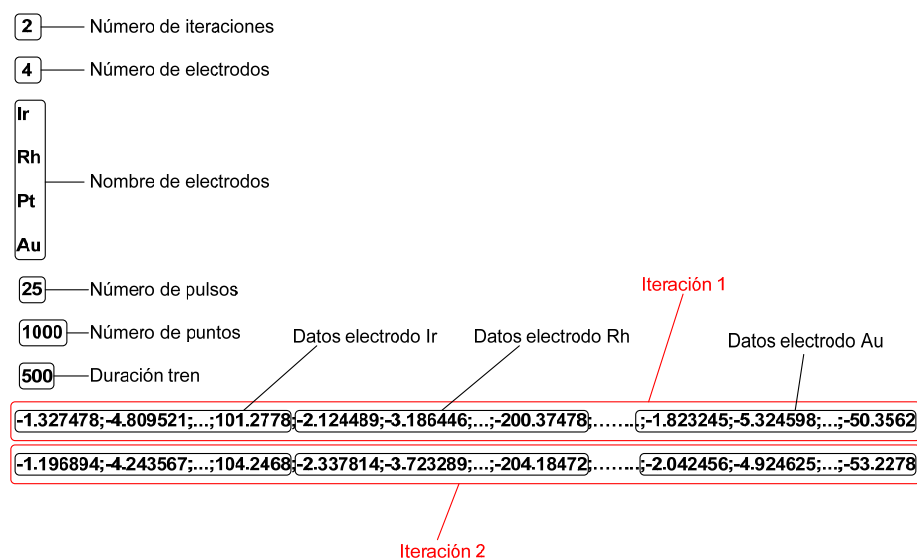


Figura 65. Estructura del fichero de ensayo de voltametría de pulsos

Los ficheros correspondientes a los ensayos de voltametría de pulsos se guardan con la extensión .vpd. En la Figura 65 se muestra el formato de los ficheros .vpd. En las primeras líneas se almacenan los datos del número de iteraciones, el número de electrodos, los nombres de cada uno de los electrodos, el número de pulsos, el número de puntos con el que se describen las señales de corriente y la duración del tren de pulsos. A continuación se escriben los datos correspondientes a la evolución temporal de las señales de corriente muestreadas en μA . Cada línea de datos se corresponde con una iteración. En primer lugar se escriben los datos correspondientes al primer electrodo. El número de valores que se escriben para cada electrodo coincide con el número de puntos.

A continuación la aplicación prepara los datos que debe enviar al Equipo Electrónico de Medida para que éste lleve a cabo el ensayo sobre el primer electrodo de la lista. Para ello, la aplicación debe leer el fichero de patrón asignado al electrodo y extraer la información necesaria:

- Número de puntos que se van a utilizar para generar/muestrear las señales. Este número debe establecerse de forma que todos los pulsos que componen el tren tengan el mismo número de pulsos. El número de puntos máximo que permite el sistema es 1000. Por tanto, el número máximo de puntos por pulso será el que aparece en la Ecuación 38 (donde $\text{fix}()$ es una función que redondea un valor real al valor entero inmediatamente inferior eliminando la parte decimal).

$$Puntos\ por\ pulso = \text{fix}\left(\frac{1000}{Número\ pulsos}\right) \quad \text{Ecuación 38}$$

A partir del valor del número de pulsos y del número de puntos por pulso es fácil calcular el número de puntos necesarios para representar el tren de pulsos completo (ver Ecuación 39)

$$Número\ puntos = Número\ pulsos * Puntos\ por\ pulso \quad \text{Ecuación 39}$$

- Tiempo de muestreo: una vez establecido el número de puntos por pulso y conocida la duración de cada pulso (dato incluido en el fichero de patrón), el tiempo de muestreo T_s (es decir, el ritmo al que se deben

generar/muestrear las señales) se obtiene fácilmente aplicando la Ecuación 40.

$$T_s = \frac{\text{Duración pulso}}{\text{Puntos por pulso}} \quad \text{Ecuación 40}$$

La aplicación debe generar la información que necesita el Equipo Electrónico de Medida para implementar correctamente el retardo correspondiente al T_s . Como se vio en el apartado 3.6 de este capítulo el tiempo de muestreo para la técnica de voltametría se implementa mediante un bucle de retardo cuya ejecución requiere un cierto número de ciclos máquinas, número que depende de los valores iniciales de los registros W10 y W4 según lo establecido en la Ecuación 33. La aplicación debe calcular cuál debe ser el valor inicial de dichos registros de modo que el tiempo de ejecución del bucle se corresponda con T_s . Teniendo en cuenta que para voltametría la CPU del μC funciona siempre a la máxima frecuencia de trabajo (es decir que $F_{CY}=16$ MHz) y aplicando la Ecuación 33 se pueden establecer de forma teórica las expresiones algebraicas de los valores iniciales de W10 y W4 (CONTADORH y CONTADORL respectivamente). A partir de las expresiones de la Ecuación 41 y de la Ecuación 42 la aplicación calcula los valores que debe enviar al Equipo Electrónico de Medida.

$$CONTADORH = \text{fix}\left(\frac{16 \cdot 10^6 * T_s - 14}{327684}\right) \quad \text{Ecuación 41}$$

$$CONTADORL = \frac{\left(\frac{16 \cdot 10^6 * T_s - 14}{327684} - CONTADORH\right) * 327684}{5} \quad \text{Ecuación 42}$$

- Configuración de los relés de selección de la resistencia de shunt en el circuito de medida de corriente. El valor de escala de corriente establecida por el usuario, permite determinar cuáles son la(s) resistencia(s) que deben seleccionarse. A partir de este dato y la información de la Tabla 15 la aplicación puede establecer cuáles de las

líneas de salida del μC deben activarse para seleccionar dicha(s) resistencia(s).

- Configuración de los relés de selección del electrodo de trabajo. De igual modo, para establecer la configuración de las líneas de salida del μC que controlan los 5 relés que seleccionan el electrodo de trabajo la aplicación hace uso de la información contenida en la Tabla 14.
- Valores digitales correspondientes a la evolución temporal del tren de pulsos que debe aplicarse al electrodo de trabajo. Estos son los datos que el μC debe enviar al convertidor D/A para que éste genere la señal analógica correspondiente al tren de pulsos. Para calcular cada uno de estos valores digitales la aplicación lee las amplitudes de los pulsos establecidas por el usuario en el fichero de patrón. Para cada uno de los puntos, el valor de amplitud es convertido al dato digital correspondiente aplicando la ecuación de la recta de calibración correspondiente (ver Ecuación 35). De esta forma la amplitud de la señal aplicada al electrodo de trabajo después de hacer la conversión D/A coincidirá con la amplitud establecida por el usuario en el patrón.

Además la aplicación establece la configuración de los relés que permiten configurar la técnica de voltametría (Tabla 9) y el modo de trabajo (Tabla 10) y el nivel de estabilización (Tabla 11 y Tabla 13) del potencióstato.

Con toda esta información se construye la trama que debe enviarse al Equipo Electrónico de Medida para que éste pueda llevar a cabo el ensayo de voltametría para el primero de los electrodos de trabajo. El formato de esta trama viene descrito en la Figura 53.

Una vez realizado el ensayo el Equipo Electrónico de Medida envía al PC una trama de respuesta que contiene los datos de las medidas de tensión y corriente en el electrodo de trabajo (ver Figura 55). La aplicación recibe la trama, comprueba el encabezamiento de la misma y lee los valores digitales correspondientes al muestreo de las señales de tensión y corriente. A las muestras de la señal de tensión se les aplica la ecuación de la recta de calibración de conversión A/D de tensión (Ecuación 36); de esta forma se obtienen los valores de la evolución temporal de la tensión analógica aplicada al electrodo de trabajo. En cuanto a las muestras de la señal de corriente en primer lugar se les aplica la ecuación de la recta de calibración de conversión A/D de corriente (Ecuación 37) y, a continuación, los valores resultantes se dividen por el valor de la resistencia de shunt correspondiente a la escala de corriente seleccionada; obteniendo así los valores analógicos de la corriente que circula

por el electrodo de trabajo. Los datos son representados en la gráfica de pulsos (ver Figura 63, en rojo la señal de tensión y en verde la señal de corriente) y los valores de la evolución temporal de la señal de corriente son almacenados en el fichero de datos de voltametría de pulsos tal y como se indica en la Figura 65 (los datos de la tensión aplicada no se utilizan en el tratamiento estadístico posterior, solo se recogen para confirmar que la señal de tensión se está generado correctamente).

Una vez finalizado el proceso de medida sobre el primer electrodo de trabajo, la aplicación procede a repetir los mismos pasos para el siguiente electrodo de la lista. Los datos recogidos para el nuevo electrodo son almacenados en el fichero de datos a continuación de los del primero (sin cambiar de línea). El proceso se repite para cada uno de los electrodos de lista.

Cuando se llega al último electrodo, la aplicación comprueba si se ha configurado más de una iteración. Si es así se vuelve a recorrer la lista de electrodos repitiendo todos los pasos del proceso descrito. Los datos de todos los electrodos para la nueva iteración se almacenan en una nueva línea del fichero de datos de voltametría de pulsos.

4.2.3. Tratamiento de datos de voltametría de pulsos

En los ensayos de voltametría de pulsos se recogen los datos de la evolución temporal de la corriente que circula por electrodo de trabajo al aplicarle una serie de pulsos de tensión. El objetivo final es utilizar estos datos para generar modelos que permitan agrupar las muestras en base a alguna de sus características o predecir el valor de alguno de sus parámetros fisicoquímicos. Dado que en este tipo de ensayos normalmente el número de variables dependientes (valores de corriente) es mayor que el número de muestras la generación de estos modelos de predicción debe realizarse mediante herramientas de análisis multivariante. Sin embargo, antes de proceder al estudio multivariante de los datos de las medidas es posible que se deba realizar un tratamiento previo de los mismos que puede consistir en visualizarlos, promediarlos o generar los ficheros de datos que se vayan a utilizar en el análisis posterior.

La aplicación permite llevar a cabo las siguientes operaciones sobre los datos de voltametría de pulsos:

- Visualizar los datos de los ensayos.
- Eliminar datos de iteraciones de un fichero de ensayo.
- Eliminar datos de electrodos de un fichero de ensayo.
- Eliminar datos de pulsos de un fichero de ensayo.
- Promediar datos de iteraciones de un fichero de ensayo.
- Promediar datos de electrodos de un fichero de ensayo.
- Restar datos de un fichero de ensayo a otro.
- Promediar datos de varios ficheros de ensayo para generar un nuevo fichero de ensayo.
- Agrupar varios ficheros de ensayo para generar un fichero de experiencia.
- Visualizar los datos de un fichero de experiencia.

Visualización de ensayos de voltametría de pulsos

Mediante esta opción el usuario puede visualizar gráficamente las señales de corriente recogidas en los ensayos de voltametría de pulsos. Se pueden visualizar hasta 100 ficheros de ensayo, cada uno de los cuales puede contener hasta 5 iteraciones realizadas en hasta 10 electrodos.

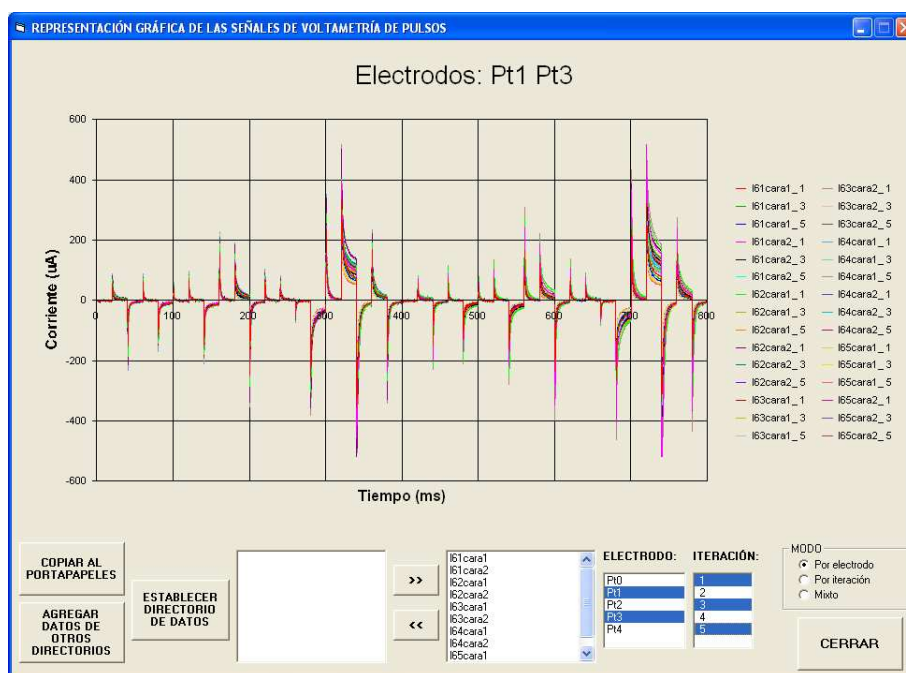


Figura 66. Formulario de visualización de ensayos de voltametría de pulsos

Solo se pueden visualizar simultáneamente ensayos que tenga el mismo número de iteraciones y de electrodos. Una vez elegidos los ficheros de ensayo que se quiere visualizar, el usuario puede seleccionar qué iteraciones y qué electrodos deben representarse (ver Figura 66). Existen tres modos de visualización:

- Por electrodo: en este caso las iteraciones se representan unas superpuestas sobre las otras mientras que los electrodos se representan uno a continuación del otro.
- Por iteración: en este caso son los electrodos los que se representan unos superpuestos sobre los otros mientras que las iteraciones se visualizan una a continuación de la otra.
- Mixto: en el modo mixto tanto las iteraciones como los electrodos se representan unos superpuestos sobre los otros.

Eliminación de iteraciones

En algunos ensayos puede resultar interesante llevar a cabo varias iteraciones (repeticiones sucesivas de un mismo ensayo) para luego promediarlas. Sin embargo, si en cada iteración se producen modificaciones sobre la superficie del electrodo es posible que interese centrar el estudio en la primera iteración, ó si en algunas de las iteraciones se ha producido algún error en la medida es posible que se desee eliminar dicha iteración antes de llevar a cabo el promediado de las mismas. Mediante este formulario el usuario puede eliminar las iteraciones que no desee incluir en el estudio posterior.

El usuario debe en primer lugar seleccionar los ficheros de los que se quieren eliminar iteraciones. Solo se permite la selección de ficheros que tengan el mismo número de iteraciones y de electrodos. A continuación, en la lista de iteraciones, debe seleccionar únicamente aquélla(s) que desee mantener. Por último, el usuario debe hacer clic en el botón GUARDAR DATOS para que la aplicación sobrescriba los ficheros seleccionados incluyendo únicamente los datos correspondientes a las iteraciones elegidas.

Eliminación de electrodos

La selección de electrodos puede hacerse en el momento de generar el fichero de experiencia. Sin embargo, en ocasiones puede ser interesante seleccionar electrodos en los ficheros de ensayo con el fin de hacer estudios previos o comparaciones con otros ensayos. El proceso que se debe seguir es análogo al

descrito para la eliminación de iteraciones: selección de los ficheros de ensayos, elección de los electrodos que se quiere mantener y almacenamiento de los datos seleccionados en los ficheros de ensayo.

Eliminación de pulsos

Al igual que ocurre con los electrodos, la selección de pulsos puede hacerse en el momento de generar el fichero de experiencia, sin embargo, en determinadas circunstancias (estudios comparativos o particulares de algunos ensayos) puede resultar interesante realizarla sobre los ficheros de ensayo. De nuevo el proceso es el mismo: se seleccionan los ficheros de ensayos de los que se desea eliminar algunos pulsos, se eligen los pulsos que se desean mantener y se hace clic en el botón de GUARDAR DATOS para almacenar los datos elegidos en los ficheros de ensayo.

Evaluación algebraica de la dispersión de las señales

A la hora de realizar promedios es importante utilizar únicamente aquellos datos que no presenten una dispersión grande con respecto a los demás. En algunos casos estas dispersiones pueden apreciarse visualmente sobre una representación gráfica cuando alguna de las curvas está claramente alejada del resto. Sin embargo, las curvas correspondientes a las medidas de voltametría se componen de una gran cantidad de puntos (se pueden tener 1000 puntos por sensor, lo que para 8 sensores daría un total de 8000 puntos), y, por lo tanto, puede resultar difícil evaluar de forma visual cuál es la dispersión existente entre ellas. Por ello, se ha diseñado un método algebraico para evaluar la dispersión de las señales que permite establecer de forma numérica qué señales se alejan más del resto. Para explicar el método diseñado se consideran 4 señales de voltametría de pulsos A, B, C y D, tal y como se representan en la Figura 67.

Cada una de estas señales se representa mediante N puntos que corresponden a la evolución temporal de corriente que circula por el electrodo de trabajo. En primer lugar para cada uno de los N puntos se calcula la mediana de las 4 señales. Para ello en primer lugar se ordenan los 4 valores en orden ascendente. Si, como es el caso del ejemplo, el número de valores es par, la mediana se obtiene calculando la media aritmética de los dos valores centrales. Si el número de valores es impar la mediana se corresponde con el valor central de los datos ordenados.

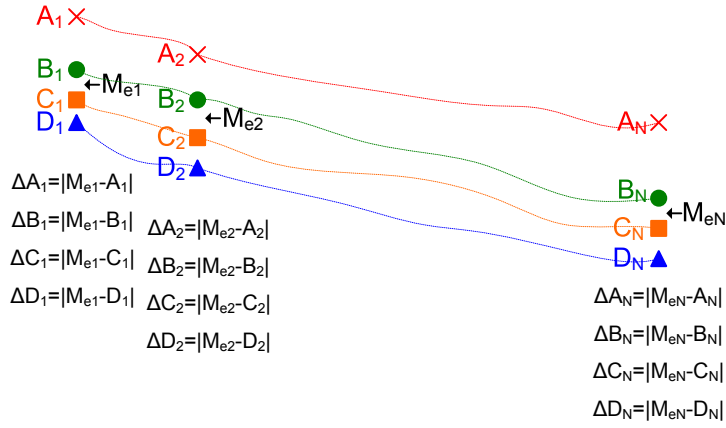


Figura 67. Evaluación de la dispersión en señales de voltametría de pulsos

A continuación se calcula para cada uno de los puntos de cada una de las señales la diferencia entre el valor medido y el valor de la mediana. Seguidamente, para cada señal se suman los N valores absolutos de las diferencias y se divide por el número de puntos. El valor resultante se define como la Dispersión Media con respecto a la Mediana (DMM) y da una indicación numérica de cuán alejada está una gráfica de las demás considerando todos los puntos que la describen. En la Ecuación 43 se muestra la expresión de la Dispersión Media con respecto a la Mediana de la señal A (DMM_A).

$$DMM_A = \frac{\sum_{i=1}^N |M_{ei} - A_i|}{N} \quad \text{Ecuación 43}$$

Evaluando el valor de la DMM para cada una de las señales que se desea promediar se puede establecer algebraicamente si alguna de las señales presenta una dispersión excesiva y conviene no incluirla en el cálculo del promedio.

Promediado de iteraciones

Las iteraciones son repeticiones sucesivas de las medidas sobre una misma muestra (es decir, entre iteración e iteración los electrodos no se limpian). Pueden utilizarse para estudiar los cambios producidos en el electrodo de trabajo al realizar sobre él medidas sucesivas. Pero normalmente el objetivo de realizar iteraciones es llevar a cabo un promedio de los valores obtenidos con el

fin de atenuar el efecto de las desviaciones que se puedan producir en cada una de ellas. De hecho en los estudios estadísticos a cada muestra debe corresponderle un único conjunto de medidas y por tanto antes de generar el fichero de experiencia es necesario o bien promediar las iteraciones o quedarse con una sola de ellas. El formulario de promediado de iteraciones permite realizar el promediado de las interacciones. El usuario debe seleccionar los ficheros correspondientes a los ensayos sobre los que desea realizar el promedio de las iteraciones. Solo se pueden seleccionar ficheros que tengan el mismo número de iteraciones y de electrodos. La aplicación analiza cada uno de esos ficheros y muestra una lista con las iteraciones disponibles y calcula la DMM de cada una de ellas. Basándose en los valores las DMM el usuario puede establecer para cada fichero de forma independiente cuáles son las iteraciones que quiere incluir en el proceso de promediado. Una vez revisadas y elegidas las iteraciones de cada uno de los ficheros seleccionados, el usuario debe hacer clic en el botón de PROMEDIAR ITERACIONES. La aplicación recorrerá todos los ficheros seleccionados calculando el promedio de las iteraciones elegidas y sobrescribiendo los valores obtenidos en el fichero.

Promediado de electrodos

Generalmente los electrodos de trabajo que se incluyen en una lengua electrónica son de distinta naturaleza y cada uno de ellos aporta información específica. Sin embargo, en los ensayos de voltametría de pulsos el contacto del electrodo con la muestra es un punto crucial puesto que la señal de corriente está directamente relacionada con la superficie de la interfaz electro-electrolito. Para alguna experiencia sobre muestras sólidas se pueden dar casos de problemas de contacto que pueden dar lugar a errores en la medida. Una posible solución para detectar y reducir estos errores de medida es construir lenguas electrónicas que contengan varios electrodos de trabajo de la misma naturaleza. En un mismo ensayo se llevarán a cabo medidas sobre todos ellos, y para el posterior estudio estadístico se promediarán las medidas eliminando aquellas que presenten una dispersión excesiva. El formulario de promediado de electrodos permite llevar a cabo el promediado de los datos correspondientes a electrodos de trabajo de la misma naturaleza. El proceso que se debe seguir es análogo al descrito para el promediado de iteraciones. El usuario selecciona los ficheros sobre los que quiere realizar el promediado de los electrodos y la aplicación analiza los datos y calcula para cada fichero la DMM de cada una de las señales correspondiente a cada uno de los electrodos. En base a los valores del DMM, el usuario selecciona para cada fichero qué electrodos quiere incluir

en el promediado y por último, da la orden de llevar a cabo el proceso. Los nuevos datos promediados sobrescriben a los originales.

Eliminación de la base

Normalmente las señales de voltametría se analizan sobre los valores absolutos obtenidos. Sin embargo, en ensayos en los que se quiera discriminar bajas concentraciones de un producto que ha sido añadido a una disolución base, puede ser más interesante analizar las diferencias de las señales con respecto a la base (concentración cero). En estos casos en lugar de trabajar con los valores de voltametría de pulsos, tal y como los genera el sistema, se pueden restar los valores de la señal de corriente para la disolución base a los valores de las señales de las disoluciones compuestas por la base más el producto.

El formulario de eliminación de base permite llevar a cabo esta operación. En primer lugar el usuario debe seleccionar los ficheros sobre los que quiere restar los datos de la base y a continuación establece el fichero que se debe restar. Cuando la operación es confirmada, la aplicación resta para cada punto de los ficheros seleccionados el valor correspondiente del fichero base sobrescribiendo los datos de los ficheros originales.

Promediado de repeticiones

Se denomina repetición de un ensayo al acto de volver a medir una misma muestra después de haber limpiado los electrodos. Esto implica que los electrodos deben ser extraídos de la muestra, limpiados (mediante el procedimiento descrito en el apartado 5.3 de este capítulo) y vueltos a colocar en la muestra (a diferencia de las iteraciones en las cuales los ensayos se repiten de forma sucesiva sin tocar los electrodos). Una de las principales dificultades de las técnicas voltamétricas es obtener una buena reproducibilidad cuando se repite un ensayo en condiciones aparentemente iguales. Esta dificultad se deriva de los siguientes hechos:

- La señal de corriente que se mide en voltametría está estrechamente relacionada con la superficie de contacto entre el electrodo y la muestra. En ocasiones no es fácil conseguir una superficie de contacto idéntica en todos los ensayos, fundamentalmente cuando se trabaja con muestras sólidas.

- Durante los ensayos de voltametría se pueden producir reacciones que modifiquen la composición de la superficie del electrodo; de ahí que sea necesario limpiar dicha superficie antes de iniciar un nuevo ensayo. Una limpieza incompleta o defectuosa podría redundar en un empeoramiento de la reproducibilidad. Por otro lado, si para la limpieza se requiere un proceso de lijado es posible que la superficie del electrodo se vea modificada lo que provocaría desviaciones en la medida.

Por todo ello, cuando hacemos un único ensayo sobre una determinada muestra es difícil garantizar que la medida realizada sea correcta, ya que es difícil de saber a priori si el electrodo está limpio y si está haciendo buen contacto con la muestra. Es, por tanto, necesario repetir varias veces la medida sobre una misma muestra y comprobar que no existe excesiva desviación en dichas repeticiones. Se necesitan al menos 3 repeticiones con un nivel de dispersión bajo para poder considerar que las medidas son correctas. Una vez identificadas las repeticiones que presentan un nivel de dispersión aceptable, ya se puede efectuar el promediado de las mismas para obtener los datos con los que se llevará a cabo el estudio estadístico.

El formulario de promediado de repeticiones permite ambas cosas, la selección de aquellas repeticiones que presenta una dispersión aceptable y el promediado de las repeticiones seleccionadas. Para ello, el usuario debe elegir las repeticiones que desea sean analizadas. Los ficheros de ensayo correspondientes a las repeticiones deben contener únicamente una iteración. A continuación la aplicación calcula la DMM de cada una de las repeticiones y la muestra en pantalla para que el usuario pueda seleccionar aquellas que presentan un grado de dispersión aceptable. El grado de dispersión puede variar en función del tipo de experiencia; por ejemplo las experiencias con muestras sólidas presentan un grado de dispersión mayor que aquellas en las que las medidas se realizan sobre líquidos. Por último, el usuario debe hacer clic en el botón de PROMEDIAR REPETICIONES e introducir el nombre del fichero en el que se van a guardar los datos. La aplicación realiza el promedio de las señales correspondientes a las repeticiones seleccionadas y almacena los valores resultantes en un fichero con la misma estructura que los ficheros de experiencia sobre los que se ha realizado el promedio (ver Figura 65).

Generación del fichero de experiencia

El objetivo final de la aplicación de la voltametría de pulsos en el campo de las lenguas electrónicas es la generación de modelos predictivos cualitativos o cuantitativos que permitan determinar parámetros fisicoquímicos de las muestras a partir de los valores de la evolución de temporal de la corriente en el electrodo de trabajo. Para ello, se diseñan experiencias que consisten en llevar a cabo una serie de ensayos sobre muestras controladas. Los datos recogidos durante estos ensayos son posteriormente procesados mediante algún tipo de herramienta multivariante (PCA, PLS, redes neuronales). Para poder realizar los estudios multivariante es necesario agrupar los datos recogidos en ficheros que puedan ser leídos por estas herramientas. El formulario de generación de fichero de experiencia posibilita la generación de estos ficheros, permitiendo además la selección de alguno de los datos que se incluyen.

Por otro lado, la técnica de voltametría consiste en muestrear los valores de la evolución temporal de la corriente que circula por el electrodo de trabajo cuando se le aplican una serie de pulsos de tensión. Para tener una buena resolución en las medidas el sistema ha sido diseñado para que recoja hasta 1000 valores de corriente por electrodo. Si tenemos en cuenta que algunas experiencias se llevan a cabo utilizando 8 electrodos de trabajo nos podemos encontrar con ficheros de experiencia que contienen 8000 variables independientes. El manejo de ficheros de experiencia de gran tamaño puede dificultar y ralentizar el análisis multivariante. Además la información aportada por un número tan elevado de variables independientes en ocasiones puede ser redundante. En el apartado 6 de la Introducción se comentó que algunos autores han trabajado en la reducción del número de datos de voltametría de pulsos basándose en diversas técnicas. En la presente tesis se ha evaluado la posibilidad de llevar a cabo una reducción de los datos de voltametría de pulsos mediante dos metodologías:

- Por un lado, la aplicación permite seleccionar el número de puntos que se quieren incluir en el fichero de experiencia. Por ejemplo si, para una experiencia de 8 electrodos, en lugar de tomar todos los puntos se toman 1 de cada 5 puntos la cantidad de variables independientes de reduciría de 8000 a 1600. La aplicación se ha diseñado para permitir al usuario reducir el número de puntos que se incluyen en el fichero de experiencia. Por ejemplo, se puede generar un fichero de experiencia en el que solo se incluya 1 de cada 2 puntos que contengan los ficheros de ensayo. Las

opciones disponibles son desde incluir todos los puntos hasta incluir 1 de cada 10 puntos (pasando por el resto de combinaciones).

- Por otro lado, la aplicación puede llevar a cabo una reducción de los datos mediante una aproximación polinómica de orden 4 de las señales de corriente correspondientes a cada uno de los pulsos. Cuando se genera el fichero de experiencia, además del fichero con los datos de la evolución temporal de la señal de corriente, la aplicación puede crear un fichero que contenga los coeficientes correspondientes a los polinomios que aproximan cada uno de los pulsos.

El algoritmo implementado consiste en aproximar un polinomio $P(x)$ de grado 4 (ver Ecuación 44) al conjunto n de pares $(x_0; y_0)$, $(x_1; y_1)$, ..., $(x_{n-1}; y_{n-1})$ que describen la evolución temporal de la señal para un pulso (siendo x_i el valor del tiempo e y_i el valor de la corriente).

$$P(x) = a_0 + a_1 \cdot x + a_2 \cdot x^2 + a_3 \cdot x^3 + a_4 \cdot x^4 \quad \text{Ecuación 44}$$

Para ello, se define S como la suma cuadrática de las diferencias entre el valor real y_i y el valor aproximado mediante el polinomio $P(x_i)$ para cada una de muestras i (ver Ecuación 45).

$$S = \sum_{i=0}^{n-1} (P(x_i) - y_i)^2 = \sum_{i=0}^{n-1} (a_0 + a_1 \cdot x_i + a_2 \cdot x_i^2 + a_3 \cdot x_i^3 + a_4 \cdot x_i^4 - y_i)^2 \quad \text{Ecuación 45}$$

Un criterio para aproximar el comportamiento del polinomio al comportamiento de las muestras de la señal de corriente (y_i) es obtener los valores de los coeficientes a_0 , a_1 , a_2 , a_3 y a_4 que minimizan el valor de S . Ello implica encontrar los valores de los coeficientes que anulan las derivadas parciales de S con respecto a cada uno de ellos, tal y como se indica en la Ecuación 46.

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial S}{\partial a_0} &= 2 \cdot \sum_{i=0}^{n-1} (a_0 + a_1 \cdot x_i + a_2 \cdot x_i^2 + a_3 \cdot x_i^3 + a_4 \cdot x_i^4 - y_i) = 0 \\
 \frac{\partial S}{\partial a_1} &= 2 \cdot \sum_{i=0}^{n-1} (a_0 + a_1 \cdot x_i + a_2 \cdot x_i^2 + a_3 \cdot x_i^3 + a_4 \cdot x_i^4 - y_i) \cdot x_i = 0 \\
 \frac{\partial S}{\partial a_2} &= 2 \cdot \sum_{i=0}^{n-1} (a_0 + a_1 \cdot x_i + a_2 \cdot x_i^2 + a_3 \cdot x_i^3 + a_4 \cdot x_i^4 - y_i) \cdot x_i^2 = 0 \\
 \frac{\partial S}{\partial a_3} &= 2 \cdot \sum_{i=0}^{n-1} (a_0 + a_1 \cdot x_i + a_2 \cdot x_i^2 + a_3 \cdot x_i^3 + a_4 \cdot x_i^4 - y_i) \cdot x_i^3 = 0 \\
 \frac{\partial S}{\partial a_4} &= 2 \cdot \sum_{i=0}^{n-1} (a_0 + a_1 \cdot x_i + a_2 \cdot x_i^2 + a_3 \cdot x_i^3 + a_4 \cdot x_i^4 - y_i) \cdot x_i^4 = 0
 \end{aligned} \tag{Ecuación 46}$$

Definimos las expresiones s_k y t_k tal y como aparecen en la Ecuación 47 y la Ecuación 48.

$$s_k = \sum_{i=0}^{n-1} x_i^k \quad (k = 0, \dots, 8) \tag{Ecuación 47}$$

$$t_k = \sum_{i=0}^{n-1} x_i^k \cdot y_i \quad (k = 0, \dots, 4) \tag{Ecuación 48}$$

Eliminando el valor 2 que aparece multiplicando los sumatorios y agrupando términos las expresiones de la Ecuación 46 se convierten en un sistema de 5 ecuaciones con 5 incógnitas tal y como se refleja en la Ecuación 49.

$$\begin{aligned}
 a_0 \cdot s_0 + a_1 \cdot s_1 + a_2 \cdot s_2 + a_3 \cdot s_3 + a_4 \cdot s_4 &= t_0 \\
 a_0 \cdot s_1 + a_1 \cdot s_2 + a_2 \cdot s_3 + a_3 \cdot s_4 + a_4 \cdot s_5 &= t_1 \\
 a_0 \cdot s_2 + a_1 \cdot s_3 + a_2 \cdot s_4 + a_3 \cdot s_5 + a_4 \cdot s_6 &= t_2 \\
 a_0 \cdot s_3 + a_1 \cdot s_4 + a_2 \cdot s_5 + a_3 \cdot s_6 + a_4 \cdot s_7 &= t_3 \\
 a_0 \cdot s_4 + a_1 \cdot s_5 + a_2 \cdot s_6 + a_3 \cdot s_7 + a_4 \cdot s_8 &= t_4
 \end{aligned} \tag{Ecuación 49}$$

La aplicación calcula los términos s_k y t_k a partir de los valores y_i y x_i y resuelve el sistema de ecuaciones utilizando la regla de Cramer.

Tras obtener el valor de los coeficientes a_0 , a_1 , a_2 , a_3 y a_4 para el primer pulso, el proceso se repite para cada uno los pulsos y los valores de los

coeficientes van almacenándose en el fichero de coeficientes. Una vez recorridos los pulsos de todos los electrodos para cada uno de los ficheros seleccionados se obtiene un fichero de datos que puede ser utilizado para llevar a cabo el análisis multivariante.

Este método plantea dos ventajas:

- Por una parte, reduce el número de variables, por ejemplo en una experiencia en la que se aplique un patrón de 20 pulsos el número de puntos por electrodos sería de 1000. Sin embargo para esa misma experiencia el número de coeficientes sería de 100 por electrodo.
- Por otro lado, la aproximación polinómica de 4º grado permite el filtrado del ruido de las señales de corriente.

Sin embargo, cuando la señal de corriente correspondiente a un pulso presenta un comportamiento especial (por ejemplo debido a la presencia de varios procesos redox) la aproximación mediante un polinomio de orden 4 puede no resultar adecuada o suficiente.

En la Figura 68 se muestra un ejemplo de aproximación polinómica para una señal de 4 pulsos. En ella se puede apreciar cómo la aproximación puede resultar más o menos exacta en función de la forma de onda del pulso.

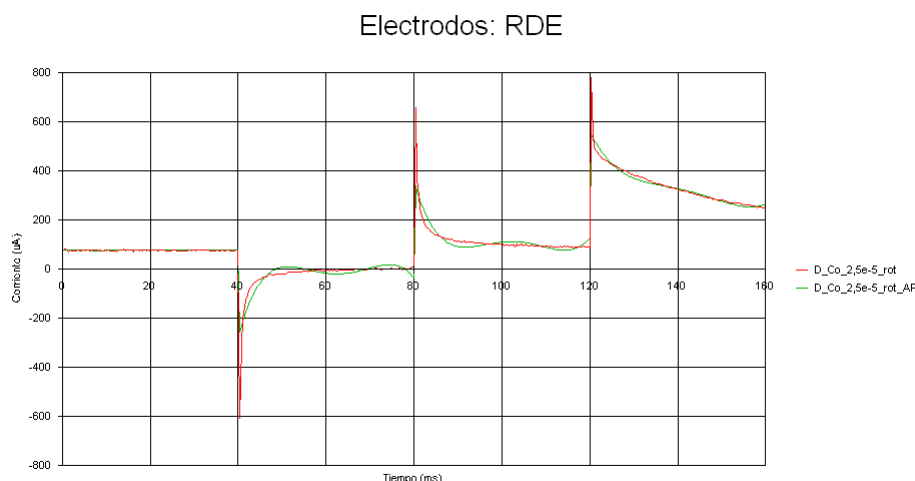


Figura 68. Aproximación polinómica de orden 4

Figura 69. Formulario de generación de fichero de experiencia

Para generar el fichero de datos de experiencia (ver Figura 69) en primer lugar el usuario debe seleccionar los ficheros de ensayo que quiere incluir en el fichero de experiencia. A continuación puede establecer cuáles de los electrodos y cuáles de los pulsos desea incluir en el estudio seleccionándolos de las correspondientes listas. Además puede configurar qué cantidad de puntos se deben incluir en el fichero de datos (todos los puntos, 1 de cada 2, 1 de cada 3, ..., 1 de cada 10). Y, por último, establece si quiere que se genere el fichero de coeficientes de la aproximación polinómica. Una vez configuradas todas estas opciones el usuario confirma la operación haciendo clic en el botón de GENERAR FICHERO DE DATOS DE EXPERIENCIA. La aplicación genera los siguientes ficheros:

- Fichero de datos (*.vpt): se trata del fichero que incluye los valores correspondientes a la evolución temporal de la señal de corriente en los electrodos de trabajo. Este fichero incorpora una línea por cada fichero de ensayo que se haya incluido en el estudio. En cada línea se almacenan los valores correspondientes a la evolución temporal de la corriente en cada uno de los electrodos de trabajo seleccionados (ver Figura 70).

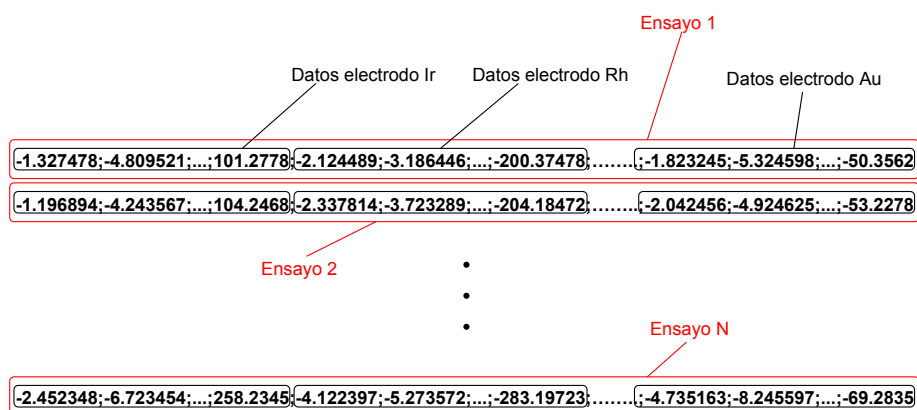


Figura 70. Estructura del fichero de datos de experiencia de voltametría de pulsos

- Fichero de coeficientes (*.vap): en este fichero se incluyen los coeficientes de la aproximación polinómica de orden 4 para cada uno de los pulsos de cada uno de los electrodos de trabajo. El fichero dispone de una línea por ensayo, y en cada línea hay 5 coeficientes (a_0 , a_1 , a_2 , a_3 y a_4) por cada uno de los pulsos (ver Figura 71). Este fichero solo se genera si el usuario activa la opción correspondiente.

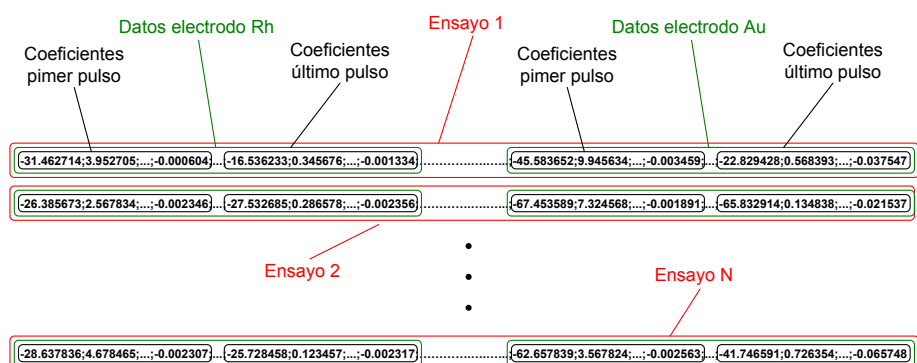


Figura 71. Estructura del fichero de coeficientes de aproximación polinómica de experiencia de voltametría de pulsos

- Fichero de nombres de ensayos (*.vpn): este fichero contiene el nombre de los ficheros correspondientes a los ensayos que se han incluido en el fichero de datos de experiencia. Los nombres de los ficheros se

almacenan en el mismo orden en el que se han escrito los datos de los ensayos.

- Fichero de información de experiencia (*.vpi): este fichero incluye información general sobre la configuración de la experiencia como número de electrodos, nombre de los electrodos, número de puntos utilizados para describir la evolución temporal de las señales de corriente, número de pulsos y duración del tren de pulsos.

Visualización del fichero de experiencia

La Figura 72 muestra el formulario de visualización de los datos contenidos en el fichero de experiencia. El usuario puede ver todos los datos simultáneamente o limitar la visualización a los datos correspondientes a los ensayos y electrodos seleccionados. También se pueden visualizar las gráficas correspondientes a los polinomios de aproximación polinómica.

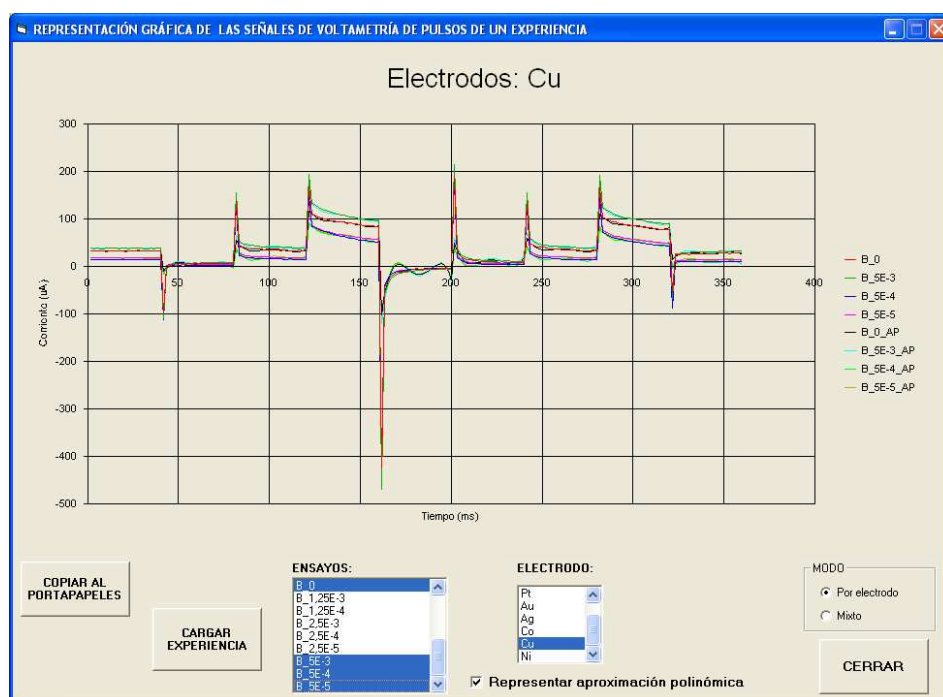


Figura 72. Formulario de visualización de datos de experiencia

4.3. Módulo de Voltametría cíclica

Este módulo permite la realización de ensayos de voltametría cíclica. Como se vio en el apartado 2.4 de la Introducción, en los ensayos de voltametría cíclica el electrodo de trabajo es sometido a una tensión triangular y se miden las señales de tensión y corriente. El resultado de la medida de voltametría cíclica se refleja en un voltagrama en el que la corriente medida se representa en función de la tensión aplicada. La Figura 73 muestra el formulario de voltametría cíclica.

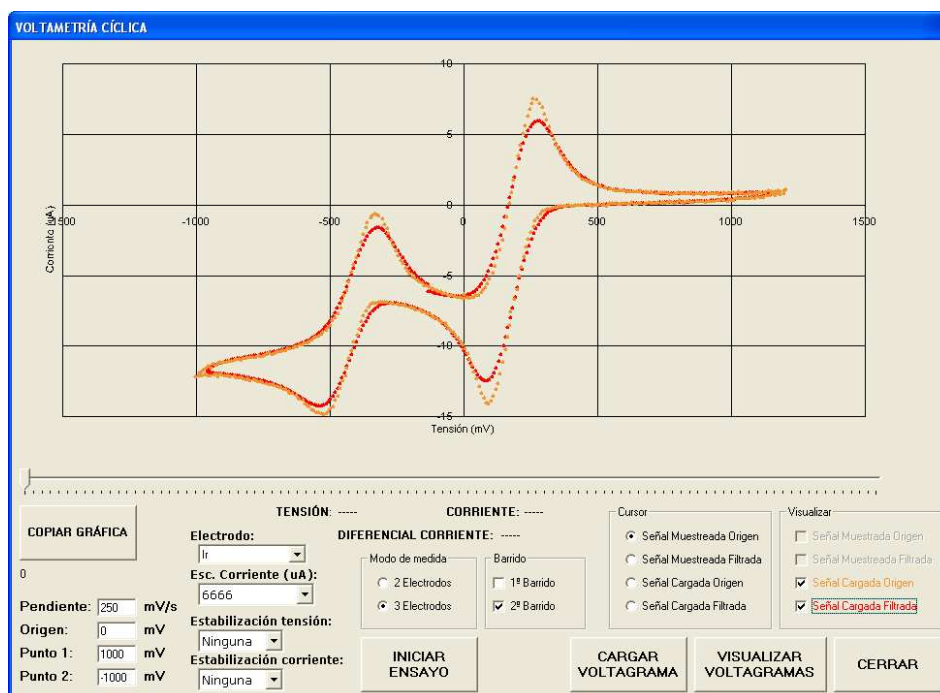


Figura 73. Formulario de voltametría cíclica

4.3.1. Ensayo de voltametría cíclica

Antes de iniciar un ensayo debe llevarse a cabo la configuración del mismo que consiste en los siguientes pasos:

- Configuración de la señal triangular que se debe aplicar: en la Figura 74 aparece la forma de onda de la señal triangular que se genera indicando

los parámetros que deben ser configurados por el usuario. En ocasiones resulta conveniente analizar el comportamiento electroquímico del electrodo de trabajo cuando el sistema ya tiene una cierta inercia; por este motivo la señal generada incluye dos barridos idénticos.

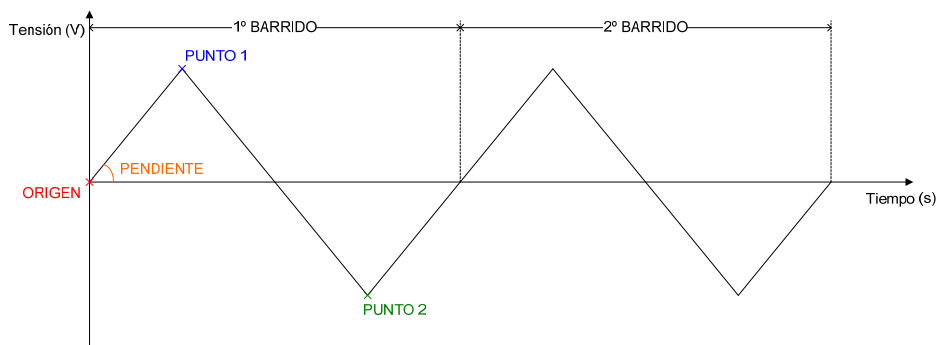


Figura 74. Señal triangular aplicada en los ensayos de voltametría cíclica

Los parámetros que deben ser configurados por el usuario son:

- o Pendiente (velocidad de barrido): indica el ritmo al que se incrementa/decrementa la señal de tensión y se expresa en mV/s. El usuario puede establecer una velocidad de barrido que varíe entre 2 mV/s y 10000 mV/s.
- o Origen: es el valor con el que se inicia la señal triangular y puede tomar cualquier valor entre -2 V y +2 V, aunque normalmente su valor es siempre 0.
- o Punto 1: es el primer valor máximo que alcanza la señal desde el origen. La aplicación permite que este valor pueda tomar cualquier valor entre -2 V y +2 V.
- o Punto 2: se trata del segundo valor mínimo que alcanza la señal antes de volver al valor origen y puede ser configurado a cualquier valor que esté en el rango [-2 V; +2 V].
- Selección del electrodo de trabajo: cada ensayo de voltametría cíclica se realiza sobre un solo electrodo de trabajo. Antes de iniciar el ensayo el usuario debe seleccionar el electrodo.
- Elección de la escala de corriente: este parámetro es importante porque una escala de corriente inadecuada podría dar lugar a la saturación de la señal de corriente (si se elige una escala demasiado pequeña) o a un

exceso de ruido en la señal de corriente (si la escala seleccionada es demasiado grande para el nivel de la señal que se está midiendo).

- Configuración de la estabilización de tensión y corriente del potenciómetro: cuando se detectan inestabilidades en las señales de tensión o de corriente, éstas pueden corregirse aplicando la estabilización que corresponda. Se debe procurar siempre reducir al máximo el nivel de estabilización ya que éste introduce cierta deformación en las señales medidas.

Una vez configurado el ensayo el usuario puede dar comienzo al mismo haciendo clic en el botón de INICIAR ENSAYO. La aplicación solicita al usuario que introduzca el nombre del fichero en el que se van a almacenar los resultados del ensayo. Los ficheros de ensayo de voltametría cíclica se almacenan con la extensión .vtg y su estructura es la que se muestra en la Figura 75. Cada línea de dicho fichero incluye los datos de uno de los 1000 puntos. En primer lugar se escribe el valor de la tensión en mV y a continuación el valor de la corriente en μA .

Tensión Corriente

Datos Punto 1

1.623047	-0.207289
2.656250	-0.120238
7.821533	1.533733
•	
•	
•	
-10.773930	0.053864
-5.608643	0.576171
0.589844	-0.120238

Datos Punto 1000

Figura 75. Estructura del fichero de ensayo de voltametría cíclica

Seguidamente la aplicación prepara la información que debe transmitir al Equipo Electrónico de Medida para que éste pueda llevar a cabo el ensayo:

- Número de puntos: el número de puntos es siempre 1000. Dado que siempre se realizan dos barridos se reservan 500 puntos para el primer barrido y los otros 500 para el segundo.

- Tiempo de muestreo: para determinar el tiempo de muestreo en primer lugar la aplicación calcula el tiempo que dura un barrido de la señal triangular $T_{poBarrido}$ utilizando la expresión de la Ecuación 50

$$T_{poBarrido} = \frac{|V_{ORIGEN} - V_{PUNTO1}| + |V_{PUNTO1} - V_{PUNTO2}| + |V_{PUNTO2} - V_{ORIGEN}|}{PENDIENTE} \quad \text{Ecuación 50}$$

A partir del tiempo de barrido, el valor del tiempo de muestro T_s se deduce fácilmente aplicando la Ecuación 51.

$$T_s = \frac{T_{poBarrido}}{500} \quad \text{Ecuación 51}$$

El objetivo es obtener los valores iniciales de los registros W10 y W4 mediante los cuales el μC del Equipo Electrónico de Medida implementa el bucle de retardo que establece el tiempo de muestreo. Dado que para las técnicas voltamétricas el μC funciona siempre a la máxima frecuencia de trabajo de la CPU ($F_{CY}=16$ MHz) dichos valores iniciales (CONTADORH y CONTADORL) pueden calcularse aplicando la Ecuación 41 y la Ecuación 42.

- Configuración de los relés de selección de la resistencia de shunt en el circuito de medida de corriente, de selección del electrodo de trabajo y de configuración del modo de trabajo y nivel de estabilización del potencióstato. Dicha información se obtiene, tal y como se explica en el 4.2.2 de este capítulo, a partir de la Tabla 15 (selección resistencia de shunt), de la Tabla 14 (selección del electrodo de trabajo), de la Tabla 10 (modo de trabajo del potencióstato) y de la Tabla 11 y de la Tabla 13 (nivel de estabilización del potencióstato).
- Valores digitales correspondientes a la evolución temporal de la señal triangular. El cálculo se lleva a cabo para el primer barrido y la aplicación envía dos veces los mismos valores. Cada barrido se puede dividir en tres tramos: el primer tramo va desde el origen hasta el punto 1, el segundo tramo del punto 1 al punto 2 y el tercer tramo del punto 2 al origen de nuevo. El primer paso es establecer cuántos puntos debe haber en cada uno de los tramos NT1, NT2 y NT3. Para que los 500 puntos se repartan de forma homogénea a lo largo del tiempo de barrido los valores de NT1,

NT2 y NT3 se calculan mediante las expresiones de la Ecuación 52, la Ecuación 53 y Ecuación 54.

$$NT1 = \text{round} \left(\frac{\left(\frac{|V_{ORIGEN} - V_{PUNTO1}| \cdot 500}{PENDIENTE} \right)}{TpoBarrido} \right) \quad \text{Ecuación 52}$$

$$NT2 = \text{round} \left(\frac{\left(\frac{|V_{PUNTO1} - V_{PUNTO2}| \cdot 500}{PENDIENTE} \right)}{TpoBarrido} \right) \quad \text{Ecuación 53}$$

$$NT1 = \text{round} \left(\frac{\left(\frac{|V_{PUNTO2} - V_{ORIGEN}| \cdot 500}{PENDIENTE} \right)}{TpoBarrido} \right) \quad \text{Ecuación 54}$$

A continuación la aplicación calcula para cada tramo los valores de la amplitud de la señal $V_T(i)$ aplicando las expresiones de la Ecuación 55 (primer tramo), la Ecuación 56 (segundo tramo) y la Ecuación 57 (tercer tramo).

$$V_T(i) = V_{ORIGEN} + \frac{i \cdot (V_{PUNTO1} - V_{ORIGEN})}{NT1} \quad i = 0 \dots NT1 - 1 \quad \text{Ecuación 55}$$

$$V_T(i) = V_{PUNTO1} + \frac{i \cdot (V_{PUNTO2} - V_{PUNTO1})}{NT2} \quad i = NT1 \dots NT2 - 1 \quad \text{Ecuación 56}$$

$$V_T(i) = V_{PUNTO2} + \frac{i \cdot (V_{ORIGEN} - V_{PUNTO2})}{NT3} \quad i = NT2 \dots NT3 - 1 \quad \text{Ecuación 57}$$

Por último aplicando la ecuación de calibración del convertidor D/A (Ecuación 35) a los valores de $V_T(i)$ la aplicación obtiene los valores digitales que deben escribirse a la entrada de convertidor D/A para que la señal triangular aplicada al electrodo de trabajo se corresponda exactamente con la establecida por el usuario.

Una vez recogida toda esta información, la aplicación la transmite al Equipo Electrónico de Medida (con el formato descrito en la Figura 53), el cual aplica

la señal triangular al electrodo de trabajo seleccionado y mide las señales de tensión y corriente en dicho electrodo. Cuando el ensayo concluye el Equipo Electrónico de Medida transmite al PC una trama de respuesta (ver Figura 55) en la que se incluyen los valores digitales capturados de los convertidores A/D de tensión y corriente. Aplicando a los datos de tensión recibidos la ecuación de la recta de calibración del proceso de conversión A/D para la señal de tensión (Ecuación 36), la aplicación obtiene los valores de la evolución temporal de la amplitud de la señal de tensión en el electrodo de trabajo. Los datos de las muestras de corriente son igualmente procesados mediante la ecuación de la recta de calibración para el proceso de conversión A/D de corriente (Ecuación 37); y a continuación los valores resultantes son divididos por la resistencia de shunt correspondiente a la escala de corriente seleccionada. De esta forma se obtienen los valores de la evolución temporal de la señal de corriente en el electrodo de trabajo. Todos estos valores son almacenados en el fichero de datos de voltametría cíclica y reflejados en un voltagrama en el que el valor de la corriente que circula por electrodo de trabajo se representa en función de la tensión aplicada al mismo.

4.3.2. Visualización de los datos de voltametría cíclica

Los datos de voltametría cíclica se visualizan en forma de voltagrama. Los voltagramas permiten extraer determinadas conclusiones sobre el ensayo realizado como por ejemplo la tensión de oxidación o reducción de un compuesto. Para poder extraer dichas conclusiones se debe cumplir que la gráfica del voltagrama sea lo más nítida posible con el fin de permitir la identificación exacta de las tensiones en las que se producen los fenómenos electroquímicos de interés. En ocasiones las señales tanto de tensión como de corriente son medidas con cierto nivel de ruido lo que dificulta la determinación de estas tensiones características. Por ello, la aplicación incorpora un sistema de filtrado que permite eliminar el ruido de dichas señales, sin alterar su comportamiento a bajas frecuencias que en definitiva es el que aporta la información relevante.

Para el diseño del filtro se recurrió al *Toolbox Filter Design* de Matlab tal y como se muestra en la Figura 76. Las características del filtro diseñado son:

- Tipo de filtro: Filtro FIR pasa-bajo.
- Orden del filtro: 29
- Especificaciones en frecuencia: dado que la frecuencia de las señales de tensión y corriente dependen de la configuración de la señal triangular

(tensiones de origen, del punto 1 y del punto 2 y velocidad de barrido) el filtro no podía diseñarse para una frecuencia de corte en concreto. Se diseñó el filtro de forma que todas las frecuencias ubicadas más allá de la banda correspondiente al primer quinto del espectro de la señal fueran atenuadas 80dB. En cuanto al comportamiento de la ganancia del filtro en la banda pasante es el que aparece en la Figura 76.

Con este filtro se consigue eliminar las componentes de alta frecuencia de las señales (que corresponden al ruido) manteniendo intactas las de baja frecuencia (que contienen la información relevante para el estudio del voltagrama).

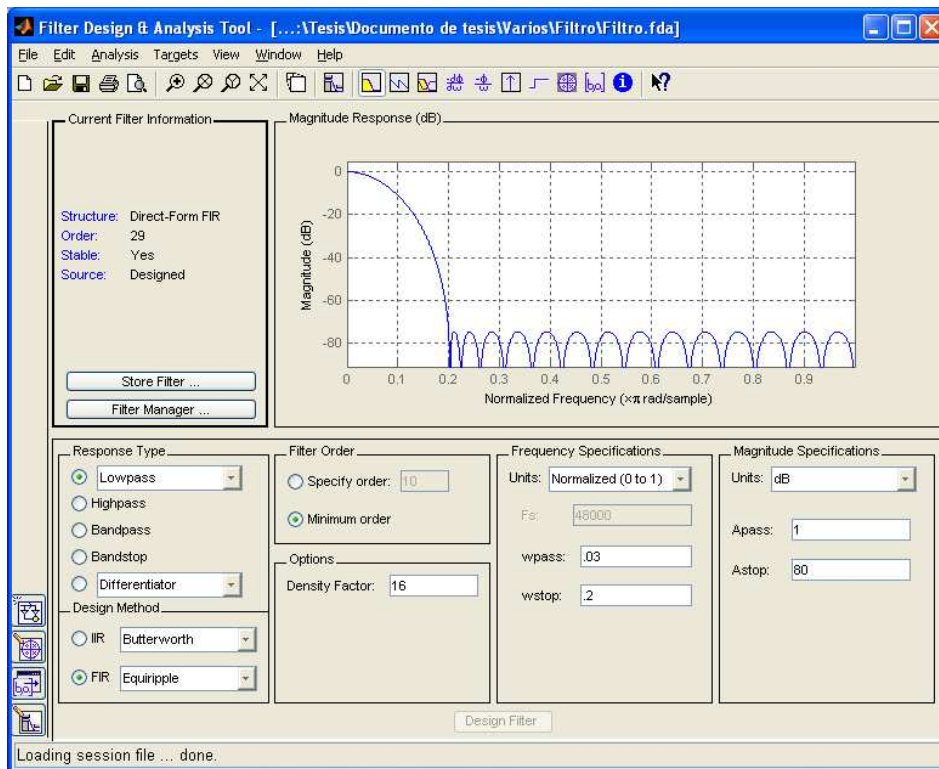


Figura 76. Diseño del filtro para la visualización de los voltagramas de voltimetría cíclica

Una vez diseñado el filtro, Matlab genera los 30 coeficientes $b_0, b_1, \dots, b_{29}$ correspondientes al filtro de orden 29 a partir de los cuales se puede aplicar el algoritmo de filtrado a las señales de tensión y corriente. Si consideramos que

$x(i)$ son los valores de la evolución temporal de la señal que se quieren filtrar e $y(i)$ son los valores de la evolución temporal de la señal filtrada el algoritmo de filtrado viene dado por la Ecuación 58.

$$y(n) = \sum_{i=0}^{29} b_i \cdot x(n-i) \quad n = 0 \dots 999 \quad \text{Ecuación 58}$$

En principio, tal y como está planteado este algoritmo, para el cálculo del valor filtrado correspondiente a una determinada muestra se requieren los 29 valores anteriores de la muestra. Ello supone que para el cálculo del valor filtrado de las primeras 29 muestras faltarían datos. Dado que la señal triangular aplicada parte del origen y vuelve al origen en el algoritmo del filtro diseñado se incluyó un mecanismo por el cual las muestras que faltan en la parte inicial de las señales se toman de la parte final. En la Figura 77 se muestra el voltograma correspondiente a la señal muestreada original (color naranja) superpuesto con el voltograma de la señal filtrada (color rojo). Como puede apreciarse el nivel de ruido en la señal filtrada es prácticamente nulo y la tendencia de ambos voltagramas es muy parecida lo que prueba la eficacia del filtro diseñado.

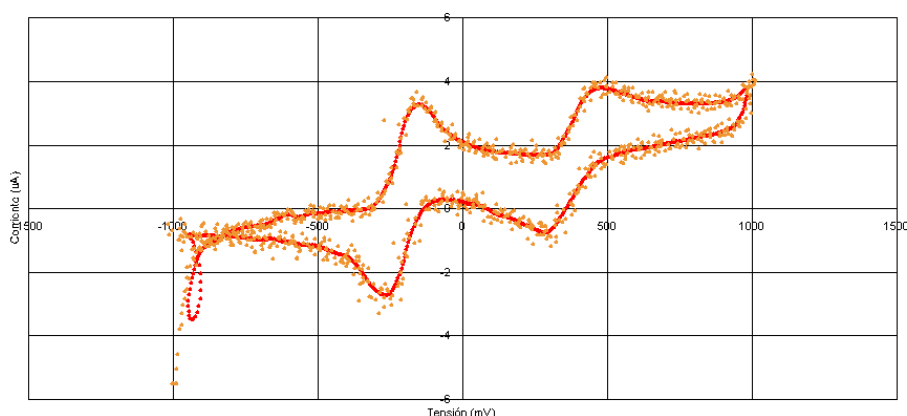


Figura 77. Aplicación del filtro a una señal de voltametría cíclica

Una vez visualizado el voltograma con nitidez se puede proceder a la tarea de identificar los valores tensión a los que se producen determinados fenómenos de interés. Por ejemplo, cuando se detecta un pico de corriente en un voltograma puede resultar interesante conocer con exactitud el valor de tensión

correspondiente. Para ello, es necesario detectar de forma precisa el punto en el que la corriente alcanza su máximo. Para facilitar esta tarea se ha implementado una herramienta consiste en un cursor que recorre los 1000 puntos del voltograma. Para cada punto en el que se sitúa el cursor la aplicación muestra los valores de la tensión y la corriente en dicho punto y el valor diferencial de corriente dI. Dicho valor se define en la Ecuación 59, donde I(n) es el valor de la corriente en el punto n. El valor de dI solo está definido para los valores de n de 0 a 998. Cuando n es igual 999 se toma el valor de dI obtenido para n igual a 998.

$$dI(i) = \frac{I(n+1) - I(n)}{I(n)} \quad n = 0 \dots 998 \quad \text{Ecuación 59}$$

El valor de dI indica si la corriente en el voltograma está creciendo (dI positivo) o decreciendo (dI negativo). Teóricamente cuando dI es igual a cero se alcanza un máximo o un mínimo. El valor de dI se visualiza en azul cuando es positivo y en rojo cuando es negativo. De esta forma si recorremos el voltograma con el cursor el usuario podrá identificar los puntos de máximo y mínimo de la corriente simplemente detectando cuando el valor de dI cambia de color.

Los datos de voltametría cíclica se pueden visualizar en dos formularios:

- Formulario de voltametría cíclica (ver Figura 73): en este formulario se visualizan las señales recogidas en el último ensayo realizado y además se permite la visualización de un voltograma almacenado previamente (con objeto de poder comparar). En total se pueden visualizar 4 señales:
 - La señal muestreada origen: se trata de la señal correspondiente al último ensayo sin filtrar.
 - La señal muestreada filtrada: se trata de la señal correspondiente al último ensayo después de aplicarle el filtro.
 - La señal cargada origen: se trata de la señal que ha sido cargada y se muestra sin filtrar.
 - La señal cargada filtrada: se trata de la señal que ha sido cargada y se muestra en este caso filtrada.

El usuario puede seleccionar cuáles de las 4 señales desea que se muestren en la gráfica, y sobre cuál de las señales desea aplicar el cursor para realizar las medidas correspondientes.

En los ensayos de voltametría la aplicación realiza dos barridos. Sin embargo, no siempre interesa visualizar simultáneamente ambos barridos. La aplicación permite la visualización tanto conjunta como individualizada de los barridos.

- Formulario de visualización de voltagramas de voltametría cíclica (ver Figura 78): en este formulario se pueden visualizar hasta 10 señales simultáneamente. Las señales pueden visualizarse tanto filtradas como sin filtrar y el usuario puede elegir a cuál de ellas desea aplicar el cursor. También se puede establecer cuál de los barridos se desea mostrar.

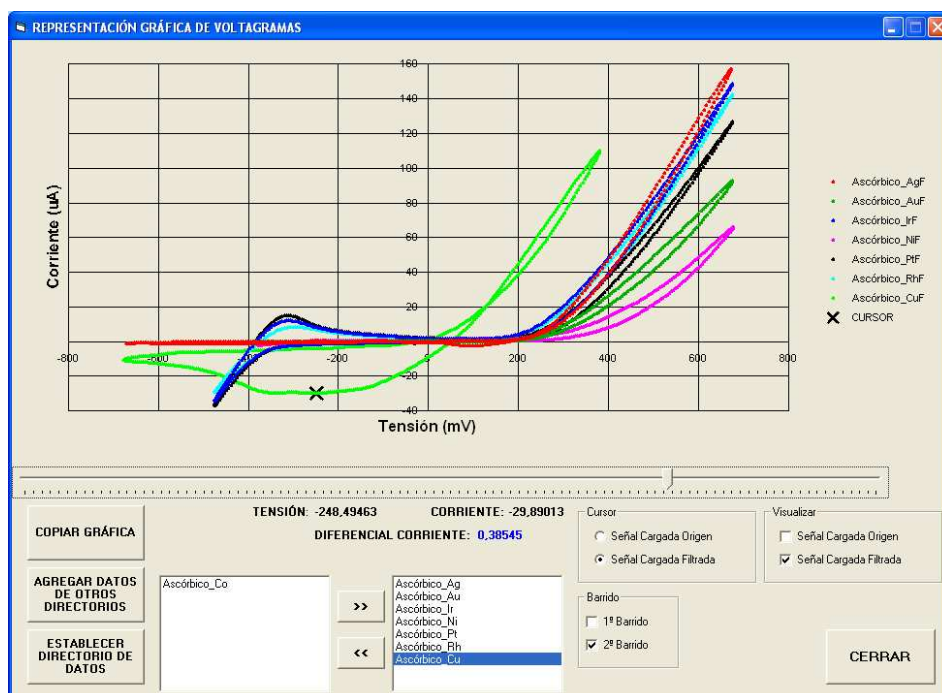


Figura 78. Formulario de visualización de voltagramas de voltametría cíclica

4.4. Módulo de Espectroscopía de Impedancias

En este módulo se procesan los ensayos de espectroscopía de impedancias (ver Figura 79). Se pueden realizar ensayos manuales (medida del módulo y la fase de la impedancia para una sola frecuencia) o análisis espectrales (medida del módulo y la fase de la impedancia para un rango de frecuencias preestablecido).

En el caso de los análisis espectrales los datos son almacenados para su posterior estudio estadístico.

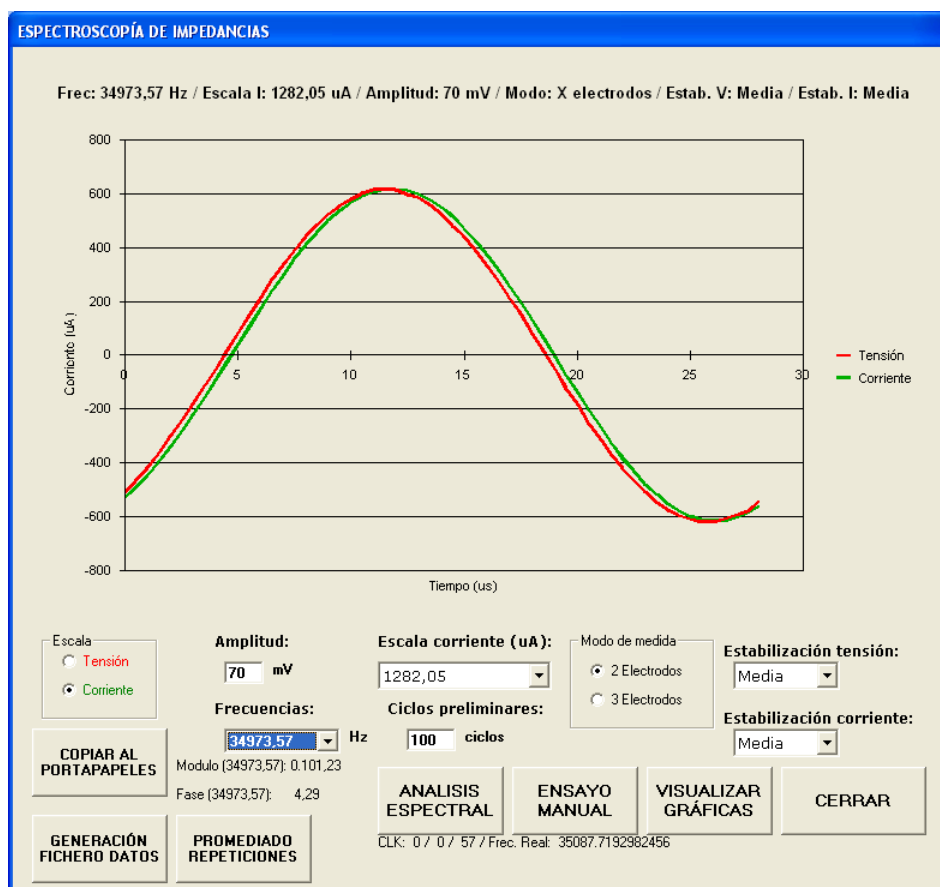


Figura 79. Formulario de espectroscopia de impedancias

4.4.1. Configuración de los ensayos

Antes del inicio de los ensayos el usuario debe llevar a cabo la configuración de los mismos. Para ello se deben establecer los siguientes parámetros de funcionamiento del sistema:

- Selección de la amplitud de la señal senoidal que se aplicará al electrodo de trabajo.
- Selección de la frecuencia del ensayo: esta opción está solo disponible en los ensayos manuales; para los análisis espectrales la aplicación recorre de forma automática el rango de frecuencias establecido.
- Escala de corriente: en el caso de los ensayos manuales el usuario selecciona la escala de corriente antes de iniciar el ensayo mientras que en el caso de los análisis espectrales es la aplicación la que, para cada frecuencia, establece la escala de corriente óptima.
- Número de ciclos preliminares: con el objeto de que el sistema haya alcanzado el estado estacionario en el momento de hacer la medida se pueden aplicar una serie de ciclos preliminares antes de empezar a muestrear las señales de tensión y corriente.
- Modo de trabajo del electrodo (2 o 3 electrodos).
- Estabilización del potencióstato en tensión: mediante esta opción el usuario establece si se quiere habilitar el condensador de compensación del circuito de control de tensión del potencióstato (ver 2.6.1 de este capítulo), y en caso afirmativo establece cuál debe ser el valor de dicho condensador (estabilización débil 22 pF, estabilización media 220 pF y estabilización fuerte 1 nF)
- Estabilización del potencióstato en corriente: en este caso el usuario establece si quiere habilitar el condensador de compensación del circuito de medida de corriente del potencióstato (ver 2.6.2 de este capítulo), fijando cuál debe ser el valor dicho condensador (estabilización débil 22 pF, estabilización media 220 pF y estabilización fuerte 1 nF).

4.4.2. *Ensayo Manual*

Una vez configurado, el ensayo puede iniciarse. En el caso del ensayo manual se genera una señal senoidal con la amplitud y frecuencia configuradas, se aplica dicha señal al electrodo de trabajo y se leen los valores correspondientes a la evolución temporal de las señales de tensión y corriente en él. Dichas señales son mostradas en la gráfica de formulario. Además se calcula el módulo y la fase de la impedancia y se muestran los valores obtenidos. No se almacena ningún dato; este tipo de ensayos normalmente sirven para depurar algún problema o para comprobar que el funcionamiento del sistema es correcto antes de llevar a cabo un análisis espectral.

Antes de iniciar el ensayo la aplicación prepara los datos que deben enviarse al Equipo Electrónico de Medida para que éste lleve a cabo la generación y el muestreo de las señales. Básicamente estos datos son:

- El número de puntos que se van a utilizar para describir la señal senoidal. Este parámetro, junto con el tiempo de muestreo de la señal, se calcula a partir de la frecuencia de la señal senoidal. Para el cálculo de estos dos parámetros hay que tener en cuenta que el intervalo mínimo de tiempo que el μC puede temporizar es de 0,5 μs . El valor máximo de número de puntos es 1000. Cuanto mayor sea dicho valor mayor será la resolución con la que se generará la señal. Sin embargo, dado que el intervalo mínimo de tiempo que el μC puede temporizar es de 0,5 μs , para frecuencias superiores a 2 kHz no se pueden mantener los 1000 puntos. En la Tabla 18 se muestran los valores del número de puntos y del periodo de muestreo para algunas frecuencias de la señal senoidal.

FRECUENCIA SEÑAL SENOIDAL (Hz)	NUMERO DE PUNTOS	PERIODO DE MUESTREO (μs)
1	1000	1000
10	1000	100
100	1000	10
1000	1000	1
10000	200	0,5
200000	10	0,5

Tabla 18. Valores del número de puntos y periodo de muestreo de la señal senoidal

- El periodo de muestreo de la señal senoidal: una vez obtenido el valor del periodo de muestreo la aplicación debe calcular los datos que necesita el μC para poder implementar el retardo correspondiente. Esos datos, tal y como se explicó en el apartado 3.6 de este capítulo, son la duración del ciclo de instrucción y el número de veces que el μC debe repetir el bucle de retardo. Dado que cada iteración del bucle de retardo requiere 8 ciclos de la señal de reloj, la relación entre el tiempo de muestreo de la señal senoidal (T_S), la duración del ciclo de instrucción (T_{CY}) y el contador de repetición del bucle (CONTADOR) viene dado por la Ecuación 60.

$$T_S = \frac{8 \cdot \text{CONTADOR}}{F_{CY}} \quad \text{Ecuación 60}$$

En primer lugar la aplicación fija la frecuencia de trabajo de CPU en base a los criterios que aparecen en la Tabla 19. Para temporizaciones cortas la CPU trabaja a la máxima frecuencia, mientras que conforme aumenta el tiempo de muestreo la frecuencia de trabajo disminuye.

TIEMPO DE MUESTREO (T_S)	DURACIÓN DE UN CICLO DE INSTRUCCIÓN (T_{CY})
$0,5 \text{ us} \leq T_S < 1 \text{ us}$	62,5 ns
$1 \text{ us} \leq T_S < 2 \text{ us}$	125 ns
$2 \text{ us} \leq T_S < 4 \text{ us}$	250 ns
$4 \text{ us} \leq T_S < 8 \text{ us}$	500 ns
$8 \text{ us} \leq T_S < 16 \text{ us}$	1 us
$16 \text{ us} \leq T_S < 32 \text{ us}$	2 us
$32 \text{ us} \leq T_S < 64 \text{ us}$	4 us
$64 \text{ us} \leq T_S < 128 \text{ ms}$	8 us

Tabla 19. Configuración de la duración del ciclo de instrucción en función del tiempo de muestreo

Una vez establecida la duración del ciclo de instrucción se calcula el valor del contador aplicando la Ecuación 60. Por otro lado, para reducir el nivel de ruido la frecuencia de la señal de reloj REFO generada por el μC para los convertidores A/D y D/A se adecua al valor de la duración del ciclo de instrucción según se establece en la Tabla 16.

- Configuración de los relés de selección de resistencia de shunt, de selección del electrodo de trabajo y de configuración del modo de trabajo y del nivel de estabilización del potencióstato. Al igual que ocurre con las técnicas voltamétricas la aplicación debe establecer cuál debe ser el estado de estos relés. Para determinar el estado de los relés que seleccionan la resistencia de shunt del circuito de medida se recurre la información de la Tabla 15. A partir de la información de la Tabla 14 se establece la configuración de los relés que seleccionan el electrodo de trabajo. Por último, de la Tabla 10, de la Tabla 11 y de la Tabla 13 se obtiene la configuración de los relés que determina el modo de trabajo y el nivel de estabilización del potencióstato.
- Los datos de la evolución temporal de la señal senoidal que debe aplicarse al electrodo. La señal senoidal se describe mediante una serie de valores numéricos que corresponden a las amplitudes de dicha señal en los instantes marcados por el tiempo de muestreo. Estos valores de tensión se pueden calcular mediante la fórmula de la Ecuación 61.

$$V[i] = V_{AMPL} \cdot \sin\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot i}{NPuntos}\right) \quad \text{Ecuación 61}$$

Donde:

$V[i]$: valor correspondiente a la amplitud de la tensión para el punto i .

V_{AMPL} : amplitud de la señal senoidal que viene fijada por el usuario en la configuración del ensayo.

$NPuntos$: número de puntos que se van a utilizar para describir la señal.

A partir de los valores de tensión para cada uno de los puntos se calcula el valor digital que se le pasará al DAC para que éste genere la señal analógica correspondiente. Para ello se debe aplicar a los valores de tensión la fórmula de la Ecuación 35 correspondiente a la calibración del proceso de conversión D/A.

Una vez recopilada toda esta información, la aplicación prepara y transmite la trama que debe enviar al Equipo Electrónico de Medida para que éste lleve a cabo el ensayo de espectroscopía de impedancia. El formato de la trama transmitida por el PC es el que aparece en la Figura 52. A continuación el Equipo Electrónico de Medida aplica la señal senoidal al electrodo de trabajo y muestrea las señales de tensión y corriente. Los datos leídos de los convertidores A/D de tensión y corriente son transmitidos al PC dentro de la trama de respuesta (ver Figura 55). Una vez recibida la trama en el PC, la aplicación procesa los datos correspondientes a la señal de tensión mediante la ecuación de la recta de calibración del proceso de calibración A/D de tensión (Ecuación 36). En cuanto a los datos correspondientes a la señal de corriente, tras aplicarles la ecuación de la recta de calibración del proceso de conversión A/D de corriente (Ecuación 37), la aplicación divide los valores resultantes por la resistencia de shunt correspondiente a la escala de corriente seleccionada. De esta forma se obtienen los valores de la evolución temporal de las señales de tensión y corriente en el electrodo de trabajo seleccionado. Dichos valores son visualizados en la gráfica del formulario y a continuación utilizados para calcular el módulo y la fase de la impedancia de la muestra.

Para calcular la impedancia es necesario obtener la amplitud y el desfase de las señales de tensión y corriente. Para ello se aplica un algoritmo de transformada

discreta de Fourier DFT (Discret Fourier Transform) a los valores de la evolución temporal de ambas señales. El algoritmo DFT permite obtener las componentes frecuenciales $X(k)$ de una señal a partir de las N muestras $x(n)$ correspondientes a la evolución temporal de dicha señal [143], tal y como se indica en la Ecuación 62.

$$X(k) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot e^{-j \frac{2\pi \cdot n \cdot k}{N}} \quad \text{Ecuación 62}$$

Dado que los sistemas medidos son lineales la única componente frecuencial que interesa para el cálculo de la impedancia es la componente fundamental (la primera componente frecuencial, $k=1$), cuya expresión se detalla en la Ecuación 63.

$$X(1) = \sum_{n=0}^{N-1} \left[x(n) \cdot \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n}{N}\right) + j \cdot x(n) \cdot \sin\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n}{N}\right) \right] \quad \text{Ecuación 63}$$

A partir de esta expresión se pueden deducir los valores de la parte real $X_{REAL}(1)$ y de la parte imaginaria $X_{IMAG}(1)$ que se muestran en la Ecuación 64 y en la Ecuación 65 respectivamente.

$$X_{REAL}(1) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot \cos\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n}{N}\right) \quad \text{Ecuación 64}$$

$$X_{IMAG}(1) = \sum_{n=0}^{N-1} x(n) \cdot \sin\left(\frac{2 \cdot \pi \cdot n}{N}\right) \quad \text{Ecuación 65}$$

Tal y como se indica en la Ecuación 66 la componente fundamental puede expresarse en términos de parte real e imaginaria o magnitud ($X_{MAG}(1)$) y fase ($X_{\Phi}(1)$).

$$X(1) = X_{REAL}(1) + jX_{IMAG}(1) = X_{MAG}(1) \angle X_{\Phi}(1) \quad \text{Ecuación 66}$$

Los valores de la magnitud y la fase se derivan de los valores de la parte real e imaginaria mediante la Ecuación 67 y la Ecuación 68 respectivamente:

$$X_{MAG}(1) = \sqrt{X_{REAL}^2(1) + X_{IMAG}^2(1)} \quad \text{Ecuación 67}$$

$$X_{\Phi}(1) = \arctg \frac{X_{IMAG}(1)}{X_{REAL}(1)} \quad \text{Ecuación 68}$$

El valor de la magnitud de la componente fundamental no se corresponde exactamente con su amplitud [1]. Cuando la señal discreta $x(n)$ es real la relación entre ambas viene reflejada en la Ecuación 69.

$$X_{AMPL}(1) = \frac{X_{MAG}(1)}{N/2} \quad \text{Ecuación 69}$$

Para obtener los valores de la parte real y la parte imaginaria de la componente fundamental de las señales de tensión y corriente en el electrodo de trabajo basta con aplicar la Ecuación 64 y Ecuación 65 a los valores de la evolución temporal de dichas señales. A continuación la aplicación utiliza la Ecuación 67, la Ecuación 68 y la Ecuación 69 para obtener los valores de la amplitud y la fase de la tensión aplicada ($V_{AMPL}(1)$ y $V_{\Phi}(1)$) y de la corriente medida ($I_{AMPL}(1)$ y $I_{\Phi}(1)$). A partir de estos valores y aplicando la Ecuación 70 y la Ecuación 71 se obtiene el valor del módulo ($|Z|$) y la fase (φ_Z) de la impedancia de la muestra. Una vez calculados, dichos valores son visualizados en el formulario.

$$|Z| = \frac{V_{AMPL}(1)}{I_{AMPL}(1)} \quad \text{Ecuación 70}$$

$$\varphi_Z = V_{\Phi}(1) - I_{\Phi}(1) \quad \text{Ecuación 71}$$

4.4.3. Ensayo Automático

El ensayo automático consiste en realizar de forma automatizada un ensayo individual para cada una de las frecuencias configuradas. La aplicación recorre la lista de frecuencias empezando por la de mayor frecuencia y para cada una de ellas lleva a cabo un ensayo similar al ensayo manual.

Dado que la impedancia medida para cada una de las frecuencias no va a ser la misma (normalmente cuanto mayor es la frecuencia menor es el módulo de la impedancia), es posible que la escala de corriente óptima para hacer la medida

tampoco deba ser la misma (escalas de corriente grandes para altas frecuencias y pequeñas para bajas frecuencias). Para optimizar la medida en cada frecuencia se ha implementado un algoritmo de selección automática de escala de corriente. En principio el ensayo automático siempre se inicia en la escala de corriente más alta, cuando se recibe la primera lectura de la señal de corriente la aplicación calcula el módulo de la señal de corriente (que se corresponde con el valor máximo de la senoide). A partir de ese valor se establece cuál es la escala de corriente más adecuada para realizar la medida y se repite el ensayo con la nueva escala de corriente. Una vez realizado el ensayo para la primera frecuencia se pasa a la siguiente manteniendo la misma escala de corriente. Con los datos del nuevo ensayo se vuelve a calcular el módulo de la señal de corriente. Si dicho valor sobrepasa el 95 % del valor de la escala de corriente significa que la medida de corriente o bien está saturada o bien está muy próxima a la saturación. Para evitarlo se pasa a la escala de corriente superior y se repite el ensayo. Si por el contrario el módulo de la corriente está por debajo del 65 % del valor de la escala de corriente significa que la escala de corriente seleccionada es demasiado grande para la medida realizada lo que puede aumentar el nivel de ruido en la señal de corriente. Para reducir el nivel de ruido se pasa a la escala de corriente inferior y se repite el ensayo.

4.4.4. Visualización de espectros de impedancia

La aplicación dispone de un formulario en el que se pueden visualizar los espectros de impedancia de los diferentes ensayos (ver Figura 80). En primer lugar, el usuario selecciona de la lista de ensayos disponibles aquellos que quiere visualizar. Se pueden visualizar hasta un máximo de 20 espectros simultáneamente. La aplicación muestra una gráfica del módulo o de la fase de la impedancia en función de la frecuencia. Inicialmente la escala de frecuencia es logarítmica, aunque el usuario puede pasar a escala lineal seleccionando la opción correspondiente. La aplicación dispone de un sistema de zoom que permite limitar la visualización a un rango de frecuencia determinado.

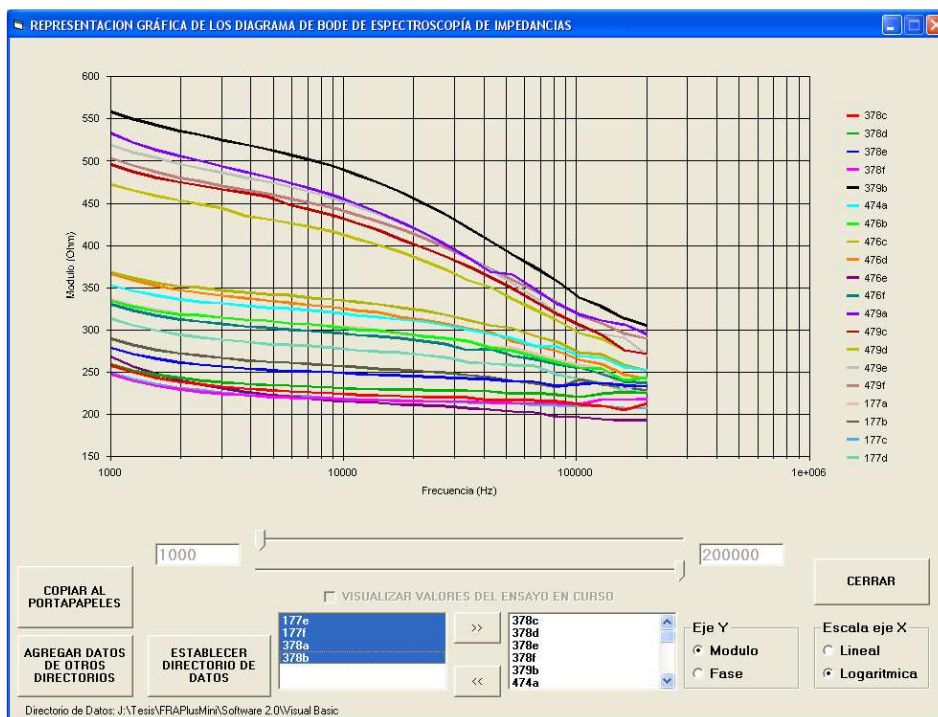


Figura 80. Formulario de visualización de los espectros de impedancias

4.4.5. Promediado de ensayos

Al igual que ocurre en voltametría de pulsos, por lo general, se suelen realizar varias repeticiones de los ensayos de espectroscopia de impedancias sobre una misma muestra con el fin de garantizar la fiabilidad de la medida. A continuación se seleccionan aquellas repeticiones que presentan un nivel de dispersión aceptable y se realiza el promedio de las mismas.

El formulario de promediado de ensayos de espectroscopia de impedancia permite al usuario evaluar cuál es el grado de dispersión que hay entre una serie de espectros de impedancia correspondientes a repeticiones de medidas sobre una misma muestra. De esta forma el usuario puede descartar aquellas repeticiones que presenten desviaciones excesivas con respecto a las demás antes de llevar a cabo el promediado de las medidas. Para ello se utiliza el método analítico descrito en el apartado *Evaluación algebraica de la dispersión de las señales* del punto 4.2.3 de este capítulo. Aplicando la expresión de la Ecuación 43 se calcula la Dispersión Media con respecto a la Mediana (DMM)

de cada una de las señales. Los datos de las DMM se muestran en pantalla de forma que el usuario pueda marcar solo aquellos ensayos que presenten un valor de DMM bajo y, por tanto, un grado de desviación con respecto al resto aceptable. El margen de dispersión admisible dependerá de cada experimento y deberán llevarse a cabo una serie de ensayos previos para determinarlo. A continuación el usuario debe hacer clic en el botón de PROMEDIAR REPETICIONES para que la aplicación realice el promediado de las repeticiones que hayan sido marcadas y almacene los valores resultantes en un fichero que tendrá la misma estructura que los ficheros de ensayo.

4.4.6. *Generación de ficheros de experiencia*

Para poder llevar a cabo el estudio estadístico de los datos de una experiencia de espectroscopía de impedancias de una forma cómoda y sencilla es conveniente agrupar las medidas recogidas en un solo fichero. El formulario de generación de ficheros de experiencia de espectroscopía de impedancias permite la creación de un fichero de datos de experiencia para su posterior tratamiento mediante las herramientas de análisis multivariante. El usuario debe en primer lugar seleccionar los ficheros de ensayo que quiere incluir en el fichero de experiencia. La aplicación permite elegir el tipo de datos que se van a incluir. Por un lado, se pueden seleccionar aquellas frecuencias cuyos valores de impedancia se van a incluir en el fichero. También se puede elegir si se desea introducir los datos de módulo, de fase o de ambos. Por último, el usuario hace clic en el botón de GENERAR FICHERO DE EXPERIENCIA y la aplicación genera tres ficheros con la información de la experiencia:

- Fichero de datos (*.eit): es un fichero que contiene los datos de todos los ensayos incluidos en la experiencia. Su estructura se compone de una línea por cada ensayo; y en cada línea se almacenan los datos de las medidas del módulo y/o la fase para todas las frecuencias seleccionadas. (en primer lugar se guardan los valores del módulo y a continuación los de la fase).
- Fichero de nombres de ensayo (*.ein): en este fichero se escriben los nombres de los ficheros de ensayo que se han incluido en la experiencia. Los nombres se almacenan en el mismo orden en el que se guardan los datos en el fichero de datos.
- Fichero de información de experiencia (*.eii): es un fichero en el que se almacenan los valores de las frecuencias a las que se han realizado los

ensayos de la experiencia así como la escala de corriente en la que se ha medido cada una de esas frecuencias.

5. Electrodo

En la presente tesis se han utilizado dos tipos de configuraciones para los electrodos: una configuración en formato de lengua electrónica ET (*Electronic Tongue*) en la que electrodos de trabajo de distinta naturaleza se agrupan en un mismo encapsulado y otra configuración en RDE (*Rotating Disk Electrode*) en la que un único material se encastra en una estructura para que pueda ser acoplado al rotor de un sistema giratorio. La primera configuración se utilizó en las experiencias de antioxidantes y pescado y en la primera parte de las experiencias con glifosato. En cuanto a la configuración RDE se utilizó en la segunda parte de la experiencia con glifosato a fin de mejorar la resolución de la medida

5.1. Lengua electrónica (ET)

El diseño de la lengua electrónica (ET) se basa en un diseño anterior creado por Winkist [20] que consiste en integrar electrodos de trabajo de 4 metales diferentes en una estructura cilíndrica hueca de acero inoxidable tal y como se muestra en la Figura 81.

Los electrodos de trabajo son hilos de distintos materiales metálicos de 1,5 cm de longitud. Los 4 hilos metálicos se encapsulan en la estructura cilíndrica mediante un epoxi. El cilindro de acero inoxidable hace las funciones de contraelectrodo.

El proceso de fabricación de la lengua electrónica viene descrito en la Figura 82. Consta de las siguientes fases:

- En primer lugar los hilos de metal que se van a utilizar como electrodos de trabajo se sueldan a unos cables multifilares y la conexión se refuerza y aísla mediante un trozo de tubo retráctil (Figura 82-a). Si el material del

electrodo de trabajo no permite la soldadura, el contacto eléctrico se consigue mediante la presión mecánica que ejerce el tubo retráctil.

- A continuación los electrodos de trabajo se insertan en un pieza circular de plástico cuyo diámetro coincide con el diámetro interior del tubo de acero inoxidable (Figura 82-b).

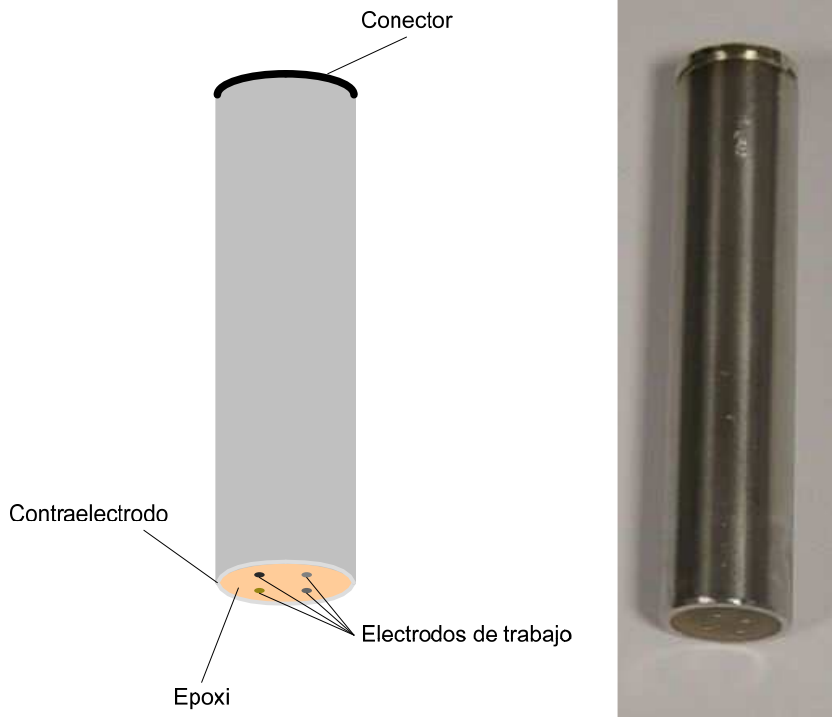


Figura 81. Lengua Electrónica

- Seguidamente el conjunto de la pieza de plástico con los electrodos de trabajo se introduce en el cilindro de forma que los electrodos de trabajo sobresalgan ligeramente por uno de los extremos del cilindro (Figura 82-c).
- Se prepara el epoxi (referencia RS 199-1468) mezclando la resina con el endurecedor. Se introduce epoxi por el otro extremo del cilindro hasta que las conexiones entre los cables y los electrodos de trabajo queden cubiertas (Figura 82-d). Se deja secar durante 24 horas.
- Se prepara de nuevo epoxi y se introduce por el extremo del cilindro por el que sobresalen los electrodos de trabajo hasta cubrirlos completamente (Figura 82-e). Se deja secar durante 24 horas.

- Los cables conectados a los electrodos de trabajo se sueldan al conector modelo DIN de 6 polos (referencia JR2712 de MULTICOMP), tal y como se indica en la Figura 82-e. A continuación el conector se embute en el extremo del cilindro que ha quedado hueco utilizando un epoxi conductivo de plata (referencia 186-3616 de RS). Se deja secar durante 24 horas.
- Por último, se lija la lengua electrónica por el extremo por el que sobresalen los electrodos de trabajo. En primer lugar se utiliza una lima para metal para eliminar la capa de epoxi sobrante. A continuación se lija la superficie con un papel de lija de textura gruesa (referencia 011K de 3M) primero y después con papel de lija de textura fina (referencia 213Q de 3M). Por último, la lengua electrónica se pule primero con alúmina gruesa (aluminio óxido 90 estandarizado referencia 1.01097.1000 de Merck) y a continuación con alúmina fina (referencia: 319767-25g de Aldrich) para obtener una superficie homogénea de los electrodos de trabajo.

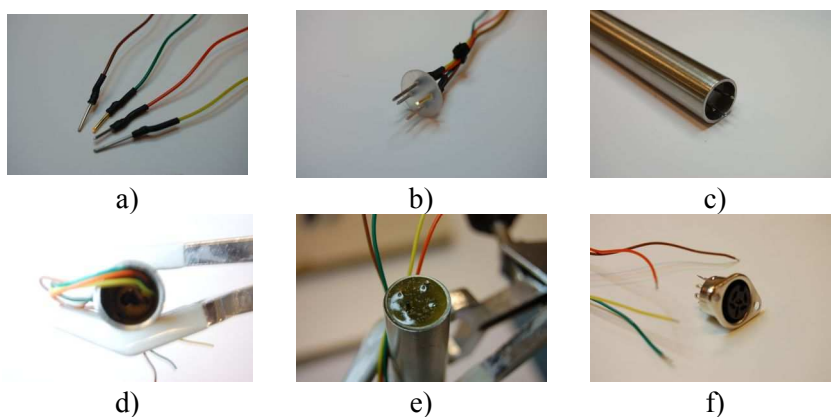


Figura 82. Proceso de fabricación de la lengua electrónica

Para las experiencias realizadas se construyeron dos tipos de lenguas. Para la implementación de los electrodos de trabajo se eligieron materiales con comportamientos diferentes que pudiesen dar lugar a respuestas electroquímicas variadas.

En la primera se incluyeron 4 metales nobles:

- Ir: Iridio 99,9 % (referencia IR005140 de GoodFellow)

- Rh: Rodio 99,9 % (referencia RH005130 de GoodFellow)
- Pt: Platino 99,99+ % (referencia PT005155 de GoodFellow)
- Au: Oro 99,999 % (referencia AU005172 de GoodFellow)

En la segunda se incorporaron 4 metales no nobles:

- Ag: Plata 99,99 % (referencia AG005160 de GoodFellow)
- Co: Cobalto 99,99+ % (referencia CO005120 de GoodFellow)
- Cobre: 99,98+ % (referencia CU005293 de GoodFellow)
- Ni: Níquel 99,98 % (referencia NI005171 de GoodFellow)

En todos los casos el diámetro de los hilos fue de 1mm.

El contraelectrodo está constituido por la estructura cilíndrica de acero inoxidable de la ET. Las dimensiones del cilindro son: longitud 10 cm, diámetro interno de 16 mm y diámetro exterior de 18 mm. El grado del acero inoxidable utilizado es 316L.

Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical).

5.2. Electrodo rotatorio (RDE)

Cuando se desea aumentar la resolución de la medida de voltametría se recurre a los electrodos RDE que permiten maximizar la respuesta en corriente. Dichos electrodos tienen la capacidad de girar mientras se lleva a cabo el ensayo lo que permite:

- Desalojar los productos de las reacciones.
- Reducir los fenómenos de fisisorción.
- Aumentar el flujo de materia hacia el electrodo potenciando la difusión.
- Eliminar los residuos de la corrosión del electrodo y de las reacciones de oxidación/reducción.

Todo ello hace que las señales de corriente recogidas presenten mayores valores de amplitud con lo que en principio se podría mejorar la capacidad de discriminación del sistema de medida.

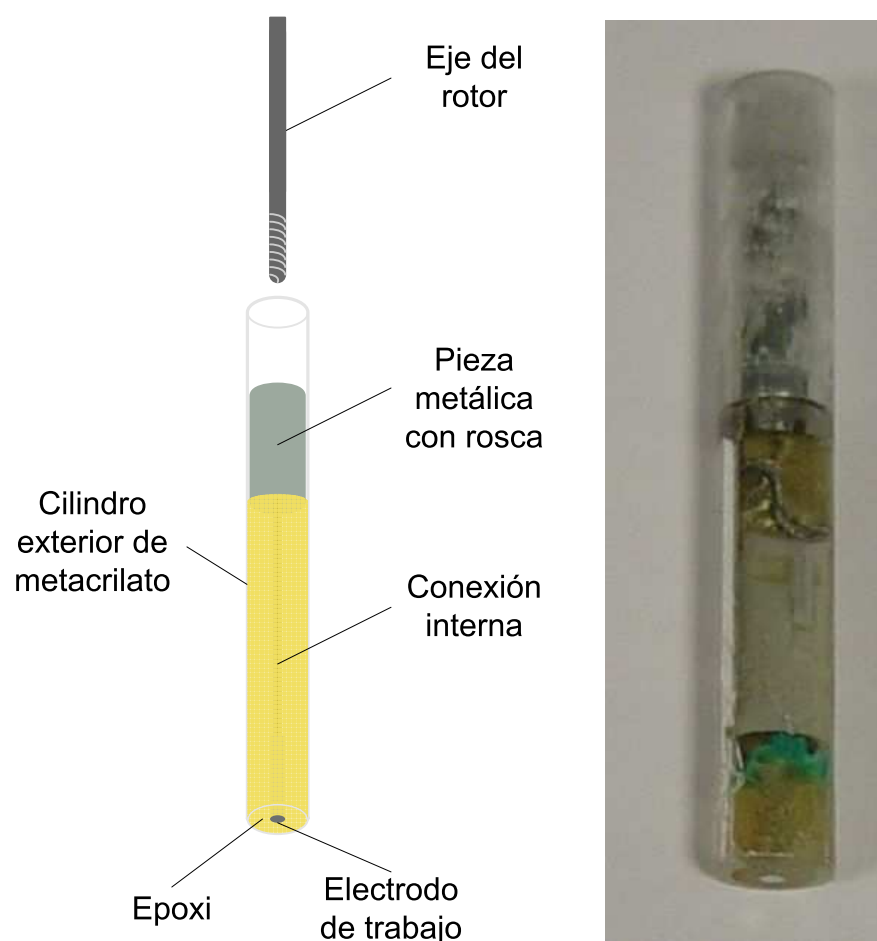


Figura 83. Electrodo RDE

En la segunda parte del ensayo con glifosato, con objeto de aumentar la resolución de la medida y poder detectar/cuantificar concentraciones bajas del producto, se recurrió a un electrodo RDE. Para hacer girar el electrodo se utilizó un rotor para RDE de la empresa METROHM modelo 1.628.0020. El equipo incorpora un electrodo de platino, pero dado que las medidas debían hacerse con cobalto y cobre hubo que fabricar electrodos con estos dos materiales que se pudiesen acoplar al equipo rotor.

El electrodo se compone de los siguientes elementos (ver Figura 83):

- Un cilindro de metacrilato de 7 cm de largo con un diámetro interior de 7 mm y un diámetro exterior de 10 mm.
- El metal del electrodo que consiste en un trozo de cable del material correspondiente de 2,5 cm de longitud y un diámetro de 2 mm. Para esta tesis los metales utilizados fueron cobre Cu 99,99+ % (referencia CU007905 de GoodFellow) y cobalto Co 99,99+ % (referencia CO007902 de GoodFellow).
- Una pieza cilíndrica metálica con una rosca interior que permitirá llevar a cabo el ensamblado mecánico y la conexión eléctrica entre el electrodo y el eje del rotor.
- Un epoxi no conductivo (referencia RS 199-1468).

Para la fabricación del electrodo RDDE se deben seguir los siguientes pasos:

- En primer lugar, se lleva a cabo una conexión eléctrica mediante un cable multifilar de cobre entre el electrodo y la pieza metálica. En los casos en los que sea posible (por ejemplo para el electrodo de cobre) la conexión entre el cable y el electrodo de trabajo se debe implementar mediante una soldadura; en los que no se debe recurrir a una conexión mecánica mediante crimpado.
- El conjunto electrodo-pieza metálica se introduce en el cilindro de metacrilato junto con el epoxi procurando que los ejes del electrodo de trabajo y de la pieza metálica queden alineados con el eje del cilindro. Esta es la parte más crítica del proceso ya que si los ejes no están alineados se producirán desviaciones del movimiento rotatorio del electrodo que darán lugar a fenómenos no deseados durante los ensayos.
- Se deja secar el epoxi durante un día y se lija con una lija fina (referencia 213Q de 3M) y, por último, se pule primero con alúmina gruesa (aluminio óxido 90 estandarizado referencia 1.01097.1000 de Merck) y a continuación con alúmina fina (referencia: 319767-25g de Aldrich).

5.3. Limpieza de los electrodos de trabajo

La limpieza de los electrodos de trabajo es uno de los procesos más críticos dentro del proceso de medida. Durante los ensayos de voltametría en la superficie de los electrodos de trabajo se producen los siguientes fenómenos electroquímicos:

- Reacciones de corrosión del material del electrodo.
- Reacciones de oxidación-reducción de algunas de las sustancias presentes en el electrolito.
- fenómenos de fisisorción.
- Fenómenos de quimisorción.

Todos estos fenómenos tienden a generar sobre la superficie del electrodo una capa residual cuya naturaleza difiere de la del metal. La corriente que circula por electrodo está directamente relacionada con la superficie de contacto entre el metal y la muestra. Electrodo de trabajo parcial o completamente cubiertos por una capa de naturaleza química diferente darán lugar a señales de corriente diferentes. Por tanto, si la capa residual no es eliminada antes de llevar a cabo un nuevo ensayo el resultado de la medida se verá distorsionado. En algunas ocasiones (por ejemplo en ensayos sobre antioxidantes con cobalto) el espesor de la capa residual generada puede ser tal que el paso de corriente por el electrodo quede bloqueado totalmente, lo que imposibilita la realización del ensayo. Es, por tanto, necesario eliminar la capa residual antes de cada ensayo. La naturaleza, el espesor y la dureza de la capa dependen del tipo de metal y de su interacción electroquímica con la muestra. Los metales no nobles presentan mayor capacidad de corrosión que los nobles y, por tanto, son más propensos a la creación de la capa residual. Pero también ocurre que en una experiencia sobre antioxidantes se generará mayor capa residual que en una sobre azúcares. En consecuencia, el proceso de limpieza deberá adaptarse a la naturaleza de los electrodos utilizados y al tipo de experiencia.

Otro aspecto que debe tenerse en consideración es que el proceso de limpieza no debe alterar demasiado la superficie del electrodo; por ejemplo si llevamos a cabo un lijado con una lija gruesa se producirán una serie de irregularidades que harán que el valor de la superficie aumente, lo que afectará a las medidas. Por tanto después de un lijado es necesario llevar a cabo siempre un pulido que homogenice la superficie.

De forma general existen 4 pasos que se pueden llevar a cabo en un proceso de limpieza aunque casi nunca se implementan juntos:

- Lijado con lija gruesa (referencia 011K de 3M): este paso se utiliza cuando la capa depositada es gruesa y tiene un alto grado de dureza. También se suele recurrir a este lijado cuando los electrodos llevan mucho tiempo sin utilizarse.

- Lijado con lija fina (referencia 213Q de 3M): este paso se utiliza para los electrodos de trabajo no nobles en algunas experiencias (ver Figura 84-a).
- Pulido mediante alúmina gruesa (referencia 1.01097.1000 de Merck) y/o fina (referencia: 319767-25g de Aldrich). Este es el proceso de limpieza más común. Se coloca alúmina en un paño extendido fijado a una base de madera y se añade un poco de agua destilada. A continuación la superficie del electrodo de trabajo se frota contra el paño con un movimiento circular. El pulido con alúmina puede utilizarse como único proceso de limpieza cuando la muestra no presenta una alta reactividad con los electrodos de trabajo. Además se utiliza para suavizar la superficie del electrodo después de un proceso de lijado (ver Figura 84-b).
- Pulido mediante polvo de diamante. Este pulido se realiza cuando se quiere obtener una superficie del electrodo de trabajo completamente lisa, sin irregularidades después de un proceso de pulido.



a)



b)

Figura 84. Limpieza de la lengua electrónica

6. Caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida

Con objeto de caracterizar el equipo a nivel de señal eléctrica se hicieron una serie de ensayos preliminares sobre componentes eléctricos de valores conocidos. El objetivo final de estos ensayos era determinar la precisión y la

exactitud del equipo tanto para la técnica de voltametría como para la técnica de espectroscopía de impedancias.

6.1. Caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida para voltametría

En este caso se llevó a cabo un ensayo de voltametría de pulsos aplicando el patrón de la Figura 85. Este patrón se compone de 41 pulsos de 20 ms cuyas amplitudes varían dentro del rango de -2000 mV a +2000 mV. El patrón está diseñado de forma que se imitan los diversos tipos de señales que se utilizan en voltametría de pulsos. Los ensayos se realizaron sobre una resistencia de 100 Ω en modo de 2 electrodos y en una escala de corriente de 20000 μ A. Se llevaron a cabo 5 repeticiones del ensayo.

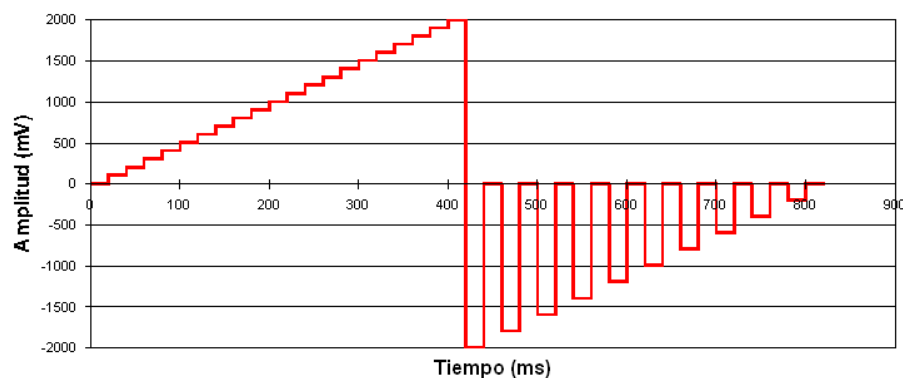


Figura 85. Patrón para la caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida en voltametría

Precisión

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de la precisión de las medidas realizadas con objeto de evaluar la reproducibilidad del sistema. Los 984 valores correspondientes a la evolución temporal de la corriente medida para las 5 repeticiones se muestran en la Figura 86. Para cada uno de los puntos se calculó la desviación estándar de las 5 repeticiones; el punto con mayor desviación estándar (32 μ A para una amplitud de 17986 μ A) presentaba una desviación relativa del 0,18 %.

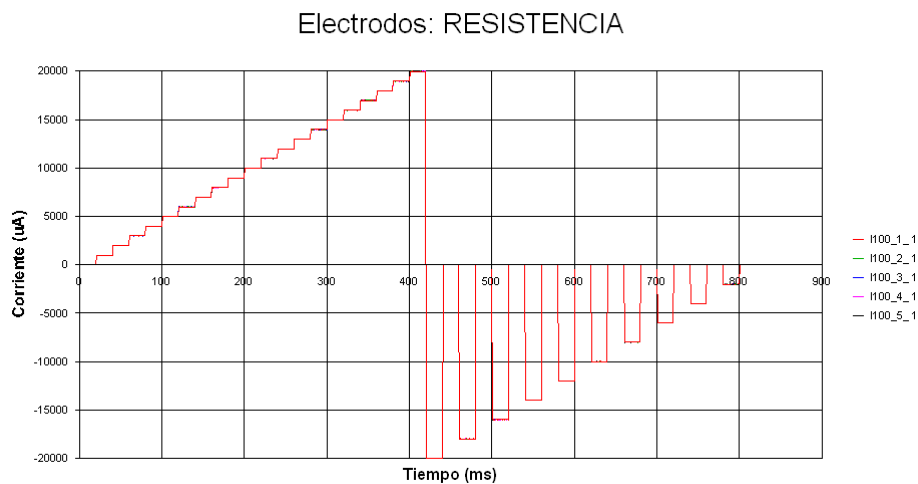


Figura 86. Representación gráfica de las 5 repeticiones de medida sobre una resistencia de 100 Ω

Exactitud

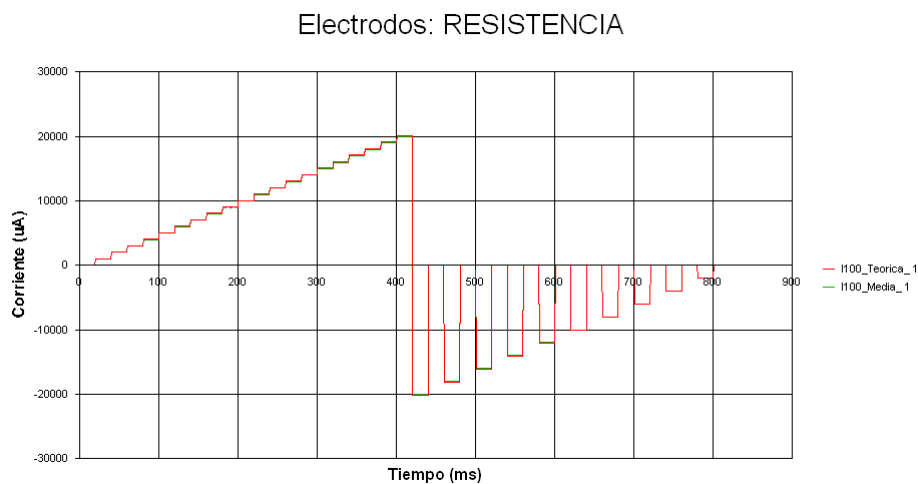


Figura 87. Representación gráfica del valor medio de 5 repeticiones y del valor teórico

En la Figura 87 se muestra la representación gráfica de la señal correspondiente a la media de 5 repeticiones junto con la señal que teóricamente debería obtenerse al aplicar el patrón de la Figura 85 a una resistencia de 100 Ω . Se calculó para cada uno de los 984 puntos el valor absoluto de la diferencia entre el valor medio y el valor teórico. El punto con mayor diferencia con respecto al valor teórico (163 μA para una amplitud de 19978 μA) presentaba un error relativo del 0,82 %.

Con estos ensayos se demostró que el equipo presentaba unos elevados niveles de reproducibilidad y exactitud tanto en la generación como en la medida de señal eléctrica que permitían realizar ensayos de voltimetría de confianza.

Resolución

El Equipo Electrónico de Medida incorpora unos convertidores A/D de 12 bits que determinan la resolución de las medidas. En voltimetría se pueden establecer dos tipos de resolución: la resolución en tensión y la resolución en corriente. Para las medidas de la tensión aplicada al WE la resolución de la medida viene dada por la Ecuación 72 en la que ΔV representa el rango de variación de la tensión (entre -2 V y +2 V).

$$resolución_V = \frac{\Delta V}{2^{12} - 1} = \frac{4\text{ V}}{4095} = 9,768\text{ mV} \quad \text{Ecuación 72}$$

En cuanto a la resolución en la medida de la corriente que circula por el electrodo de trabajo, ésta depende de la escala de corriente que se haya seleccionado para llevar a cabo la medida, que, a su vez, viene dada por el valor de la resistencia seleccionada en el circuito de medida de corriente. Su expresión se muestra la Ecuación 73 en la que ΔI representa el rango de variación correspondiente a la escala de corriente seleccionada.

$$resolución_I = \frac{\Delta I}{2^{12} - 1} = \frac{4\text{ V}}{4095 \cdot R_{SHUNT}} \quad \text{Ecuación 73}$$

Por ejemplo si se selecciona una resistencia de shunt de 100 Ω , la escala de corriente sería [-20 mA; +20 mA] y la resolución 9,768 μA . Sin embargo, si la resistencia de shunt es de 100 k Ω , la escala de corriente correspondiente sería [-20 μA ; +20 μA] con una resolución de 9,768 nA.

6.2. Caracterización eléctrica del Equipo Electrónico de Medida para espectroscopía de impedancias

Para espectroscopia de impedancias se realizaron 5 ensayos sobre la red RC que aparece en la Figura 88. Para cada ensayo se midió la impedancia de dicha red a 25 frecuencias dentro del rango de 1 Hz a 200 kHz. Los ensayos se llevaron a cabo en modo de 2 electrodos.

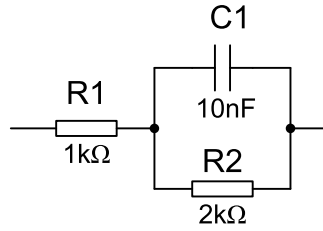


Figura 88. Red RC de caracterización del Equipo Electrónico de Medida para espectroscopía de impedancias

Precisión

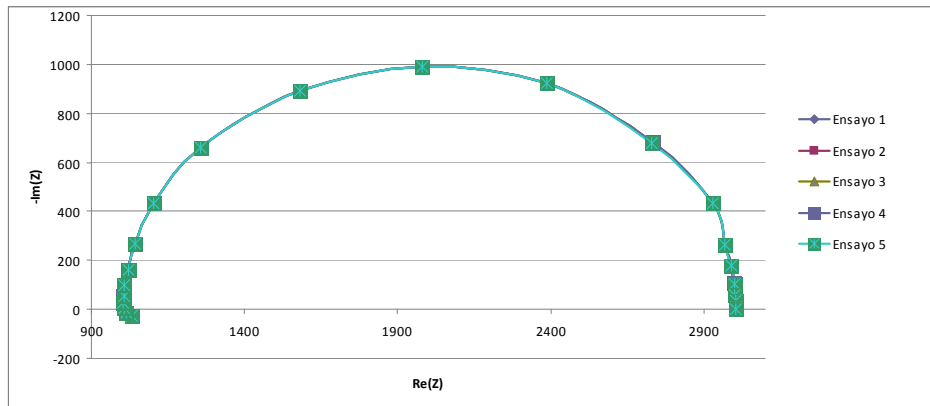


Figura 89. Diagrama de Nyquist de los 5 ensayos de caracterización para espectroscopía de impedancias

La Figura 89 muestra el diagrama de Nyquist de los ensayos. Para evaluar cuantitativamente la precisión del sistema se calculó la desviación estándar

entre las 5 medidas para cada una de las 25 frecuencias. El cálculo se hizo tanto para la parte real de la impedancia como para la parte imaginaria. Para la parte real la frecuencia con mayor desviación estándar fue 200 kHz que presentaba una desviación de $1,66 \Omega$ para un valor medio de 1033Ω lo que supone una desviación relativa de $0,16 \%$. En cuanto a la parte imaginaria la frecuencia que mayor dispersión estándar presentó fue también la frecuencia de 200 kHz con un valor de $1,26 \Omega$ para un valor medio de $-25,77 \Omega$ lo que supone una desviación relativa de $4,89 \%$.

Exactitud

En la Figura 90 se representan los diagramas de Nyquist correspondientes a la media de los 5 ensayos y la respuesta que teóricamente debería dar la red RC de la Figura 88. Para cada frecuencia del espectro se calculó el valor absoluto de la diferencia entre el valor medio y el valor teórico. Para la parte real la frecuencia con mayor diferencia fue de 447 Hz y la diferencia fue de 46Ω para un valor medio de 2238Ω lo que da una error relativo de $2,06 \%$. En cuanto a la parte imaginaria la frecuencia que mayor diferencia presentó fue 269 Hz con 74Ω para un valor medio de 680Ω , lo que corresponde a un error de $6,47 \%$.

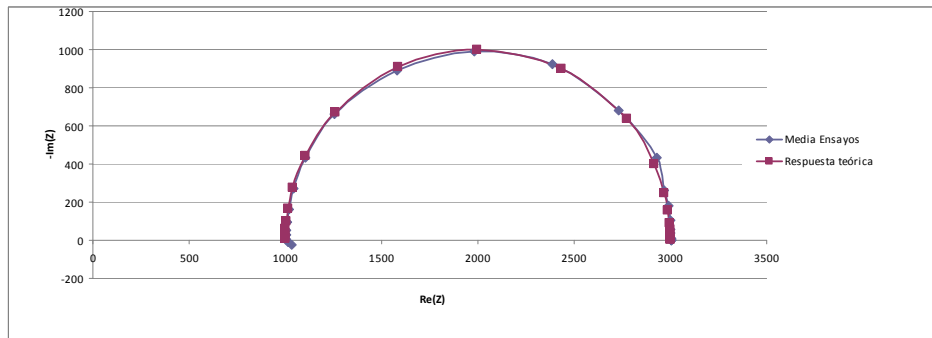


Figura 90. Representación gráfica del valor medio de 5 repeticiones y del valor teórico

Con estos ensayos se demostró que el equipo tenía unos niveles de reproducibilidad y exactitud a nivel de señal eléctrica aceptables para la técnica de espectroscopía de impedancias.

7. Validación experimental del sistema de medida

Aunque el sistema diseñado permite la implementación de ensayos de voltametría y de espectroscopía de impedancias, en la presente tesis su aplicación se ha limitado a voltametría de pulsos y voltametría cíclica. En este apartado se presenta la validación experimental del equipo para estas dos técnicas.

7.1. Validación experimental del sistema de medida para voltametría cíclica

Dado que existen equipos comerciales que permiten la implementación de medidas de voltametría cíclica, un método de la validación adecuado es llevar a cabo un ensayo con el equipo comercial y con el sistema diseñado y comparar los resultados. En este caso se llevó a cabo un ensayo de voltametría cíclica con las siguientes características:

- Electrodo: se utilizó la lengua electrónica descrita en el apartado 5.1. Como electrodo de trabajo se utilizó el Pt, siendo la carcasa cilíndrica de la lengua el contraelectrodo. El electrodo de referencia empleado fue un electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical).
- Muestra: los ensayos de voltametría cíclica se llevaron a cabo en una disolución de 7,7,8,8-Tetraceanoquinodimetano $\text{CH}_{12}\text{H}_4\text{N}_4$ (referencia 157635 de Aldrich) al $5 \cdot 10^{-3}$ M en una base de perclorato de tetrabutilamonio (TBAClO_4) en acetonitrilo (CH_3CN) con una concentración de 10^{-2} M.
- La configuración de la señal aplicada al electrodo de trabajo fue:
 - o Potencial inicial: 0 V
 - o Tensión máxima: +1,2 V
 - o Tensión mínima: -1 V
 - o Velocidad de barrido: 100 mV/s

Se llevó a cabo un ensayo utilizando el equipo Autolab PGSTAT100 y otro ensayo mediante el sistema diseñado. Los voltagramas correspondientes a ambos ensayos se muestran en la Figura 91. En dichos voltagramas se observa que ambas señales son muy similares dando lugar a tensiones de pico idénticas. Las diferencias que se observan en algunas zonas de las gráficas se deben probablemente al hecho de que los ensayos no se llevaron a cabo en atmósfera de Argón y a que el equipo diseñado no realiza la compensación de la

resistencia de la disolución mientras que el potenciostato PGSTAT100 sí que lo hace.

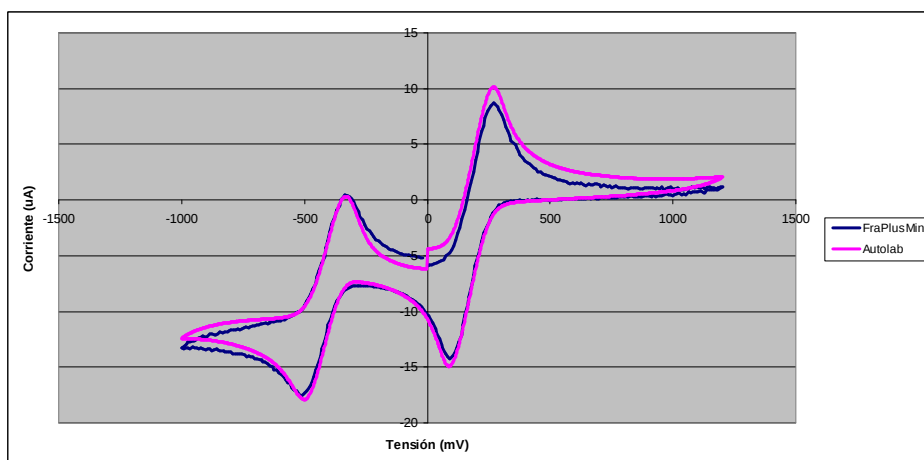


Figura 91. Resultados de validación experimental de voltametría cíclica

7.2. Validación experimental del sistema de medida para voltametría de pulsos

Para la validación experimental de la técnica de voltametría se preparó una experiencia con tres tipos de zumos de frutas. El objetivo del ensayo era comprobar si el sistema de lengua electrónica voltamétrica diseñado era capaz de establecer una discriminación entre los distintos zumos.

Para ello se tomaron las siguientes muestras:

- Zumo de Naranja marca DIA.
- Zumo Piña-Uva marca DIA.
- Zumo Melocotón-Uva marca CONSUM

De cada tipo de zumo se tomaron 2 muestras cada una de las cuales se midió tres veces. En total se llevaron a cabo 18 medidas.

Las medidas se llevaron a cabo mediante el array de pulsos que aparece en la Figura 92.

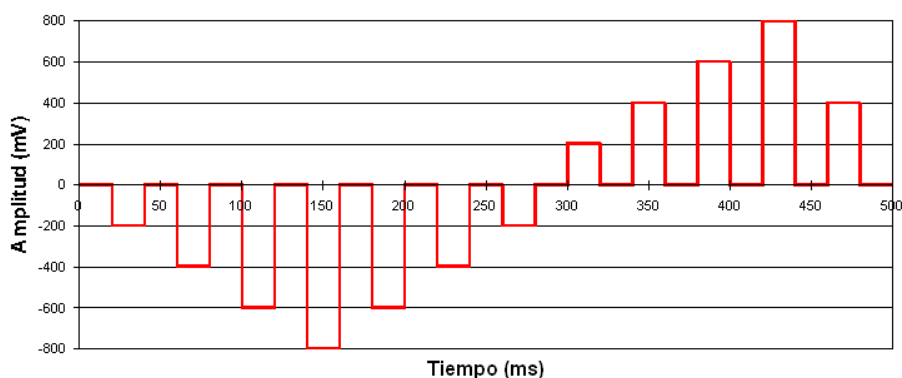


Figura 92. Patrón de pulsos para la validación experimental de voltametría de pulsos

Las medidas se hicieron mediante dos lenguas electrónicas; una de ellas constituida por 4 electrodos de trabajo nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y la otra por electrodos de trabajo no nobles (Ag, Co, Cu y Ni); siendo en ambos casos la carcasa cilíndrica de acero inoxidable el contraelectrodo. Como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical). En cada medida se recogieron los datos de la evolución temporal de la señal de corriente en cada uno de los 8 electrodos (1000 valores por cada electrodo). En total se obtuvieron 8000 valores para cada medida. Los datos recogidos fueron procesados mediante el software *PLS_Toolbox* de Eigenvector Research Inc., aplicándoles un Análisis de Componentes Principales (PCA). En la Tabla 20 se muestran los valores del porcentaje de varianza explicada para las 4 primeras componentes principales.

Componente Principal	% Varianza
1	45.85
2	13.41
3	9.14
4	5.31

Tabla 20. Porcentaje de varianza del PCA de zumos

En la Figura 93 se muestra la gráfica de la distribución de las muestras en el plano formado por las 2 primeras componentes principales. Se pueden observar tres grupos separados de muestras, un grupo por cada tipo de zumo lo que demuestra la capacidad del sistema de lengua electrónica voltamétrica diseñado de establecer discriminaciones entre muestras de diferente naturaleza físicoquímica.

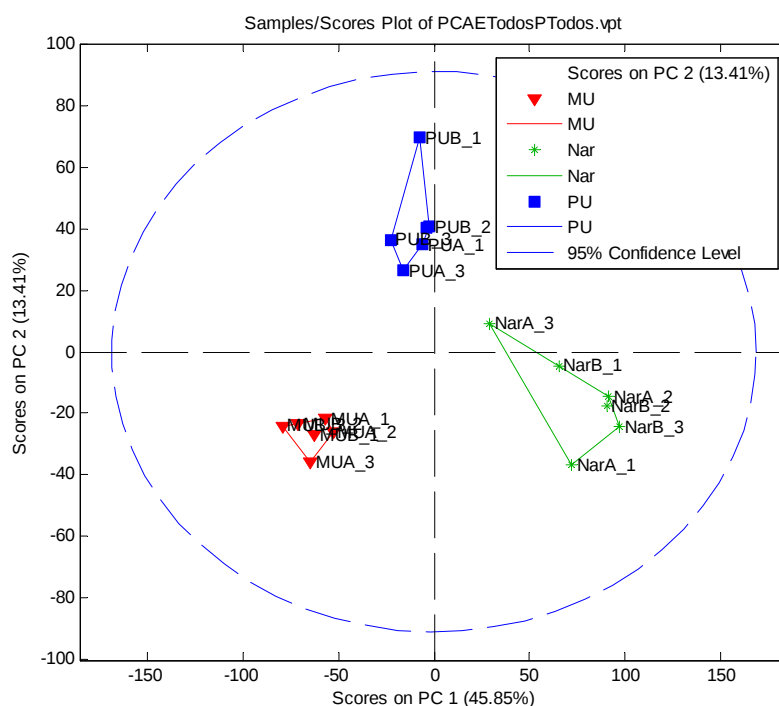


Figura 93. Análisis de Componentes Principales (PCA) para tres tipos de zumo de frutas

8. Aspecto final

En la Figura 94 puede apreciarse el aspecto final del Equipo Electrónico de Medida integrado en una caja con los conectores de los electrodos en el frontal. La técnica de espectroscopía de impedancias dispone de un conector para el electrodo de referencia y conector en el que se integran el electrodo de trabajo y el contraelectrodo. En cuanto a la voltametría el equipo dispone de un conector

para el electrodo de referencia y dos conectores para los 10 electrodos de trabajo que además incorporan un polo que corresponde al contraelectrodo.



Figura 94. Aspecto exterior del Equipo Electrónico de Medida

9. Conclusiones

Se ha desarrollado un sistema de lengua electrónica que permite implementar ensayos de voltametría de pulsos, de voltametría cíclica y de espectroscopía de impedancias. El sistema diseñado se compone de un Equipo Electrónico de Medida, una aplicación de PC y unos electrodos.

El Equipo Electrónico de Medida cumple con las especificaciones de diseño establecidas inicialmente en lo que se refiere a la generación y muestreo de las señales para la implementación de cada una de las técnicas. Así mismo presenta unos niveles de precisión y exactitud excelentes para las técnicas voltamétricas y aceptables para la espectroscopía de impedancias. Una de las características

fundamentales del equipo diseñado es su flexibilidad en cuanto al modo de trabajo del potencióstato permitiendo configuraciones de 2 o 3 electrodos y con distintos grados de estabilización. Para las técnicas voltamétricas el sistema puede llevar a cabo ensayos sobre hasta 10 electrodos de trabajo de forma automática. Se trata además de un equipo de bajo coste y portátil.

Por otro lado la aplicación de PC ha sido diseñada en base a la experiencia adquirida por el IDM en los últimos años en el ámbito de las lenguas electrónicas. El software permite no solo la configuración y realización de ensayos para las tres técnicas electroquímicas sino también la visualización de los datos recogidos, su almacenamiento, su preprocesado (análisis, filtrado, selección, eliminación y promediado de datos) y la generación de los ficheros necesarios para el tratamiento posterior mediante herramientas de análisis multivariante. La enorme flexibilidad que presenta la aplicación tanto en el preprocesado de los datos como en la generación de los ficheros de trabajo permite la realización de multitud de estudios diferentes de forma sencilla y en plazos muy cortos de tiempo.

En comparación con los sistemas existentes en el mercado actualmente el equipo diseñado presenta las ventajas de su bajo coste, su gran flexibilidad y su adecuación a las necesidades de las experiencias de lenguas electrónicas.

La plataforma desarrollada constituye una herramienta tremendamente útil para la puesta en marcha de experiencias que permitan la generación de modelos de predicción de parámetros fisicoquímicos en distintos ámbitos (alimentación, detección de gases de guerra y explosivos, calidad de aguas y otros). Además los conocimientos adquiridos y las técnicas de diseño aprendidas durante el desarrollo del sistema permitirán en el futuro el diseño de equipos de monitorización de bajo coste que, basándose en los modelos predictivos generados, sean capaces de determinar distintos parámetros a partir de medidas on-line no destructivas.

Capítulo 2. Aplicación a la medida de antioxidantes en disoluciones.

El objetivo de este capítulo es establecer modelos de predicción válidos para la cuantificación de la concentración de antioxidantes tanto en disoluciones simples (base más un solo antioxidante) como binarias (base más dos antioxidantes) a partir de las medidas de voltametría de pulsos realizadas con el equipo diseñado. Los antioxidantes elegidos para el estudio son el ácido ascórbico, el ácido cítrico y el ácido málico.

El capítulo se ha dividido en cuatro partes:

- Un primer apartado de introducción en el que se describe la importancia de la medida de antioxidantes en diversos tipos de matrices complejas como las frutas, las verduras o los zumos.
- En el segundo apartado se detallan los ensayos de voltametría cíclica que se realizaron sobre disoluciones simples de los tres ácidos y las conclusiones que se extrajeron de los mismos.
- En el tercer apartado se describen las experiencias llevadas a cabo mediante voltametría de pulsos sobre disoluciones simples de los tres ácidos con el fin de generar modelos predictivos para la cuantificación de su concentración.
- En el cuarto apartado se explican los ensayos realizados mediante voltametría de pulsos en mezclas binarias ascórbico-málico y ascórbico-cítrico.

1. Introducción

Después de los azúcares, los ácidos orgánicos son los sólidos solubles mayoritarios en los zumos de fruta. Los ácidos orgánicos son productos del metabolismo microbiano; todos ellos son producidos de forma natural en substratos vegetales y animales [144]. Estos ácidos juegan un papel vital en las plantas, contribuyen al crecimiento y producción de la fruta y también intervienen en la relación azúcar-ácido que afecta al sabor de las frutas y los vegetales [145]. La cantidad de ácido y/o la relación brix-ácido está

estandarizada para zumos comerciales; un contenido demasiado elevado o demasiado bajo de ácidos resulta inaceptable en este tipo de productos [146]. Por otra parte, los ácidos orgánicos son muy utilizados como conservantes alimenticios debido a su efecto de inhibición microbiana derivada de su acción acidulante [147].

Los ácidos más abundantes en frutas y verduras son el málico (Figura 95-a) y el cítrico (Figura 95-b) [145], que se comportan también como antioxidantes ya que tienen la capacidad de formar complejos con iones de metales pesados (mecanismo de quelación) [148]. El ácido ascórbico (Figura 95-c), un compuesto derivado de carbohidratos y soluble en agua que tiene propiedades antioxidantes y ácidas [145], está considerado como uno de los antioxidantes más importantes en frutas y verduras y está incluido en los complejos antioxidantes junto con la vitamina E, el β -caroteno y otros carotenoides A de tipo no provitamínicos [149]. Los ácidos carbohidratados y carboxílicos son difíciles de detectar mediante los métodos espectrofotométricos convencionales debido a la falta de grupos cromóforos o fluorescentes adecuados [150]. Distintos métodos tanto oficiales (AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*) como no oficiales, tales como la espectrofotometría, colorimetría, la titración, fluorimetría, amperometría, electroforesis o procedimientos enzimáticos o cromatográficos han sido ampliamente empleados para la cuantificación de estos ácidos. Actualmente, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPCL), en sus diversas modalidades, se ha convertido en un método preciso, fiable y de alta resolución para el análisis de ácidos orgánicos y vitamina C en productos alimenticios [151][152].

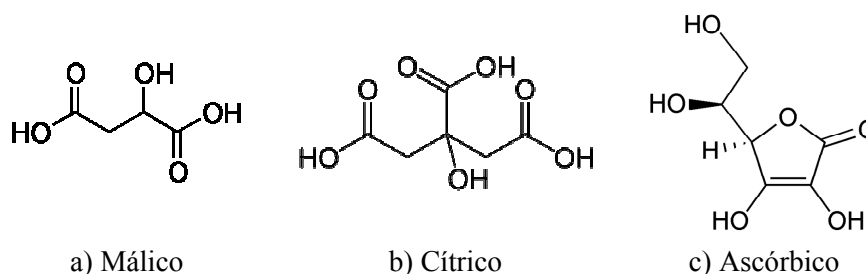


Figura 95. Fórmulas estructurales de los ácidos

Las metodologías mencionadas presentan buena precisión y exactitud y son confiables; pero a la vez, son destructivas y requieren mucho tiempo y un equipamiento caro y voluminoso, no siendo adecuadas para su aplicación on-

line en plantas industriales [6]. En este sentido, los métodos electroquímicos ofrecen ventajas sobre los métodos existentes porque son más rápidos y sencillos, permitiendo la realización de medidas on-line. Sin embargo, la aplicación de las técnicas electroquímicas a la determinación de la concentración de una especie en zumos, frutas o verduras plantea una dificultad importante debido a las interferencias entre los distintos compuestos [4]. Como se comentó en el apartado 1 de la Introducción, las lenguas electrónicas permiten la cuantificación de un determinado soluto en matrices complejas mediante el uso de arrays de sensores de sensibilidad cruzada y la aplicación de técnicas de análisis multivariante. Se trata, por tanto, de una herramienta válida para determinación de ácidos en frutas o verduras. En los últimos años se han publicado diversos trabajos en los que se aplican las técnicas voltamétricas a la determinación de ácido ascórbico en disoluciones, en agua potable, en vinos y muestras biológicas humanas. Algunos de ellos se describen a continuación.

Intarakamhang et al. en [153] determinan distintas concentraciones de ácido ascórbico en el rango 0,1-8 mM a partir de los datos de los voltagramas obtenidos mediante voltametría cíclica, voltametría de pulsos diferencial (DPV) y voltametría de onda cuadrada (SWV). Para ello utilizan un electrodo de trabajo de carbono (previamente pretratado en una disolución de ácido sulfúrico). El procedimiento es posteriormente validado sobre muestras de comprimidos de vitamina C, zumo de guayaba y extractos de té.

En [154] Winqvist et al. identifican y cuantifican cloruro de sodio, azida sódica, bisulfito sódico, hipoclorito de sodio y ácido ascórbico en disoluciones de agua potable. Para ello, utilizan una lengua electrónica con 4 metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) con una estructura similar a la descrita en el apartado 5.1 del Capítulo 1. La técnica aplicada es voltametría de pulsos de gran amplitud (LAPV). El array de pulsos utilizado contiene 22 pulsos de 50 ms con amplitudes comprendidas entre -300 mV y +800 mV. Los datos correspondientes a la evolución temporal de las señales de corriente medidas fueron procesados mediante herramientas de análisis multivariante (PCA y PLS) para generar los modelos de clasificación y cuantificación.

Seruga et al. en [155] determinan el contenido total de polifenoles en vino tinto mediante tres técnicas: voltametría de pulso diferencial (DPV), el método de Folin–Ciocalteu (FC) y HPLC, obteniendo muy buena correlación entre los tres métodos. Las medidas de voltametría se llevan a cabo mediante un electrodo de trabajo de carbono de 3 mm de diámetro. Antes de cada medida se llevaba a

cabo una limpieza del electrodo consistente en un pulido mecánico seguido de un pulido electroquímico. Las características de la señal aplicada en la DPV son: rango de barrido de 0 a 1 V, amplitud del pulso 50 mV, anchura 70 ms y velocidad de 5 mV·s⁻¹. A partir de los datos recogidos se obtienen los voltagramas que permiten identificar los potenciales y las corrientes de oxidación y relacionarlos con las concentraciones de los distintos compuestos fenólicos.

En [156] se mide la capacidad antioxidante de extractos de vino, uva y frambuesa mediante tres métodos electroquímicos: voltametría de barrido lineal, voltametría cíclica y voltametría de pulso diferencial (DPV). Las medidas se llevan a cabo sobre un electrodo de carbono. Los datos recogidos durante los ensayos se utilizan para generar los voltagramas en los que se identifican los potenciales de oxidación de los distintos compuestos. Del análisis de los resultados obtenidos se concluyen que la voltametría de pulso diferencial es una técnica válida para la caracterización de las propiedades antioxidantes de los vinos.

Ensafi et al. determinan de forma simultánea ácido ascórbico, dopamina y ácido úrico en muestras biológicas humanas gracias a la modificación de un electrodo de trabajo de carbono que permite obtener mayor selectividad y resolución [157]. La modificación consiste en depositar sobre la superficie del electrodo una capa de poli-sulfano III mediante varios procesos de voltametría cíclica. Se prepararon muestras con distintas concentraciones de ácido ascórbico, dopamina y ácido úrico sobre las que se llevaron a cabo ensayos de voltametría cíclica, voltametría de pulso diferencial (DPV) y cronoamperometría con el electrodo modificado. El resultado más relevante del estudio es que se consigue establecer una relación entre la concentración de los distintos compuestos y las medidas de voltametría de pulso diferencial.

El objetivo final de la aplicación de las lenguas electrónicas voltamétricas a la medida de antioxidantes es la determinación de su concentración en muestras reales (zumos, frutas, verduras). Sin embargo, para alcanzar dicho objetivo son necesarias una serie de etapas previas como la identificación de aquellas condiciones de ensayo (material y geometría de los electrodos de trabajo y formato de la señal aplicada) que permiten una mayor resolución en la cuantificación de los ácidos. Además son necesarios estudios sobre las interferencias entre los distintos compuestos de la muestra real (azúcares, antioxidantes y otros). En este capítulo se pretende dar un primer paso en esa

dirección. En primer lugar, se evalúa la capacidad de distintos metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y no nobles (Ag, Cu y Ni) para determinar la concentración de tres antioxidantes (ácido ascórbico, ácido cítrico y ácido málico) en disoluciones simples utilizando la voltametría de pulsos. A continuación, se estudia la capacidad de dicha técnica de discriminar el contenido de los distintos ácidos en mezclas binarias de ascórbico y cítrico y de ascórbico y málico. Otro de los objetivos de este estudio es establecer si la configuración de lengua electrónica (conjunto de electrodos) presenta alguna ventaja con respecto al uso de los electrodos por separado.

2. Estudios de voltametría cíclica en disoluciones simples

Antes de plantearse cualquier tipo de experiencia para la obtención de modelos predictivos, es necesario conocer cuáles son los fenómenos electroquímicos que se producen entre los electrodos y los ácidos. Con el objeto de conocer los procesos farádicos asociados con la presencia de los distintos ácidos, se implementaron una serie de ensayos de voltametría cíclica en los que se midieron los tres ácidos con los electrodos de Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Cu y Ni.

2.1. *Material y métodos.*

Preparación de las disoluciones

Los ensayos de voltametría cíclica se llevaron a cabo sobre disoluciones de los tres ácidos en una base de dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4 (referencia PO02600250 de Scharlau) 0,01 M (pH 4.9 ± 0.1 ; σ $809.25 \pm 10 \mu\text{S}/\text{cm}$). La función de la base es facilitar la circulación de la corriente entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo de forma que puedan ser medidos los fenómenos electroquímicos que se producen en el electrodo de trabajo. Normalmente la base se elige de forma que tenga buena conductividad pero que no tenga un alto grado de reactividad con los electrodos. A partir de esta base se prepararon disoluciones de ácido ascórbico (referencia AC05150250 de Scharlau), ácido cítrico monohidratado (referencia AC07200500 de Scharlau) y ácido málico (referencia 86767 de Guinama) todas ellas a una concentración de 0,5 M. La concentración elegida para los ensayos de voltametría cíclica fue alta

con el fin de obtener voltagramas con valores grandes de corriente que permitiesen apreciar con nitidez los efectos que se deseaban estudiar.

Ensayos de voltametría cíclica

Las medidas se llevaron a cabo con las lenguas electrónicas (ET) descritas en el apartado 5.1 del Capítulo 1. Los electrodos de trabajo de la primera lengua son Ir, Rh, Pt y Au mientras que para la segunda lengua son Ag, Cu y Ni. Para esta experiencia no se utilizó el electrodo de Co ya que en las pruebas preliminares dicho electrodo presentaba una alta reactividad que planteaba problemas de estabilidad del sistema de medida. Las carcasas de acero inoxidable de las dos lenguas hacían de contraelectrodo, mientras que como electrodo de referencia se utilizó un electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical). En la Figura 96 se muestra el montaje experimental de las experiencias con antioxidantes. Este montaje se utilizó para las experiencias de voltametría cíclica y voltametría de pulsos tanto para disoluciones simples como mezclas binarias.

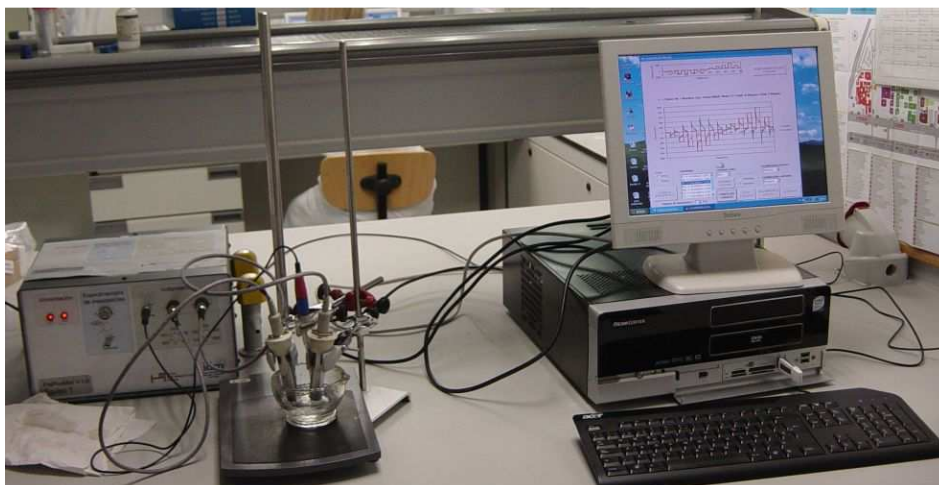


Figura 96. Montaje experimental de las experiencias con antioxidantes

En primer lugar se realizaron medidas de voltametría cíclica sobre la base con el fin obtener la línea base sobre la cual superponer los voltagramas de las disoluciones con ácidos. Para cada electrodo se realizó un ensayo previo con objeto de determinar los valores de tensión a partir de los cuales se apreciaba un aumento significativo de la señal de corriente, ya que la idea era obtener un

comportamiento plano de la base. Estos ensayos previos se llevaron a cabo con la siguiente configuración de la señal triangular:

- Velocidad de barrido: 100 mV/s.
- Potencial inicial: 0 V.
- Tensión máxima: +1 V.
- Tensión mínima: -1 V.

Tras el estudio de los resultados se estableció, para cada electrodo, el rango de tensión en el que la base presentaba un comportamiento plano (sin procesos electroquímicos de importancia). Los valores obtenidos se reflejan en la Tabla 21.

Utilizando estos rangos de tensión se llevaron a cabo los ensayos de voltametría cíclica para cada uno de los electrodos, primero sobre la base y luego sobre cada una de las disoluciones de los tres ácidos. La configuración de los ensayos fue: velocidad de barrido de 100 mV/s, potencial inicial de 0 V y los valores máximo y mínimo se establecieron para cada electrodo de trabajo según los rangos de la Tabla 21.

Electrodo de trabajo	Rango de tensión
Ir	[-0,5 V;+0,7 V]
Rh	[-0,5 V;+0,7 V]
Pt	[-0,5 V;+0,7 V]
Au	[-0,5 V;+0,7 V]
Ag	[-0,7 V;+0,7 V]
Cu	[-0,7 V;+0,4 V]
Ni	[-0,4 V;+0,7 V]

Tabla 21. Rangos de tensión para los ensayos de voltametría cíclica

Las medidas se realizaron con las lenguas electrónicas (ET) descritas en el apartado 5.1 del Capítulo 1. En primer lugar se llevaron a cabo sobre la base las medidas para todos los electrodos. A continuación se midieron las disoluciones de ascórbico, málico y cíclico también para todos los electrodos. Cada vez que se concluía la medida de una muestra para todos los electrodos se procedía a una operación de limpieza de los electrodos de trabajo. Dicha limpieza consistió en un pulido mediante alúmina gruesa (referencia 1.01097.1000 de Merck) y

posteriormente mediante alúmina fina (referencia: 319767-25g de Aldrich), tal y como se indica en el apartado 5.3 del Capítulo 1. Para cada ensayo se recogieron los valores la evolución temporal de las señales de corriente y tensión en el electrodo de trabajo y se almacenaron en un fichero *.vtg.

2.2. Resultados y discusión

Los voltagramas obtenidos fueron representados y analizados agrupándolos por electrodos. En la Figura 97 se muestra los voltagramas para el electrodo de Ir de la base y de cada una de las disoluciones de ácidos.

En él se pueden apreciar dos fenómenos electroquímicos. En primer lugar para tensiones negativas se observa un comportamiento característico para los tres ácidos que está relacionado con la liberación de protones H^+ . Conforme la tensión aplicada al electrodo de trabajo se hace más negativa se inicia un proceso de reducción de dichos protones lo que genera una corriente negativa. Cuando la tensión aplicada vuelve hacia valores positivos se produce el efecto de oxidación lo que produce un pico de corriente positiva. Este fenómeno es más acentuado para los ácidos que presentan mayor facilidad para liberar los protones, es decir, aquellos con menores constantes de disociación ácida (pK_a). Por este motivo las corrientes de oxidación y reducción observadas para el cítrico ($pK_{a1}=3.09$, $pK_{a2}=4.75$ y $pK_{a3}=6.41$) y para el málico ($pK_{a1}=3.40$ y $pK_{a2}=5.20$) son mayores que las obtenidas para el ascórbico ($pK_{a1}=4.10$ y $pK_{a2}=11.6$).

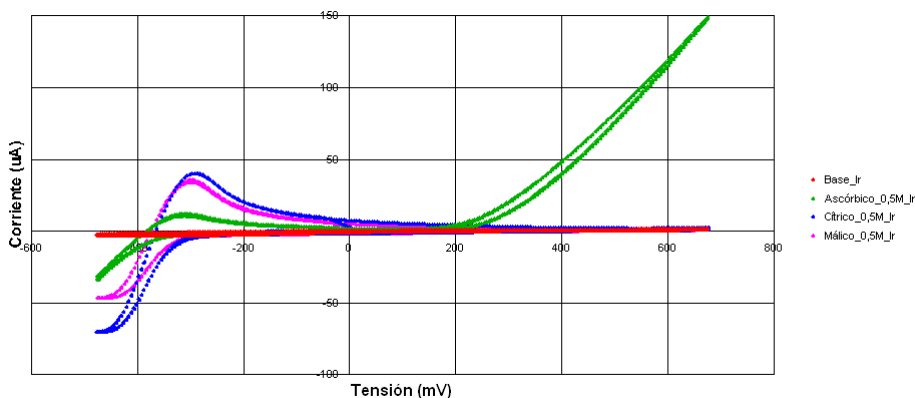


Figura 97. Voltagramas para el electrodo de iridio Ir

Por otra parte, para tensiones positivas el ácido ascórbico presenta un comportamiento característico que consiste en un incremento de la corriente anódica. Esta corriente es debida a la oxidación del ascórbico (ver Figura 98) que para el electrodo de Ir se produce a partir de los +200 mV. Los otros dos ácidos no presentan este comportamiento porque su oxidación no se produce en el rango de tensiones aplicadas.

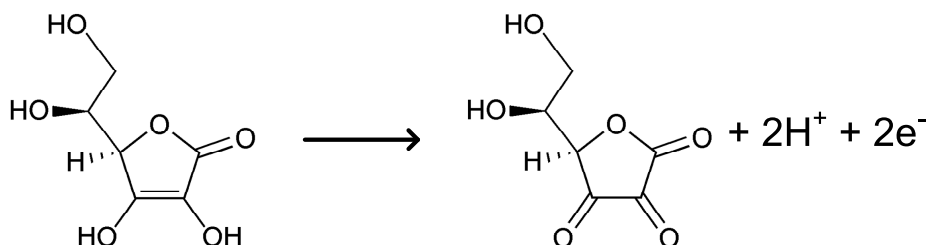


Figura 98. Reacción de oxidación del ácido ascórbico

Los voltagramas correspondientes al electrodo de Rh aparecen en la Figura 99. El comportamiento del Rh es muy similar al del Ir. Los voltagramas muestran los dos efectos mencionados para el Ir: procesos de oxidación y reducción de los protones H^+ en la zona de tensiones negativas para los 3 ácidos y reacción de oxidación del ácido ascórbico al aplicarle tensiones positivas superiores a +200 mV.

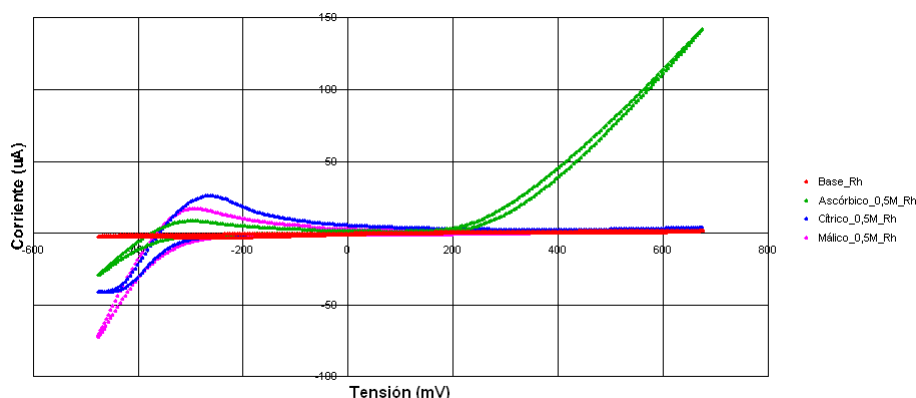


Figura 99. Voltagramas para el electrodo de rodio Rh

La Figura 100 muestra los voltagramas correspondientes al electrodo de Pt cuyo comportamiento es análogo al del Ir y el Rh diferenciándose únicamente en los valores corriente alcanzados en cada uno de los procesos.

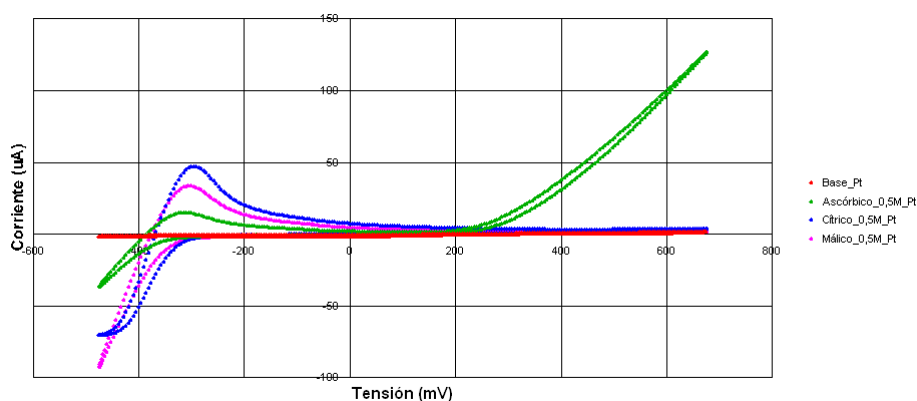


Figura 100. Voltagramas para el electrodo de platino Pt

Los voltagramas del electrodo de Au aparecen en la Figura 101. En ellos se puede observar el proceso de oxidación del ácido ascórbico para tensiones positivas mayores de +200 mV. Sin embargo, en el rango de tensiones negativas no se aprecia corriente para ninguno de los ácidos. Esto es debido a que, en el caso del electrodo de Au, los procesos de oxidación y reducción de los protones H^+ apenas son apreciables en el rango de estudio.

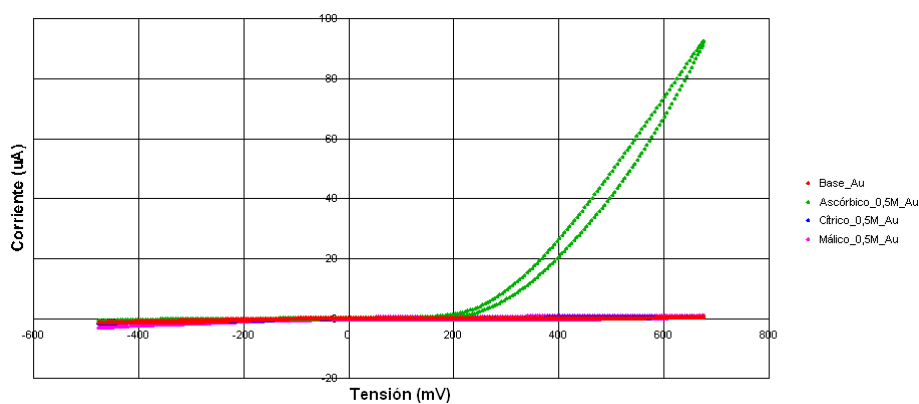


Figura 101. Voltagramas para el electrodo de oro Au

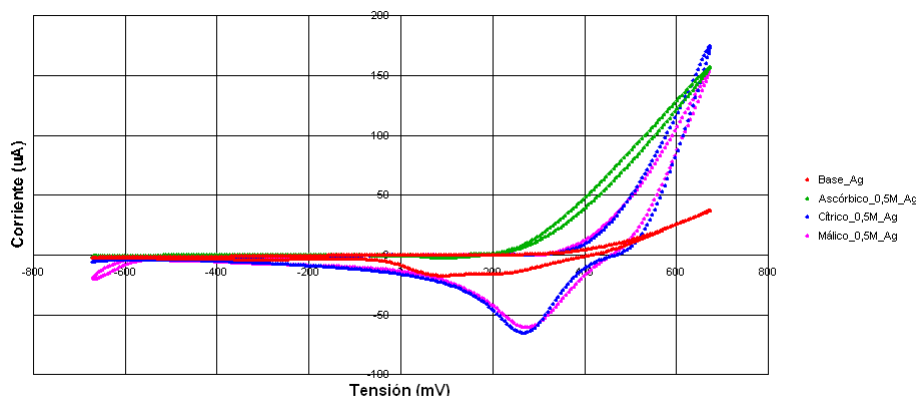


Figura 102. Voltagramas para el electrodo de plata Ag

La Figura 102 muestra los voltagramas correspondientes al electrodo de Ag. En ellos se puede observar que para potenciales negativos no aparecen corrientes significativas. Sin embargo, en el rango de tensiones positivas se observan dos fenómenos interesantes. En primer lugar se aprecia el proceso de oxidación del ácido ascórbico a partir de los +200 mV al igual que ocurre con los 4 electrodos nobles. Por otro lado, para el cítrico y el málico se observa que cuando el potencial aplicado supera los +400 mV se produce un aumento de la corriente anódica. Esta corriente es debida a que la presencia de los ácidos potencia la corrosión del metal para formar iones Ag^+ que forman complejos o precipitados con los aniones citrato, malato o ascorbato que se encuentran en la disolución. En el barrido de retorno hacia potenciales negativos se produce un pico catódico de corriente (a una tensión aproximada de +250 mV) que corresponde a la reducción de los complejos o precipitados formados anteriormente.

En la Figura 103 se representan los voltagramas correspondientes al Cu. Para el cítrico y el málico se aprecia un comportamiento similar al observado para la plata con la diferencia de que en este caso la corriente anódica es debida a la formación de precipitados o complejos entre los ácidos y los iones Cu^{++} producto de la corrosión del cobre. Esta corriente anódica empieza a aparecer a partir de potenciales mayores de 0 V. En este caso el pico catódico de corriente debido a la reducción de los precipitados o complejos se produce a una tensión de -200 mV. En cuanto al ácido ascórbico, el aumento de la corriente para potenciales positivos puede deberse al solapamiento de dos efectos: la oxidación del ascórbico y la corrosión del cobre.

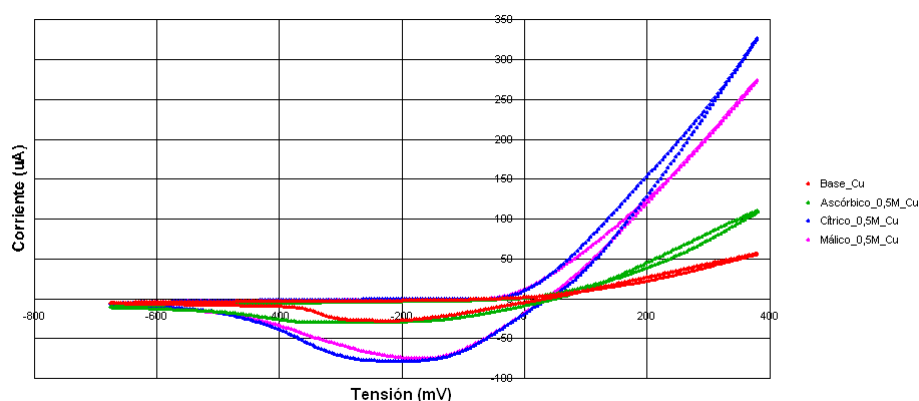


Figura 103. Voltagramas para el electrodo de cobre Cu

Por último, en la Figura 104 aparecen los voltagramas correspondientes al Ni. El níquel es un material reactivo por lo que cabría esperar un comportamiento similar al del cobre. Sin embargo, ni la base, ni el cítrico, ni el mállico presentan ningún fenómeno digno de ser mencionado. De hecho el único proceso electroquímico que se produce es la oxidación del ascórbico a partir de potenciales superiores a +200 mV.

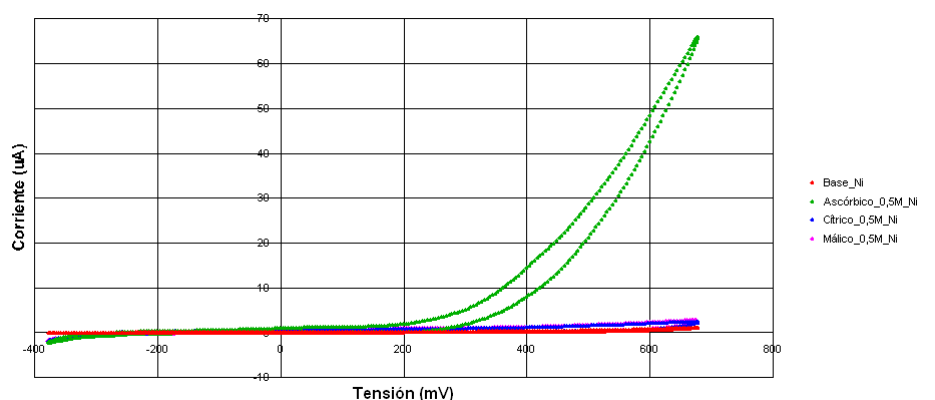


Figura 104. Voltagramas para el electrodo de níquel Ni

La causa por la cual este material no presenta en los ensayos de voltametría cíclica ningún comportamiento relacionado con procesos electroquímicos puede

ser la pasivación del Ni en presencia de los ácidos, fenómeno que ocurre en cuanto ambos entran en contacto [158]. Cuando se aplican las señales de voltametría cíclica el electrodo ya está recubierto por la capa de pasivación y los procesos observados corresponden a esta capa y no al níquel.

2.3. Conclusiones

Tras los ensayos de voltametría cíclica se pueden extraer dos conclusiones básicas:

- Desde el punto de vista de los electrodos, se aprecia que para el Ir, el Rh, el Pt, la Ag y el Cu se producen fenómenos electroquímicos de interés para los tres ácidos; mientras que en el caso del Au y del Ni solo se observa un comportamiento característico para el ácido ascórbico. Por otro lado, para los electrodos de Ir, Rh, Pt y Ag se producen procesos interesantes tanto a potenciales positivos como a potenciales negativos mientras que para el Au, el Cu y el Ni los procesos de interés ocurren fundamentalmente a potenciales positivos. Por tanto, parece razonable pensar que mediante la técnica de voltametría de pulsos es posible generar de modelos predictivos que permitan la determinación del contenido de estos ácidos en disoluciones simples. Para la experiencia deberían utilizarse todos los electrodos estudiados puesto que todos ellos presentan algún tipo de respuesta y el patrón de pulsos empleado debería contener tanto pulsos negativos como positivos.
- Desde el punto de vista de los ácidos se observa que el cítrico y el málico tienen un comportamiento electroquímico muy similar para todos electrodos mientras que el ácido ascórbico presenta un comportamiento particular sobre todo a potenciales positivos. Esta observación plantea la posibilidad de poder establecer una discriminación entre el ascórbico y los otros dos ácidos mediante técnicas voltamétricas. En principio, sería posible implementar una experiencia de voltametría de pulsos que permitiese la generación de modelos predictivos del contenido de ácidos en disoluciones binarias de ascórbico-cítrico y de ascórbico-málico.

3. Estudios de voltametría pulsos en disoluciones simples

A partir de los resultados de los estudios de voltametría cíclica se decidió poner en marcha una experiencia de voltametría de pulsos para la generación de modelos predictivos que permitiesen cuantificar el contenido de los ácidos en disoluciones simples. Para esta experiencia se decidió utilizar todos los electrodos con los que se llevaron a cabo los ensayos de voltametría cíclica y se diseñó un patrón de pulsos a medida a partir de las conclusiones extraídas del apartado anterior.

3.1. Material y métodos

Preparación de las disoluciones simples

Para cada ácido se llevaron a cabo tres tandas de ensayos. Las medidas de las dos primeras tandas se emplearon para la generación del modelo (set de calibración) y la tercera para su validación (set de validación). En cada tanda se analizaron un total de 11 disoluciones: 1 disolución base (sin ácido) y luego 10 disoluciones con distintas concentraciones (para todos los ácidos se utilizaron los mismos niveles de concentración). En la Tabla 22 se muestran las concentraciones de las 11 disoluciones medidas en cada tanda.

Muestra	Concentración de ácido
1	0 M (Base)
2	0,01 M
3	0,02 M
4	0,03 M
5	0,04 M
6	0,05 M
7	0,06 M
8	0,07 M
9	0,08 M
10	0,09 M
11	0,1 M

Tabla 22. Concentraciones de las disoluciones simples de ácidos

La elección de las concentraciones se realizó en base a dos criterios:

- Disponer de un nivel de concentración suficientemente alto para que las señales de voltametría permitiesen la generación de un modelo de predicción fiable y robusto.
- Acercarse a los niveles de concentración de los ácidos en sistemas reales. El nivel mínimo de concentración establecido es 0,01 M que para el ácido ascórbico (cuya masa molar es 176,13 g/mol) corresponde a 176,13 mg/100 g. Este valor es similar al contenido de ácido ascórbico en la guayaba (300 mg/100 g), la grosella negra (200 mg/100 g) o el pimiento rojo (190 mg/100 g) [159]. Existen frutas con un contenido mucho más alto como por ejemplo el camu camu (2800 mg/ 100 g) o la acerola (1600 mg/100 g). Aunque frutas como el kiwi (90 mg/100 g) o la naranja (50 mg/100 g) presentan contenidos en vitamina C por debajo de la concentración mínima establecida para este estudio.

Todas las disoluciones se prepararon sobre una base de dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4 (referencia PO02600250 de Scharlau) 0,01 M (pH 4.9 ± 0.1 ; σ $809.25 \pm 10 \mu\text{S/cm}$). Los ácidos empleados fueron: ascórbico (referencia AC05150250 de Scharlau), cítrico monohidratado (referencia AC07200500 de Scharlau) y málico (referencia 86767 de Guinama).

Ensayos de voltametría de pulsos

En base a las conclusiones establecidas en el apartado 2.3 de este capítulo se diseñó un patrón de 25 pulsos de 20 ms de ancho con valores positivos crecientes y decrecientes (ver Figura 105). Dado que la mayoría de los electrodos habían dado comportamientos característicos tanto para tensiones positivas como para tensiones negativas se pensó que deberían incluirse pulsos positivos y negativos en el patrón.

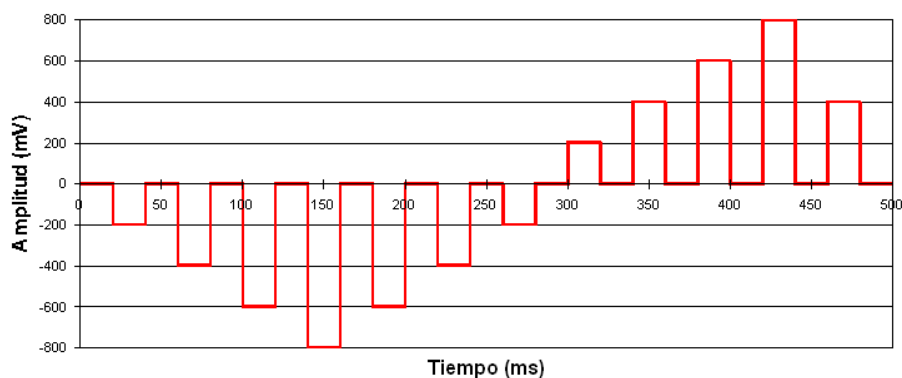


Figura 105. Patrón para los ensayos de voltametría de pulsos

Las medidas de voltametría de pulsos se realizaron con la siguiente configuración de electrodos:

- Electrodos de trabajo: metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y no nobles (Ag, Cu y Ni) incorporados a sendas estructuras de lengua electrónica (ET) tal y como se describe en el apartado 5.1 del Capítulo 1.
- Contraelectrodo: estructura cilíndrica de acero inoxidable de las ET's.
- Electrodo de referencia: electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical).

Sobre cada disolución se llevaron a cabo 3 repeticiones de medidas de voltametría de pulsos. En cada repetición se aplicó de forma consecutiva el patrón de tensión a cada uno de los 7 electrodos de trabajo y se midió la señal de corriente correspondiente. Por cada electrodo se tomaron 1000 muestras de la evolución temporal de la corriente, lo que supone que en cada repetición se recogieron 7000 datos. Después de cada repetición los electrodos fueron pulidos mediante alúmina gruesa (referencia 1.01097.1000 de Merck) y posteriormente mediante alúmina fina (referencia: 319767-25g de Aldrich) siguiendo el método indicado en el apartado 5.3 del Capítulo 1.

Una vez hechas las 3 repeticiones se analizó la dispersión que presentaba cada una de ellas mediante el algoritmo descrito en el apartado 4.2.3 del Capítulo 1. Las repeticiones con una Dispersión Media con respecto a la Mediana DMM (ver Ecuación 43) mayor de 5 eran descartadas, llevándose a cabo una nueva medida. Este valor límite fue establecido en base a una tanda de ensayos previos

en los que se determinó que dispersiones mayores a 5 se debían a suciedad en los electrodos o a algún problema de contacto de los electrodos de trabajo o del electrodo de referencia con la muestra. A continuación, utilizando el formulario de Promediado de Repeticiones de la aplicación de PC (ver apartado 4.2.3 del Capítulo 1), se calculó el promedio de las tres repeticiones de forma que al final del proceso se obtuvo un fichero de ensayo para cada disolución.

Análisis de los datos

Una vez realizados todos los ensayos de la experiencia, los datos obtenidos (33 ficheros de ensayo promediados por cada ácido) fueron agrupados para generar la información necesaria para la creación de los modelos predictivos. Para ello se utilizó el formulario Generación de Fichero de Experiencia de la aplicación de PC (ver apartado 4.2.3 del Capítulo 1).

En primer lugar se analizó el comportamiento de todos los electrodos en conjunto. Con los datos correspondientes a las dos primeras tandas se generó el fichero experiencia de calibración y con los datos de la última tanda el de validación.

Con el fin de evaluar distintas metodologías de compresión de los datos de voltametría de pulsos se generaron diferentes lotes de ficheros de experiencia (cada lote incluía un fichero de calibración y un fichero de validación):

- Un primer lote en el que se utilizaron para cada disolución medida los 7000 valores recogidos por el sistema.
- Un segundo lote en el que se tomó únicamente 1 de cada 5 valores recogidos, es decir un total de 1400 valores por disolución.
- Un tercer lote en el que se guardó 1 de cada 10 valores recogidos (700 valores por disolución).
- Y por último un cuarto lote en el que, en lugar de los valores de la evolución temporal de la corriente, se incluyeron los coeficientes de aproximación polinómica de 4º orden de la señal de corriente en cada uno de los pulsos. Dado que cada tren de pulsos dispone de 25 pulsos y que cada pulso se representa mediante 5 coeficientes el número total de datos por disolución en este caso fue de 875.

También se evaluó la capacidad de predicción de cada uno de los electrodos por separado, para lo cual se generaron lotes de ficheros de experiencia específicos para cada electrodo con las cuatro técnicas de compresión.

Los ficheros de datos generados fueron procesados mediante la herramienta de análisis multivariante *PLS_Toolbox* de Eigenvector Research Inc. A los datos del set de calibración se les aplicó un análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) con el fin de generar el modelo predictivo. A continuación la fiabilidad y robustez del modelo construido fueron comprobadas con los datos del set de validación. Antes de procesar los datos mediante el algoritmo PLS, se les aplicó un preprocesado de autoescalado (ver apartado de la 6 Introducción). Durante el procesamiento de los datos mediante la herramienta PLS, y con el fin de establecer el número de variables óptimo para construir el modelo, se llevó a cabo una validación cruzada mediante el algoritmo de *Venetian Blinds* con un tamaño para los subconjuntos de test de 4 (ver apartado 6 de la Introducción). En la fase de validación la evaluación de los modelos se realizó mediante una gráfica de observado frente a predicho prestando especial atención a los siguientes parámetros:

- R^2 : coeficiente de determinación.
- RMSEP: error cuadrático medio de predicción.
- A: pendiente de la recta de tendencia.
- B: ordenada en el origen de tendencia.

3.2. Resultados y discusión

Estudio de la evolución temporal de las señales de corriente

Antes de proceder al análisis multivariante de los datos se llevó a cabo una inspección visual de los mismos en la que se apreció que existía una relación entre las señales de corriente recogidas y las concentraciones de las disoluciones. A modo de ejemplo, en la Figura 106 se muestra la evolución temporal de las señales de corriente correspondientes a disoluciones de ácido málico a distintas concentraciones para el caso del electrodo de Pt. En ella puede observarse como conforme la concentración de la disolución aumenta la amplitud de la señal de corriente también aumenta, especialmente en la zona de pulsos negativos del patrón. Además se observa que los pulsos en los que este

efecto se aprecia con mayor nitidez son pulsos que presentan una importante componente farádica. Esto indica que la diferencia en el comportamiento se debe en mayor medida a algún tipo de reacción y en menor medida a los efectos de doble capa eléctrica. Este comportamiento se explica analizando el voltograma cíclico de la Figura 100, en el que se observan, para valores negativos de tensión, los procesos de oxidación y reducción de los protones H^+ liberados por el ácido. Al aumentar la concentración de ácido, aumenta el número de protones liberados y, en consecuencia, la corriente asociada a las reacciones de oxidación-reducción de los mismos.

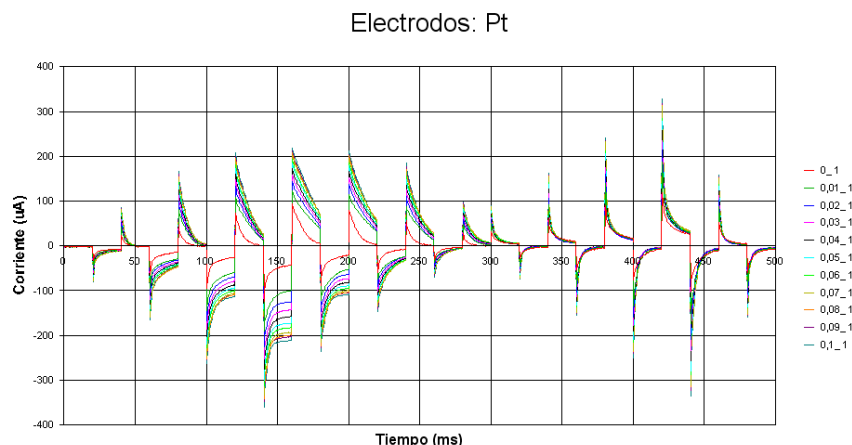


Figura 106. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de Pt para disoluciones de ácido málico de distintas concentraciones

En la Figura 107 se muestra la representación gráfica de la evolución temporal de la corriente medida para el caso del electrodo de Au en disoluciones de ácido ascórbico a distintas concentraciones. En este caso el aumento de la corriente en función de los niveles de concentración se produce exclusivamente para los pulsos positivos. La explicación de este fenómeno hay que buscarla en el voltograma de la Figura 101, en el cual se observa, como único proceso electroquímico de interés, la aparición de una corriente anódica en el electrodo de Au para potenciales positivos debida a la reacción de oxidación del ascórbico. Cuanto mayor sea la concentración de ácido ascórbico mayor será la corriente derivada de la reacción de oxidación.

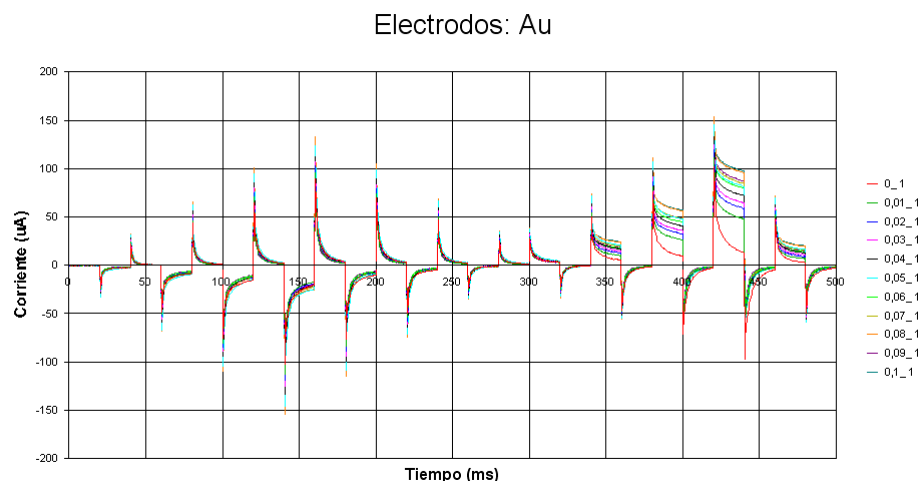


Figura 107. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de Au para disoluciones de ácido ascórbico de distintas concentraciones

Modelos de predicción mediante regresión por mínimos cuadrados parciales

En la Tabla 23 se muestran los resultados correspondientes a la validación de los modelos PLS generados a partir de los datos correspondientes a las medidas con ácido ascórbico. En dicha tabla se incluyen ocho filas (una para el conjunto de todos los electrodos y otras siete para cada uno de los electrodos) y cuatro columnas (una para el modelo en el que se incluyen todos los datos y otras tres para los modelos de los tres métodos de compresión de datos que se quieren evaluar).

En primer lugar se observa que todos los electrodos, excepto el Ir (que presenta un coeficiente de determinación bajo) y el Pt, permiten una buena predicción del ácido ascórbico en disoluciones simples, siendo el Ni y la Ag los metales que muestran el mejor coeficiente de determinación. El electrodo de Ag además presenta unos valores del RMSEP muy bajos y la recta de tendencia se aproxima mucho al comportamiento ideal (pendiente A cercana al 1 y ordenada en el origen B cercana al 0). Por otro lado, cuando se trabaja con todos los electrodos juntos (modo de lengua electrónica) los resultados son igualmente buenos, superando para el caso de la aproximación polinómica el comportamiento de la Ag.

Electrodo	Todos los puntos	1 de cada 5	1 de cada 10	Aproximación polinómica
Todos	R ² : 0,902 A: 1,0337 B: -0,0197 RMSEP: 0,0210 LV: 4	R ² : 0,893 A: 1,0785 B: -0,0053 RMSEP: 0,0121 LV: 3	R ² : 0,931 A: 1,0351 B: -0,0152 RMSEP: 0,0162 LV: 5	R ² : 0,990 A: 1,0304 B: -0,0037 RMSEP: 0,0041 LV: 3
Ir	R ² : 0,492 A: 0,5838 B: 0,0116 RMSEP: 0,0247 LV: 4	R ² : 0,389 A: 0,5901 B: 0,0300 RMSEP: 0,0284 LV: 4	R ² : 0,440 A: 0,6898 B: 0,0200 RMSEP: 0,0268 LV: 4	R ² : 0,0217 A: 0,0512 B: -0,0127 RMSEP: 0,0681 LV: 3
Rh	R ² : 0,862 A: 0,8088 B: -0,0191 RMSEP: 0,0311 LV: 3	R ² : 0,858 A: 0,7680 B: -0,0176 RMSEP: 0,0317 LV: 3	R ² : 0,839 A: 0,7117 B: -0,0156 RMSEP: 0,0329 LV: 3	R ² : 0,849 A: 0,8600 B: -0,0050 RMSEP: 0,0172 LV: 7
Pt	R ² : 0,615 A: 0,5213 B: -0,0100 RMSEP: 0,0394 LV: 6	R ² : 0,728 A: 0,8636 B: -0,0192 RMSEP: 0,0312 LV: 3	R ² : 0,808 A: 0,8902 B: -0,0186 RMSEP: 0,0279 LV: 3	R ² : 0,840 A: 0,9026 B: 0,0179 RMSEP: 0,0183 LV: 4
Au	R ² : 0,808 A: 0,8902 B: -0,0186 RMSEP: 0,0203 LV: 2	R ² : 0,814 A: 1,2818 B: -0,0063 RMSEP: 0,0227 LV: 2	R ² : 0,814 A: 1,3124 B: -0,0046 RMSEP: 0,0248 LV: 2	R ² : 0,846 A: 1,2769 B: -0,0021 RMSEP: 0,0226 LV: 2
Ag	R ² : 0,926 A: 0,9177 B: 0,0019 RMSEP: 0,0089 LV: 3	R ² : 0,930 A: 0,9258 B: 0,0047 RMSEP: 0,0084 LV: 2	R ² : 0,942 A: 0,9782 B: 0,0060 RMSEP: 0,0091 LV: 2	R ² : 0,969 A: 1,0968 B: -0,0082 RMSEP: 0,0077 LV: 6
Cu	R ² : 0,802 A: 0,9275 B: 0,0200 RMSEP: 0,0221 LV: 4	R ² : 0,769 A: 0,9598 B: 0,0221 RMSEP: 0,0261 LV: 4	R ² : 0,882 A: 0,9215 B: 0,0066 RMSEP: 0,0113 LV: 3	R ² : 0,895 A: 1,1469 B: -0,0242 RMSEP: 0,0214 LV: 9
Ni	R ² : 0,988 A: 1,1462 B: -0,0217 RMSEP: 0,0157 LV: 3	R ² : 0,990 A: 1,1276 B: -0,0076 RMSEP: 0,0056 LV: 2	R ² : 0,982 A: 1,1398 B: -0,0131 RMSEP: 0,0089 LV: 2	R ² : 0,914 A: 1,1203 B: -0,0192 RMSEP: 0,0175 LV: 10

Tabla 23. Resultados de la validación de los modelos PLS para el ácido ascórbico

En cuanto a los métodos de compresión de datos se observa que para cualquiera de los electrodos se obtienen valores de R^2 muy similares. Cuando el coeficiente de determinación es bueno utilizando todos los puntos también lo es tomando 1 de cada 5 puntos, tomando 1 de cada 10 puntos o utilizando los coeficientes de la aproximación polinómica. Incluso para el Pt se aprecia como el R^2 obtenido con los métodos de compresión de datos es sensiblemente mejor que el obtenido incluyendo en el estudio todos los puntos.

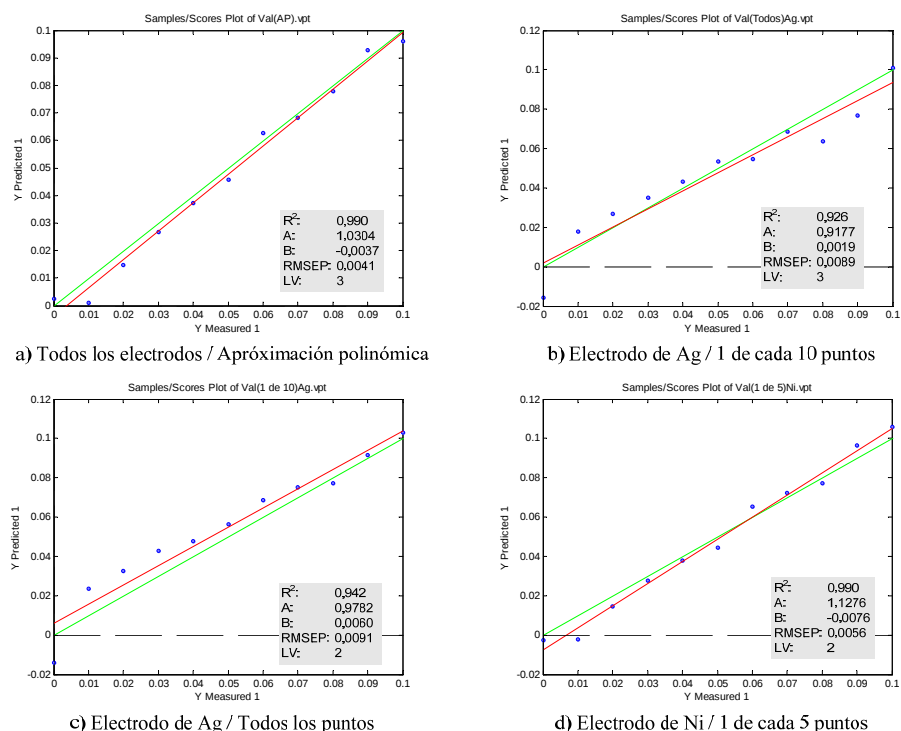


Figura 108. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para el ácido ascórbico

Para el caso del Ir los resultados son malos en los cuatro casos. Todo ello demuestra que los métodos de compresión de datos propuestos no afectan ostensiblemente al modelo generado permitiendo una reducción en el número de datos almacenados y procesados. Otra observación interesante es que para algunos de los modelos obtenidos a partir de los datos comprimidos mediante el método de aproximaciones sucesivas el número de variables latentes óptimo (establecido mediante el método de validación cruzada *Venetian Blinds*) es alto. Esto, en principio, podría producir efectos de sobre entrenamiento que darían lugar a malas predicciones de nuevos datos. Sin embargo, la aplicación del modelo al set de validación da buenos resultados con un R^2 y un RMSEP similares a los obtenidos en la validación de los modelos correspondientes a los otros métodos de compresión. A modo de ejemplo en la Figura 108 se han incluido las gráficas de observado frente a predicho para 4 casos: utilizando todos los electrodos y los coeficientes de aproximación polinómica (a), utilizando el electrodo de Ag e incluyendo 1 de cada 10 puntos (b), utilizando el

electrodo de Ag y tomando todos los puntos (c) y por último utilizando el electrodo de Ni e incluyendo uno de cada 5 puntos (d). En todos ellos se observa cómo el comportamiento de la recta de tendencia (recta roja) se asemeja mucho al comportamiento ideal (recta verde).

Electrodo	Todos los puntos	1 de cada 5	1 de cada 10	Aproximación polinómica
Todos	R ² : 0.949 A: 1.0733 B: 0.0032 RMSEP: 0.0107 LV: 4	R ² : 0.953 A: 1.0856 B: 0.0039 RMSEP: 0.0115 LV: 4	R ² : 0.960 A: 1.0872 B: 0.0038 RMSEP: 0.0111 LV: 4	R ² : 0.983 A: 1.0576 B: 0.0029 RMSEP: 0.0076 LV: 3
Ir	R ² : 0.973 A: 1.2181 B: -0.0018 RMSEP: 0.0131 LV: 2	R ² : 0.969 A: 1.2247 B: -0.0005 RMSEP: 0.0147 LV: 2	R ² : 0.963 A: 1.2390 B: 0.0003 RMSEP: 0.0163 LV: 2	R ² : 0.963 A: 1.0500 B: 0.0120 RMSEP: 0.0160 LV: 5
Rh	R ² : 0.962 A: 1.1420 B: -0.0176 RMSEP: 0.0135 LV: 4	R ² : 0.967 A: 1.1384 B: -0.0179 RMSEP: 0.0136 LV: 4	R ² : 0.971 A: 1.1511 B: -0.0212 RMSEP: 0.0157 LV: 4	R ² : 0.965 A: 0.9945 B: 0.0007 RMSEP: 0.0060 LV: 5
Pt	R ² : 0.980 A: 0.9268 B: -0.0066 RMSEP: 0.0114 LV: 3	R ² : 0.975 A: 0.9356 B: -0.0053 RMSEP: 0.0099 LV: 3	R ² : 0.977 A: 0.9425 B: -0.0052 RMSEP: 0.0095 LV: 3	R ² : 0.981 A: 1.1379 B: 0.0061 RMSEP: 0.0146 LV: 3
Au	R ² : 0.788 A: 0.9292 B: 0.0045 RMSEP: 0.0154 LV: 4	R ² : 0.742 A: 0.9948 B: 0.0099 RMSEP: 0.0209 LV: 2	R ² : 0.888 A: 0.9106 B: 0.0010 RMSEP: 0.0002 LV: 6	R ² : 0.793 A: 0.9199 B: -0.0010 RMSEP: 0.0159 LV: 4
Ag	R ² : 0.975 A: 0.9763 B: 0.0101 RMSEP: 0.0102 LV: 4	R ² : 0.979 A: 0.9985 B: 0.0091 RMSEP: 0.0101 LV: 4	R ² : 0.973 A: 1.0051 B: 0.0089 RMSEP: 0.0106 LV: 3	R ² : 0.974 A: 1.0440 B: 0.0069 RMSEP: 0.0106 LV: 2
Cu	R ² : 0.970 A: 0.9368 B: 0.0037 RMSEP: 0.0056 LV: 4	R ² : 0.983 A: 0.9804 B: 0.0038 RMSEP: 0.0050 LV: 5	R ² : 0.982 A: 1.0170 B: 0.0026 RMSEP: 0.0057 LV: 5	R ² : 0.987 A: 0.9956 B: 0.0040 RMSEP: 0.0052 LV: 5
Ni	R ² : 0.930 A: 1.0093 B: 0.0016 RMSEP: 0.0090 LV: 3	R ² : 0.944 A: 1.0278 B: 0.0026 RMSEP: 0.0089 LV: 3	R ² : 0.980 A: 1.1054 B: 0.0041 RMSEP: 0.0111 LV: 6	R ² : 0.994 A: 1.1059 B: 0.0044 RMSEP: 0.0106 LV: 7

Tabla 24. Resultados de la validación de los modelos PLS para el ácido cítrico

La Tabla 24 muestra los resultados de validación de los modelos PLS para el ácido cítrico. De forma general se observa que los resultados obtenidos con el cítrico son mejores que los obtenidos para el ascórbico. De hecho en este caso todos los electrodos excepto el Au presentan coeficientes de determinación por encima de 0,9 para todos los modos de compresión de datos. Además los valores de los RMSEP son sensiblemente inferiores a los obtenidos para el ácido ascórbico. Los electrodos con mejor comportamiento son el Cu, el Pt y el

Ni que presentan unos coeficientes de determinación altos combinados con unos valores del RMSEP bajos. El peor comportamiento corresponde al electrodo de Au cuyo R^2 para el caso en el se incluyen 1 de cada 5 puntos es de 0,742 con un RMSEP de 0,0209. De nuevo se observa que los resultados para los distintos métodos de compresión son muy similares y que la combinación de todos los electrodos da lugar a modelos robustos.

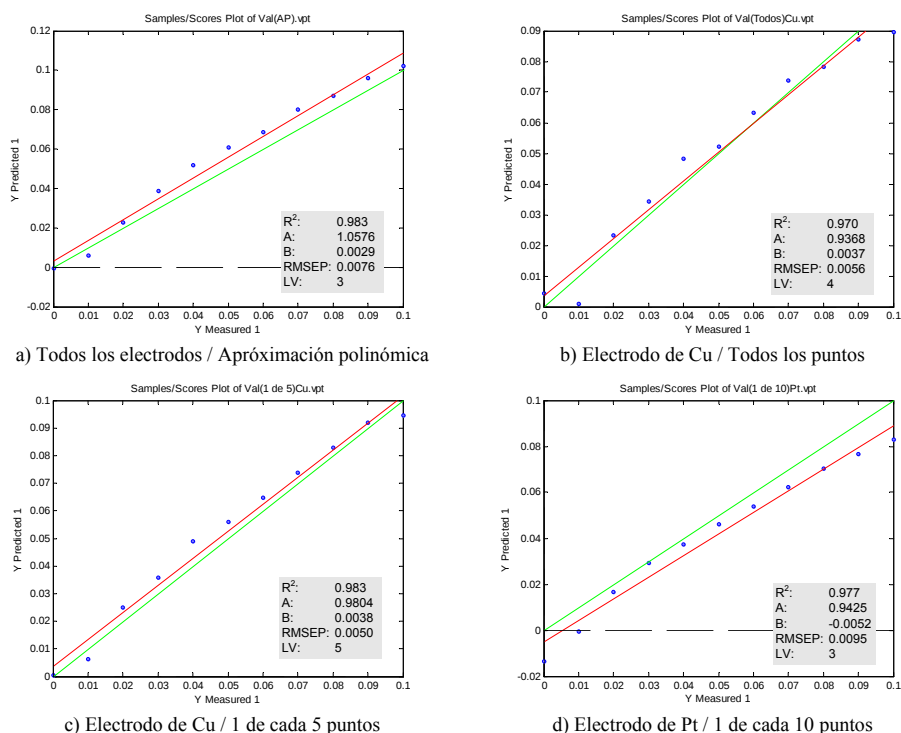


Figura 109. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para el ácido cítrico

Una muestra de los buenos resultados de predicción obtenidos para el ácido cítrico son las gráficas de observado frente a predicho que aparecen en la Figura 109. En ella se observa cómo para los 4 casos seleccionados la recta de tendencia está muy próxima a la recta de comportamiento ideal. Por ejemplo, la validación del modelo correspondiente al electrodo de Cu tomando 1 de cada 5 puntos (gráfica c)) presenta una recta de tendencia con una pendiente muy próxima al valor 1 (0,9804) y una ordenada en el origen muy baja (0,0038).

Electrodo	Todos los puntos	1 de cada 5	1 de cada 10	Aproximación polinómica
Todos	R ² : 0.987 A: 0.9496 B: 0.0064 RMSEP: 0.0055 LV: 3	R ² : 0.985 A: 0.9449 B: 0.0059 RMSEP: 0.0052 LV: 2	R ² : 0.988 A: 0.9677 B: 0.0046 RMSEP: 0.0046 LV: 2	R ² : 0.992 A: 1.0255 B: -0.0017 RMSEP: 0.0031 LV: 3
Ir	R ² : 0.989 A: 1.0578 B: -0.0015 RMSEP: 0.0042 LV: 7	R ² : 0.996 A: 1.0374 B: 0.0012 RMSEP: 0.0039 LV: 7	R ² : 0.981 A: 0.9987 B: -0.0018 RMSEP: 0.0048 LV: 3	R ² : 0.985 A: 1.0279 B: -0.0012 RMSEP: 0.0041 LV: 4
Rh	R ² : 0.979 A: 1.0232 B: -0.0007 RMSEP: 0.0048 LV: 7	R ² : 0.968 A: 0.9836 B: 0.0032 RMSEP: 0.0062 LV: 6	R ² : 0.980 A: 1.0378 B: 0.0010 RMSEP: 0.0056 LV: 6	R ² : 0.938 A: 1.0783 B: 0.0029 RMSEP: 0.0114 LV: 2
Pt	R ² : 0.995 A: 1.0313 B: 0.0015 RMSEP: 0.0041 LV: 4	R ² : 0.994 A: 1.0395 B: 0.0017 RMSEP: 0.0047 LV: 4	R ² : 0.990 A: 1.0773 B: -0.0022 RMSEP: 0.0045 LV: 4	R ² : 0.993 A: 1.1117 B: -0.0039 RMSEP: 0.0048 LV: 3
Au	R ² : 0.963 A: 1.0990 B: -0.0076 RMSEP: 0.0080 LV: 3	R ² : 0.937 A: 0.9482 B: 0.0003 RMSEP: 0.0083 LV: 2	R ² : 0.945 A: 0.9896 B: -0.0014 RMSEP: 0.0078 LV: 2	R ² : 0.982 A: 1.0892 B: -0.0049 RMSEP: 0.0055 LV: 5
Ag	R ² : 0.987 A: 0.9857 B: 0.0003 RMSEP: 0.0036 LV: 3	R ² : 0.988 A: 1.0674 B: -0.0042 RMSEP: 0.0044 LV: 6	R ² : 0.993 A: 1.0631 B: -0.0048 RMSEP: 0.0039 LV: 6	R ² : 0.969 A: 1.0068 B: 0.0005 RMSEP: 0.0057 LV: 5
Cu	R ² : 0.965 A: 0.9555 B: 0.0111 RMSEP: 0.0106 LV: 5	R ² : 0.959 A: 0.9412 B: 0.0126 RMSEP: 0.0116 LV: 4	R ² : 0.965 A: 0.9429 B: 0.0109 RMSEP: 0.0100 LV: 4	R ² : 0.982 A: 0.9515 B: 0.0014 RMSEP: 0.0044 LV: 3
Ni	R ² : 0.972 A: 0.9527 B: 0.0016 RMSEP: 0.0054 LV: 3	R ² : 0.982 A: 0.9861 B: -0.0001 RMSEP: 0.0044 LV: 3	R ² : 0.962 A: 1.0120 B: -0.0018 RMSEP: 0.0065 LV: 3	R ² : 0.995 A: 0.9619 B: 0.0045 RMSEP: 0.0036 LV: 6

Tabla 25. Resultados de la validación de los modelos PLS para el ácido málico

Los datos correspondientes a la validación de los modelos PLS construidos para la predicción del ácido málico se muestran en la Tabla 25. De los tres ácidos el ácido málico es el que mejor comportamiento presenta. En primer lugar los valores de R^2 de las validaciones sea cual sea el electrodo o el método de compresión están por encima del 0,900. En concreto el Pt presenta, para todos los métodos de compresión, unos R^2 superiores al 0,990 y unos RMSEP por debajo de 0,005. Los resultados de las validaciones para el caso de todos los electrodos son también muy buenos con R^2 superiores a 0,980 y valores de RMSEP inferiores o iguales a 0,0055, lo que confirma el buen funcionamiento del sistema en modo de lengua electrónica. Por último, todos los modos de compresión de datos ofrecen resultados similares. No hay un método que

presente claramente mejores resultados que el resto; para cada electrodo la técnica de compresión con mejores resultados de validación es diferente.

En la Figura 110 se muestran las gráficas de observado frente a predicho para 4 de los casos que mejor respuesta han dado. En los 4 casos se observa cómo la recta de tendencia está prácticamente alineada con la recta de comportamiento ideal.

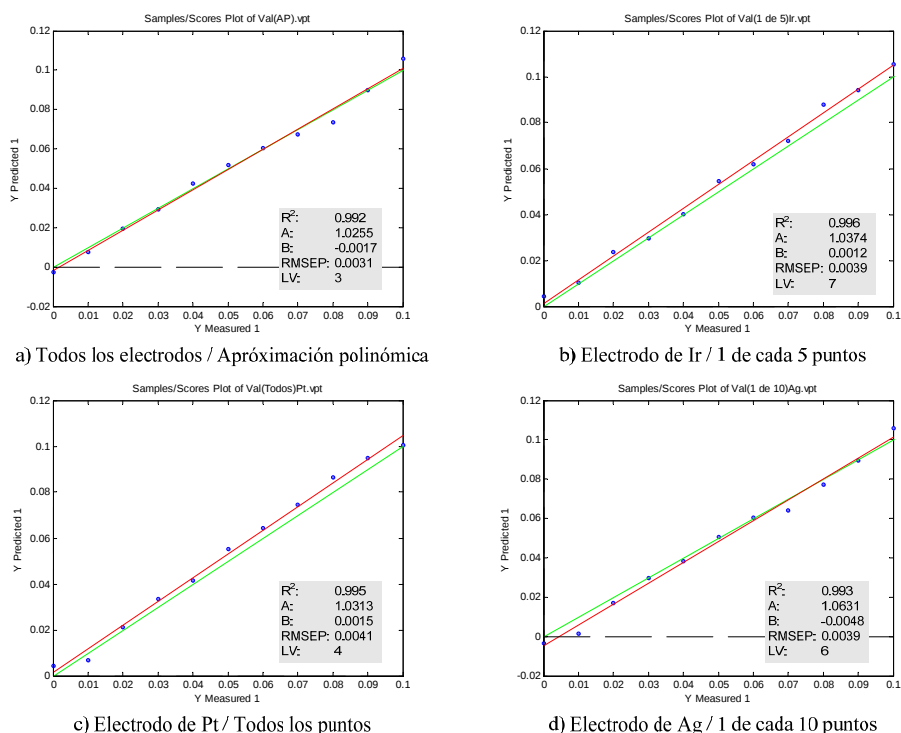


Figura 110. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para el ácido cítrico

3.3. Conclusiones

En este apartado se llevaron a cabo ensayos dirigidos a la generación de modelos de predicción de concentración de ácido ascórbico, cítrico y málico en disoluciones simples. Para cada ácido se realizaron tres tandas de ensayos sobre 11 disoluciones simples (base+ácido) con distintos grados de concentración. Con las dos primeras tandas se construyó un modelo de predicción mediante la herramienta de análisis multivariante PLS, mientras que la tercera tanda se

utilizó para la validación de dicho modelo. Se construyeron modelos para los distintos tipos de electrodos utilizados, así como para distintas técnicas de compresión de datos. De los resultados obtenidos en la validación de los modelos se derivan las siguientes conclusiones:

- La voltametría de pulsos es una técnica adecuada para la cuantificación de los tres ácidos en disoluciones simples. Para el ácido ascórbico el electrodo de Ag presentó los mejores resultados de validación, siendo también adecuado el electrodo de Ni. El ácido cítrico puede ser cuantificado de forma correcta con todos los electrodos menos con el de Au; siendo el Cu el electrodo que mejor comportamiento presenta con coeficientes de determinación por encima de 0,97 y errores cuadráticos medios de predicción inferiores a 0,006. En cuanto al ácido málico todos los electrodos dieron lugar a modelos de predicción robustos. Por último, cabe destacar que la configuración en lengua electrónica, es decir, la combinación de todos los electrodos, permitió obtener resultados de predicción al menos igual de buenos que el mejor de los electrodos.
- En cuanto a los 3 métodos de compresión de datos evaluados (tomar 1 de cada 5 puntos, tomar 1 de cada 10 puntos o aproximación polinómica de orden 4) dieron, para todos los modelos generados, resultados similares a los obtenidos utilizando todos los puntos de la evolución temporal de las señales de corriente. Se puede concluir, por tanto, que estos métodos permiten reducir el número de datos requeridos para la generación y aplicación del modelo sin afectar a la calidad del mismo. En determinados casos esto puede suponer una ventaja a la hora de construir el hardware ya que reduce los requerimientos del sistema en cuanto a memoria. Por otro lado el uso de esta técnica de compresión tiene la ventaja de filtrar las señales de corriente lo que elimina el ruido eléctrico que puedan contener.

En definitiva, queda demostrado que el sistema de lengua electrónica voltamétrica diseñado permite la cuantificación de los tres ácidos estudiados en disoluciones simples. Faltaría evaluar el sistema cuando los ácidos se encuentran en matrices complejas como zumos o frutas. En este caso los procesos electroquímicos en la interfaz electrodo-muestra se complican ya que hay más componentes que pueden reaccionar con el electrodo o afectar a los movimientos de cargas (efecto de doble capa eléctrica). Con objeto de profundizar en el estudio de los fenómenos derivados de la interacción de los

distintos componentes que pueden integrar las mencionadas matrices complejas (otros ácidos, azúcares, fibras, minerales, etc.), se puso en marcha una experiencia en la que se evaluó la posibilidad de cuantificar los mismos ácidos pero esta vez en mezclas binarias

4. Estudios de voltametría pulsos en disoluciones binarias

Una de las conclusiones importantes extraídas de los estudios de voltametría cíclica (ver apartado 2.3 de este capítulo) fue que el ácido ascórbico tiene un comportamiento electroquímico muy distinto al del cítrico y al del málico. Por tanto, parece razonable pensar que sería posible aplicar la técnica de voltametría de pulsos para la generación de modelos predictivos que permitiesen la cuantificación de los ácidos en disoluciones binarias de ascórbico con cualquiera de los otros dos ácidos. El objetivo fundamental de esta experiencia es, por tanto, la generación de estos modelos para disoluciones binarias de ascórbico-cítrico y ascórbico-málico. También se han llevado a cabo estudios en los que el pH se incorpora a los modelos como una tercera variable independiente con el fin de establecer en qué medida dicho parámetro afecta a la predicción de los ácidos.

4.1. Material y métodos.

Preparación de las disoluciones binarias

Para cada combinación de ácidos se realizaron tres tandas de medida (A, B y C). En cada tanda se prepararon 25 disoluciones con distintos niveles de concentración de cada ácido, tal y como se indica en la Tabla 26. Las disoluciones se prepararon a partir de una base de dihidrógeno fosfato de potasio KH_2PO_4 (referencia PO02600250 de Scharlau) al 0,01 M (pH 4.9 ± 0.1 ; σ $809.25 \pm 10 \mu\text{S/cm}$) y de los siguientes ácidos: ascórbico (referencia AC05150250 de Scharlau), cítrico monohidratado (referencia AC07200500 de Scharlau) y málico (referencia 86767 de Guinama).

Muestra	Disoluciones Asc-Cit		Disoluciones Asc-Mal	
	Ascórbico	Cítrico	Ascórbico	Málico
1	0 M (Base)	0 M (Base)	0 M (Base)	0 M (Base)
2	0 M (Base)	0,025 M	0 M (Base)	0,025 M
3	0 M (Base)	0,05 M	0 M (Base)	0,05 M
4	0 M (Base)	0,075 M	0 M (Base)	0,075 M
5	0 M (Base)	0,1 M	0 M (Base)	0,1 M
6	0,025 M	0 M (Base)	0,025 M	0 M (Base)
7	0,025 M	0,025 M	0,025 M	0,025 M
8	0,025 M	0,05 M	0,025 M	0,05 M
9	0,025 M	0,075 M	0,025 M	0,075 M
10	0,025 M	0,1 M	0,025 M	0,1 M
11	0,05 M	0 M (Base)	0,05 M	0 M (Base)
12	0,05 M	0,025 M	0,05 M	0,025 M
13	0,05 M	0,05 M	0,05 M	0,05 M
14	0,05 M	0,075 M	0,05 M	0,075 M
15	0,075 M	0,1 M	0,075 M	0,1 M
16	0,075 M	0 M (Base)	0,075 M	0 M (Base)
17	0,075 M	0,025 M	0,075 M	0,025 M
18	0,075 M	0,05 M	0,075 M	0,05 M
19	0,075 M	0,075 M	0,075 M	0,075 M
20	0,075 M	0,1 M	0,075 M	0,1 M
21	0,1 M	0 M (Base)	0,1 M	0 M (Base)
22	0,1 M	0,025 M	0,1 M	0,025 M
23	0,1 M	0,05 M	0,1 M	0,05 M
24	0,1 M	0,075 M	0,1 M	0,075 M
25	0,1 M	0,1 M	0,1 M	0,1 M

Tabla 26. Concentraciones de las disoluciones binarias de ácidos

Ensayos de voltimetría de pulsos y medidas de pH

Previamente a los ensayos de voltimetría de pulsos se realizó una medida de pH sobre cada una de las muestras (ver Tabla 27).

Muestra	pH disoluciones Asc-Cit			pH disoluciones Asc-Mal		
	A	B	C	A	B	C
1	4.84	4.94	4.75	4.94	4.67	5.02
2	2.28	2.25	2.09	2.28	2.29	2.33
3	2.16	2.08	1.90	2.08	2.08	2.08
4	1.99	2.11	1.98	1.97	2.07	1.93
5	1.95	1.89	1.98	1.89	2.03	1.94
6	2.87	2.89	2.81	2.76	2.77	2.75
7	2.43	2.29	2.16	2.23	2.23	2.27
8	2.02	2.18	1.99	2.06	2.10	2.08
9	2.04	2.13	1.89	1.96	2.02	1.97
10	2.02	1.87	1.77	1.92	1.93	1.90
11	2.67	2.66	2.64	2.55	2.56	2.57
12	2.25	2.41	2.11	2.19	2.19	2.15
13	2.08	2.10	1.95	2.05	2.07	2.04
14	1.97	2.09	1.79	1.95	1.97	1.94
15	1.85	1.97	1.76	1.89	1.91	1.87
16	2.68	2.64	2.47	2.45	2.47	2.44
17	2.23	2.56	2.08	2.15	2.18	2.13
18	2.06	2.22	1.94	2.01	2.1	2.01
19	1.96	1.98	1.88	1.94	1.93	1.90
20	1.84	1.98	1.90	1.91	1.89	1.82
21	2.51	2.53	2.41	2.38	2.40	2.35
22	2.20	2.23	2.08	2.13	2.13	2.09
23	1.93	2.08	2.01	2.01	2.01	1.97
24	1.92	1.93	1.90	1.91	1.92	1.89
25	1.79	1.99	1.81	1.93	1.87	1.81

Tabla 27. Valores de pH de las disoluciones binarias de ácidos

Para los ensayos de voltametría de pulsos se trabajó con el mismo patrón (ver Figura 105) y con la misma configuración de electrodos utilizados en la experiencia de las disoluciones simples (ver apartado 3.1 de este capítulo).

Al igual que en dicha experiencia, sobre cada disolución binaria se llevaron a cabo 3 repeticiones recogiendo por cada una de ellas 7000 valores correspondientes a la evolución temporal de la señal de corriente en los

electrodos de trabajo (7 electrodos, de cada uno de los cuales se tomaron 1000 muestras). Después de cada repetición los electrodos eran pulidos siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 5.3 del Capítulo 1. Sobre las repeticiones se hizo un estudio de dispersión aplicando la herramienta de la aplicación de PC descrita en el apartado 4.2.3 del Capítulo 1. Si alguna repetición presentaba una Dispersión Media con respecto a la Mediana (DMM) mayor de 5 los datos de dicha repetición eran descartados y se realizaba una nueva medida. Finalmente los valores de las 3 repeticiones para cada una de las disoluciones binarias medidas fueron promediados mediante el formulario Promediado Repeticiones de la aplicación de PC.

Análisis de los datos

Una vez finalizados los ensayos y promediados los datos de las repeticiones se obtuvieron 75 ficheros de ensayo para cada una de las 2 combinaciones de ácidos. Estos 75 ficheros correspondían a las 3 tandas de 25 disoluciones que se midieron. A partir de estos ficheros de ensayo, y mediante el formulario Generación de Ficheros de Experiencia de la aplicación de PC, se construyeron los ficheros de experiencia utilizados para el análisis multivariante.

En el apartado 3.3 de este capítulo se estableció que la diferencia de comportamiento electroquímico del ácido ascórbico con respecto al málico o al cítrico era más acentuada para potenciales positivos. Por ello, se decidió evaluar en qué medida el tipo de pulso aplicado podría afectar a los resultados del análisis multivariante. Para lo cual se generaron tres tipos de ficheros de experiencia: unos en los que se incluyeron todos los pulsos, otros en los que incluyeron solo los pulsos positivos y por último otros en los que solo aparecían los pulsos negativos. Dado que todas las técnicas de compresión de datos mostraron una buena efectividad en la generación de los modelos predictivos (ver apartado 3.2 de este capítulo), y que los resultados obtenidos fueron similares para las tres técnicas propuestas, en esta experiencia se optó por trabajar con los datos comprimidos. La técnica elegida fue la consistente en tomar 1 de cada 5 puntos porque permite reducir a una quinta parte el número de datos que deben manejarse en la generación y validación de los modelos pero al mismo tiempo describe con mayor fidelidad que las otras dos técnicas la evolución temporal de las señales de corriente.

Antes de proceder a la generación de los modelos de predicción y con objeto de tener una idea global del comportamiento del sistema se llevó a cabo un estudio

mediante análisis de componentes principales (PCA) con los datos de la primera tanda de medida. Mediante el formulario de Generación de Ficheros de experiencia se confeccionaron los ficheros de datos de experiencia. Para cada mezcla de ácidos (ascórbico-cítrico y ascórbico-málico) se generaron dos ficheros de experiencia: uno solo con los pulsos positivos y otro solo con los pulsos negativos. En ambos ficheros se incluyeron los datos de todos los electrodos (no se llevó a cabo un estudio PCA de cada electrodo por separado). Para realizar el análisis de componentes principales se utilizó el software *PLS_Toolbox*.

En cuanto al estudio mediante mínimos cuadrados parciales, los ficheros de experiencia necesarios para la generación de los modelos predictivos se construyeron a partir de los datos de las dos primeras tandas de ensayos (set de calibración); mientras que los ficheros utilizados en la validación del modelo se confeccionaron en base a los datos de la última tanda (set de validación). Además de los ficheros de experiencia con todos los electrodos se generaron ficheros de experiencia para cada electrodo por separado con el fin de evaluar cuáles de ellos permitían obtener mejores modelos de predicción. Y para cada caso, se construyeron tres tipos de ficheros de experiencia: uno con todos los pulsos, otro con los pulsos positivos y un último con los pulsos negativos. Dichos ficheros se procesaron con la herramienta de *PLS_Toolbox* siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 3.1 de este capítulo. En un primer estudio se aplicó un algoritmo PLS con dos variables dependientes correspondientes a la concentración de cada uno de los ácidos de la mezcla. Durante el proceso de calibración, y con el fin de establecer el número óptimo de variables latentes que debían incorporarse en el modelo, se llevó a cabo un algoritmo de validación cruzada de tipo *Ventian Blinds*, siendo 7 el tamaño de los subconjuntos de test. Este estudio se realizó sobre todos los ficheros de experiencia generados. A continuación, se estudió el efecto del pH sobre la predicción de los dos ácidos. Para ello se construyó un modelo con tres variables dependientes: las concentraciones de los dos ácidos presentes en la mezcla y el pH. En este caso únicamente se implementó un modelo considerando todos los electrodos y todos los pulsos. En el proceso de validación, la robustez de los modelos se evaluó mediante el estudio del coeficiente de determinación (R^2), el error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y la pendiente (A) y la ordenada en el origen (B) de la recta de tendencia del gráfico de observado frente a predicho.

4.2. Resultados y discusión

Estudio mediante análisis de componentes principales

En la Figura 111 se muestran diversos gráficos con la distribución de las muestras en el plano formado por las dos primeras componentes principales para el caso de las disoluciones binarias de ascórbico y cítrico.

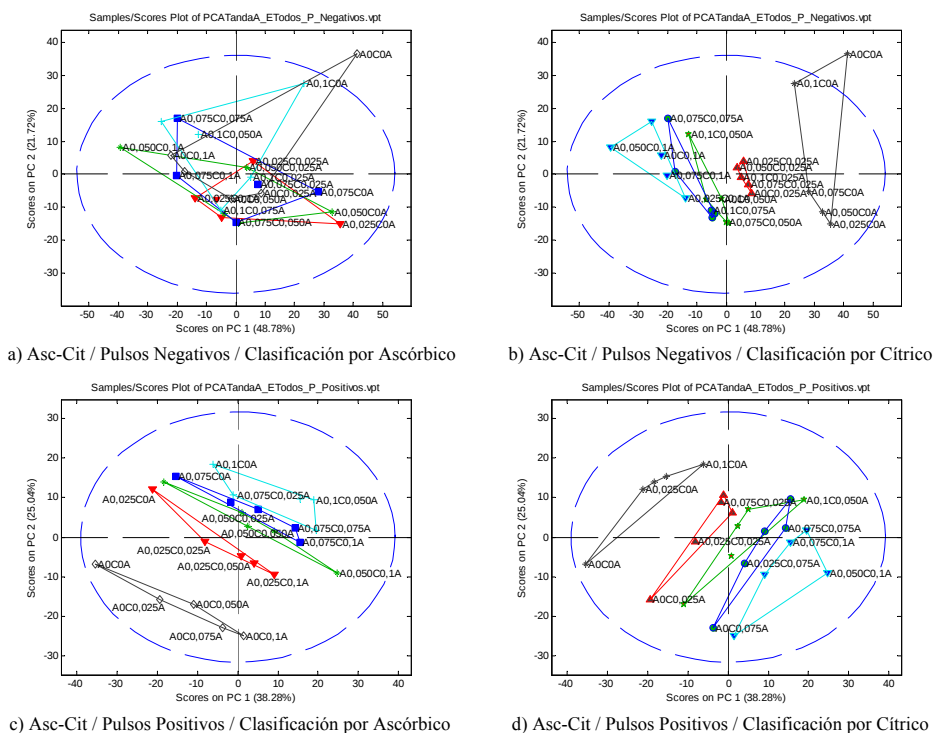


Figura 111. Gráficas de análisis PCA para las disoluciones binarias de ascórbico y cítrico

En las gráficas a) y b) se muestra el comportamiento del sistema cuando se utilizan solo los pulsos negativos mientras que c) y d) representa el comportamiento para pulsos positivos. En a) y c) las muestras se han agrupado en función de la concentración de ácido ascórbico mientras que en b) y d) la clasificación se realiza en base a la concentración de cítrico. Como puede apreciarse en a) cuando se trabaja con pulsos negativos los grupos de distintas

concentraciones de ascórbico se mezclan lo que implica que el sistema no es capaz de discriminar las concentraciones de ascórbico cuando se utilizan pulsos negativos. Sin embargo, en c) se distinguen claramente los distintos grupos de ascórbico, lo que significa que el uso de pulsos positivos sí que permite diferenciar las distintas concentraciones de ascórbico. Tanto en la gráfica b) como en la gráfica d) las clases de cítrico aparecen claramente separadas, lo que indica que el cítrico puede discriminarse tanto con pulsos positivos como con pulsos negativos.

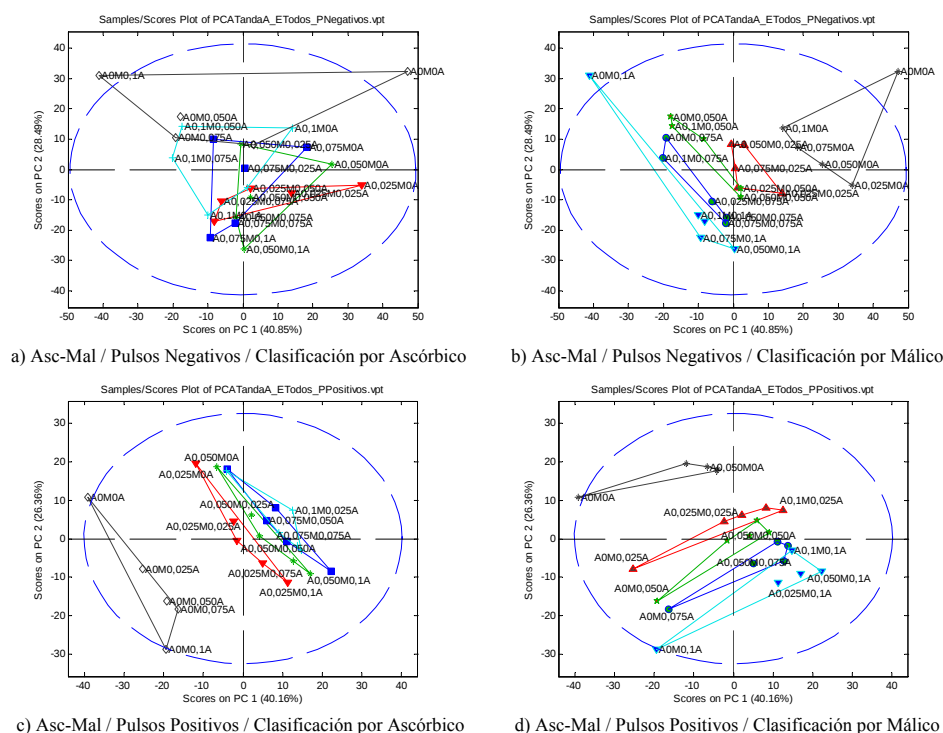


Figura 112. Gráficas de análisis PCA para las disoluciones binarias de ascórbico y málico

En la Figura 112 se representan el mismo tipo de gráficas pero esta vez para las mezclas de ascórbico y málico. Las conclusiones que se derivan de su estudio son muy similares. Las concentraciones de ascórbico solo pueden discriminarse mediante uso de pulsos positivos, mientras que la clasificación de las concentraciones de ácido málico puede lograrse tanto con pulsos positivos como con pulsos negativos.

Modelos de predicción mediante regresión por mínimos cuadrados parciales

En la Tabla 28 se muestran los resultados correspondientes a la validación de los modelos generados para las disoluciones binarias de ascórbico y málico. La tabla se compone de 8 filas: una por cada uno de los electrodos más la fila correspondiente al conjunto de todos los electrodos. Por otro lado, en la tabla aparecen dos grupos de tres columnas: un grupo corresponde a los resultados de validación del modelo para el ascórbico y el otro para el cítrico. En cada grupo hay tres columnas: una en la que se muestran los resultados de validación del modelo construido con los datos de todos los pulsos, otra con los resultados del modelo construido con los pulsos negativos únicamente y finalmente otra en la que se muestran los resultados del modelo correspondiente solo a los pulsos positivos.

De la observación de la primera columna de los datos de ascórbico se deduce que la determinación de la concentración de este ácido en mezclas con cítrico puede hacerse correctamente con los electrodos de Ir, Rh, Pt, Au y Ag o bien con una combinación de todos los electrodos. Sin embargo, los resultados de validación para el Cu y el Ni son muy malos (coeficientes de determinación cercanos a 0). Este hecho resulta curioso ya que el Cu y el Ni presentaron buenos comportamientos en las disoluciones simples, y supone la confirmación de que las interacciones que se producen entre los dos ácidos al ser mezclados afecta a su comportamiento electroquímico. En cuanto al ácido cítrico los resultados de validación de los modelos construidos con todos los pulsos son buenos para cada uno de los electrodos, aunque los R^2 obtenidos son por lo general ligeramente inferiores a los obtenidos para disoluciones simples.

El comportamiento de los modelos cuando solo se utilizan los pulsos negativos para el ácido ascórbico es muy malo presentando coeficientes de determinación muy bajos y valores altos del RMSEP. Sin embargo, cuando se trabaja con pulsos positivos los resultados de validación vuelven a ser buenos (excepto para el Cu y Ni) acercándose mucho a los valores de R^2 y RMSEP obtenidos cuando se utilizan todos los pulsos. Tal y como se comentó en el apartado 2.2 de este capítulo, del análisis de los estudios de voltametría cíclica se deduce que la diferencia fundamental entre el comportamiento electroquímico del ascórbico con respecto a los otros dos ácidos aparece a potenciales positivos (oxidación del ascórbico).

Electrodo	Ascórbico			Cítrico		
	Todos los pulsos	Solo pulsos negativos	Solo pulsos positivos	Todos los pulsos	Solo pulsos negativos	Solo pulsos positivos
Todos	R ² : 0.910 A: 1.0461 B: 0.0222 RMSEP: 0.0272 LV: 5	R ² : 0.552 A: 0.5969 B: 0.0208 RMSEP: 0.0238 LV: 8	R ² : 0.911 A: 1.1042 B: 0.0219 RMSEP: 0.0300 LV: 5	R ² : 0.897 A: 0.7733 B: 0.0126 RMSEP: 0.0123 LV: 5	R ² : 0.919 A: 0.7628 B: 0.0078 RMSEP: 0.0123 LV: 8	R ² : 0.899 A: 0.7666 B: 0.0098 RMSEP: 0.0124 LV: 5
Ir	R ² : 0.929 A: 0.8201 B: 0.0241 RMSEP: 0.0183 LV: 5	R ² : 0.282 A: 0.5200 B: 0.0055 RMSEP: 0.0386 LV: 4	R ² : 0.907 A: 0.8064 B: 0.0218 RMSEP: 0.0166 LV: 3	R ² : 0.931 A: 0.8091 B: 0.0096 RMSEP: 0.0103 LV: 5	R ² : 0.908 A: 0.8060 B: 0.0100 RMSEP: 0.0114 LV: 4	R ² : 0.912 A: 0.7993 B: 0.0076 RMSEP: 0.0115 LV: 3
Rh	R ² : 0.882 A: 1.0360 B: 0.0128 RMSEP: 0.0198 LV: 6	R ² : 0.375 A: 0.4241 B: 0.0334 RMSEP: 0.0285 LV: 2	R ² : 0.895 A: 0.9006 B: 0.0188 RMSEP: 0.0180 LV: 3	R ² : 0.890 A: 0.7898 B: 0.0020 RMSEP: 0.0150 LV: 6	R ² : 0.889 A: 0.7916 B: 0.0104 RMSEP: 0.0123 LV: 2	R ² : 0.925 A: 0.7883 B: 0.0082 RMSEP: 0.0112 LV: 3
Pt	R ² : 0.840 A: 0.9185 B: 0.0138 RMSEP: 0.0174 LV: 5	R ² : 0.623 A: 0.6338 B: 0.0288 RMSEP: 0.0241 LV: 3	R ² : 0.754 A: 0.8968 B: 0.0083 RMSEP: 0.0188 LV: 2	R ² : 0.932 A: 0.7809 B: 0.0109 RMSEP: 0.0108 LV: 5	R ² : 0.889 A: 0.7500 B: 0.0092 RMSEP: 0.0133 LV: 3	R ² : 0.913 A: 0.8145 B: 0.0105 RMSEP: 0.0111 LV: 2
Au	R ² : 0.872 A: 1.2549 B: 0.0225 RMSEP: 0.0401 LV: 4	R ² : 0.184 A: 0.3771 B: 0.0519 RMSEP: 0.0413 LV: 3	R ² : 0.859 A: 1.2960 B: 0.0240 RMSEP: 0.0443 LV: 4	R ² : 0.909 A: 0.8938 B: -0.0003 RMSEP: 0.0121 LV: 4	R ² : 0.851 A: 0.6979 B: 0.0199 RMSEP: 0.0156 LV: 3	R ² : 0.882 A: 0.9390 B: -0.0038 RMSEP: 0.0141 LV: 4
Ag	R ² : 0.926 A: 1.0764 B: 0.0072 RMSEP: 0.0156 LV: 5	R ² : 0.017 A: 0.0590 B: 0.0444 RMSEP: 0.0369 LV: 4	R ² : 0.915 A: 1.1368 B: 0.0011 RMSEP: 0.0154 LV: 5	R ² : 0.897 A: 0.7751 B: 0.0086 RMSEP: 0.0125 LV: 5	R ² : 0.845 A: 0.8616 B: 0.0076 RMSEP: 0.0139 LV: 4	R ² : 0.905 A: 0.7446 B: 0.0089 RMSEP: 0.0130 LV: 5
Cu	R ² : 0.074 A: 0.0765 B: 0.0416 RMSEP: 0.0343 LV: 3	R ² : 0.194 A: 0.0949 B: 0.0446 RMSEP: 0.0327 LV: 2	R ² : 0.018 A: 0.1182 B: 0.0415 RMSEP: 0.0443 LV: 7	R ² : 0.856 A: 0.7546 B: 0.0085 RMSEP: 0.0145 LV: 3	R ² : 0.828 A: 0.6735 B: 0.0119 RMSEP: 0.0165 LV: 2	R ² : 0.909 A: 0.7376 B: 0.0088 RMSEP: 0.0132 LV: 7
Ni	R ² : 0.009 A: 0.0579 B: 0.0548 RMSEP: 0.0403 LV: 4	R ² : 0.000 A: 0.0012 B: 0.0497 RMSEP: 0.0358 LV: 2	R ² : 0.030 A: 0.1431 B: 0.0377 RMSEP: 0.0420 LV: 4	R ² : 0.808 A: 0.7937 B: 0.0040 RMSEP: 0.0167 LV: 4	R ² : 0.795 A: 0.7417 B: 0.0094 RMSEP: 0.0165 LV: 2	R ² : 0.794 A: 0.8036 B: 0.0027 RMSEP: 0.0176 LV: 4

Tabla 28. Resultados de la validación de los modelos PLS para la mezcla de ácido ascórbico y ácido cítrico

Para potenciales negativos el ascórbico o no presenta ningún comportamiento característico o su comportamiento (incremento de corriente) es mucho menos acentuado que el de los otros dos ácidos. Es normal, por tanto, que los modelos de determinación de ácido ascórbico en mezclas con cítrico construidos solo con pulsos negativos presenten unos resultados de validación tan malos. Los modelos de predicción del ácido cítrico son buenos tanto cuando se trabaja con pulsos negativos como cuando se utilizan pulsos positivos. Por último, cabe destacar que la configuración de lengua electrónica (es decir, la combinación de

todos los electrodos) proporciona modelos tan robustos como el mejor de los modelos generados a partir de los electrodos por separado.

A modo de ilustración de lo anteriormente mencionado en la Figura 113 se muestran las gráficas de observado frente a predicho para el electrodo de plata. En a) y b) aparecen las gráficas para el ácido ascórbico para pulsos positivos y negativos respectivamente, mientras que c) y d) representan los resultados de validación del cítrico.

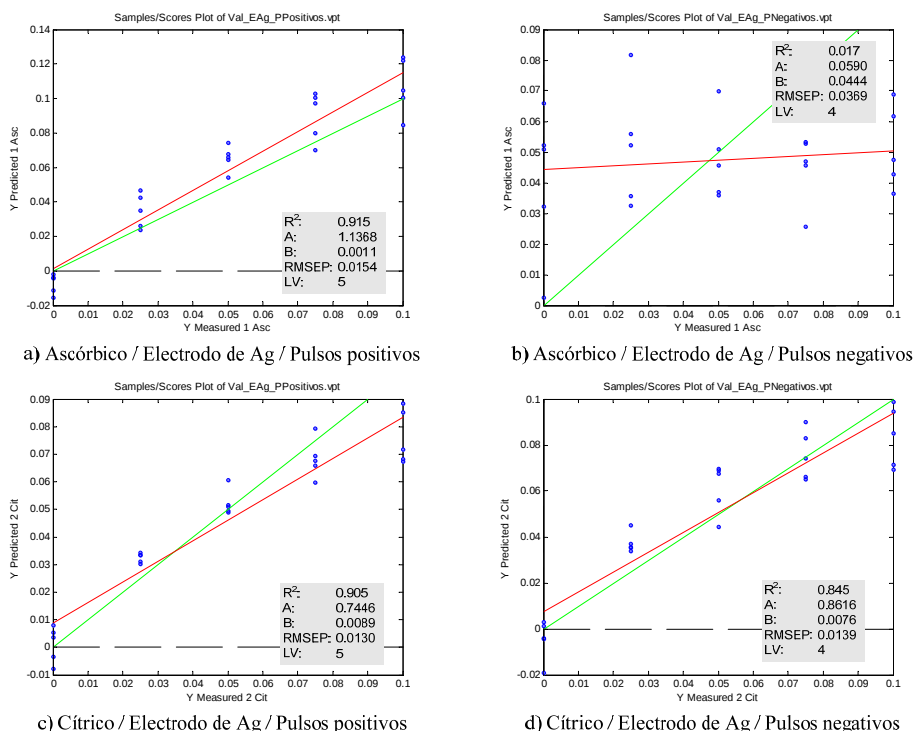


Figura 113. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para las mezclas binarias de ascórbico y cítrico

Mientras que la gráfica a) presenta un R^2 de 0,915 y una recta de tendencia cercana al comportamiento ideal, en la gráfica c) se puede apreciar una enorme dispersión de las muestras ($R^2=0,017$) y una recta de tendencia con una pendiente cercana al 0. En cuanto a las gráficas c) y d) ambas demuestran que el ácido cítrico puede ser predicho correctamente tanto con pulsos positivos como con pulsos negativos.

La Tabla 29 muestra los resultados de validación de los modelos construidos para las mezclas binarias de ascórbico y málico. Su estructura es análoga a la de la Tabla 28.

En primer lugar se observa que los resultados para el ascórbico utilizando todos los pulsos son sensiblemente peores a los obtenidos para las mezclas de ascórbico y cítrico. De hecho ningún electrodo presenta un R^2 superior a 0,8. Los electrodos de Cu y Ni siguen presentando muy malos resultados de validación (aunque el R^2 del Ni mejora con respecto a las mezclas con cítrico). En cuanto a las diferencias de comportamiento observadas al trabajar con pulsos positivos o con pulsos negativos se mantiene la misma tónica, es decir, la predicción de concentración de ascórbico en mezclas con málico no puede llevarse a cabo utilizando pulsos negativos. Debe hacerse mediante el uso de pulsos positivos si bien los R^2 obtenidos son menores que los obtenidos para las mezclas con cítrico.

Respecto a la determinación del ácido málico los resultados son buenos para todos los electrodos y para pulsos tanto negativos como positivos. Los coeficientes de determinación obtenidos están en la mayoría de los casos por encima de 0,900 y se puede decir que todos los modelos construidos presentan una robustez adecuada (exceptuando el modelo correspondiente al electrodo de Au para pulsos negativos cuyo R^2 es de 0,690). Se puede concluir que, en mezclas con ascórbico, el ácido málico puede ser cuantificado con mayor precisión que el ácido cítrico.

A modo de ilustración en la Figura 114 se muestran las gráficas de observado frente a predicho de la validación de modelos de predicción de las concentraciones de ascórbico y málico para el electrodo de Ag. Las gráficas a) y b) corresponden al ascórbico (con pulsos negativos y positivos respectivamente); mientras que las gráficas c) y d) se refieren al málico. En ellas se confirma lo mencionado anteriormente respecto de la incapacidad de predicción del ascórbico en los modelos construidos a partir de pulsos positivos. También se aprecia la robustez de los modelos de predicción de málico tanto con pulsos negativos como con pulsos positivos.

De nuevo se observa que la configuración en modo de lengua electrónica (combinación de todos los electrodos) presenta resultados de validación similares a los de los mejores electrodos.

Electrodo	Ascórbico			Málico		
	Todos los pulsos	Solo pulsos negativos	Solo pulsos positivos	Todos los pulsos	Solo pulsos negativos	Solo pulsos positivos
Todos	R ² : 0.742 A: 0.7430 B: 0.0146 RMSEP: 0.0180 LV: 6	R ² : 0.484 A: 0.5833 B: 0.0374 RMSEP: 0.0307 LV: 6	R ² : 0.764 A: 0.7609 B: 0.0075 RMSEP: 0.0178 LV: 5	R ² : 0.965 A: 0.8968 B: 0.0080 RMSEP: 0.0076 LV: 6	R ² : 0.958 A: 0.9097 B: 0.0033 RMSEP: 0.0076 LV: 6	R ² : 0.961 A: 0.9072 B: 0.0062 RMSEP: 0.0074 LV: 5
Ir	R ² : 0.700 A: 0.8110 B: 0.0119 RMSEP: 0.0201 LV: 4	R ² : 0.209 A: 0.0791 B: 0.0471 RMSEP: 0.0330 LV: 2	R ² : 0.715 A: 0.8421 B: 0.0082 RMSEP: 0.0196 LV: 4	R ² : 0.938 A: 1.0184 B: -0.0003 RMSEP: 0.0093 LV: 4	R ² : 0.899 A: 0.9229 B: 0.0053 RMSEP: 0.0114 LV: 2	R ² : 0.910 A: 0.9455 B: 0.0018 RMSEP: 0.0107 LV: 4
Rh	R ² : 0.684 A: 0.7395 B: 0.0111 RMSEP: 0.0201 LV: 3	R ² : 0.290 A: 0.3537 B: 0.0301 RMSEP: 0.0302 LV: 5	R ² : 0.695 A: 0.7590 B: 0.0069 RMSEP: 0.0204 LV: 3	R ² : 0.934 A: 0.8764 B: 0.0060 RMSEP: 0.0093 LV: 3	R ² : 0.925 A: 0.9195 B: 0.0019 RMSEP: 0.0099 LV: 5	R ² : 0.922 A: 0.8075 B: 0.0057 RMSEP: 0.0114 LV: 3
Pt	R ² : 0.689 A: 0.6641 B: 0.0175 RMSEP: 0.0198 LV: 4	R ² : 0.290 A: 0.3303 B: 0.0306 RMSEP: 0.0300 LV: 5	R ² : 0.721 A: 0.7059 B: 0.0178 RMSEP: 0.0189 LV: 3	R ² : 0.902 A: 0.8424 B: 0.0056 RMSEP: 0.0115 LV: 4	R ² : 0.894 A: 0.8504 B: 0.0041 RMSEP: 0.0121 LV: 5	R ² : 0.902 A: 0.8062 B: 0.0073 RMSEP: 0.0119 LV: 3
Au	R ² : 0.787 A: 0.6216 B: 0.0068 RMSEP: 0.0214 LV: 4	R ² : 0.131 A: 0.0750 B: 0.0387 RMSEP: 0.0343 LV: 2	R ² : 0.793 A: 0.6015 B: 0.0099 RMSEP: 0.0204 LV: 4	R ² : 0.865 A: 0.7237 B: 0.0071 RMSEP: 0.0156 LV: 4	R ² : 0.690 A: 0.5152 B: 0.0109 RMSEP: 0.0249 LV: 2	R ² : 0.821 A: 0.6771 B: 0.0102 RMSEP: 0.0170 LV: 4
Ag	R ² : 0.770 A: 0.7447 B: 0.0185 RMSEP: 0.0179 LV: 4	R ² : 0.034 A: 0.0575 B: 0.0584 RMSEP: 0.0368 LV: 2	R ² : 0.773 A: 0.8319 B: 0.0070 RMSEP: 0.0171 LV: 4	R ² : 0.936 A: 0.8798 B: 0.0091 RMSEP: 0.0097 LV: 4	R ² : 0.898 A: 0.8548 B: 0.0133 RMSEP: 0.0129 LV: 2	R ² : 0.926 A: 0.8916 B: 0.0066 RMSEP: 0.0098 LV: 4
Cu	R ² : 0.072 A: 0.3271 B: 0.0538 RMSEP: 0.0520 LV: 9	R ² : 0.234 A: 0.2874 B: 0.0506 RMSEP: 0.0346 LV: 3	R ² : 0.076 A: 0.1353 B: 0.0489 RMSEP: 0.0353 LV: 3	R ² : 0.918 A: 0.8614 B: 0.0129 RMSEP: 0.0119 LV: 9	R ² : 0.913 A: 0.7415 B: 0.0181 RMSEP: 0.0133 LV: 3	R ² : 0.888 A: 0.8691 B: 0.0161 RMSEP: 0.0153 LV: 3
Ni	R ² : 0.321 A: 0.3566 B: 0.0429 RMSEP: 0.0311 LV: 3	R ² : 0.298 A: 0.3923 B: 0.0440 RMSEP: 0.0332 LV: 3	R ² : 0.285 A: 0.2528 B: 0.0455 RMSEP: 0.0310 LV: 2	R ² : 0.933 A: 0.9171 B: 0.0071 RMSEP: 0.0096 LV: 3	R ² : 0.933 A: 0.9349 B: 0.0061 RMSEP: 0.0096 LV: 3	R ² : 0.923 A: 0.9091 B: 0.0085 RMSEP: 0.0106 LV: 2

Tabla 29. Resultados de la validación de los modelos PLS para la mezcla de ácido ascórbico y ácido málico

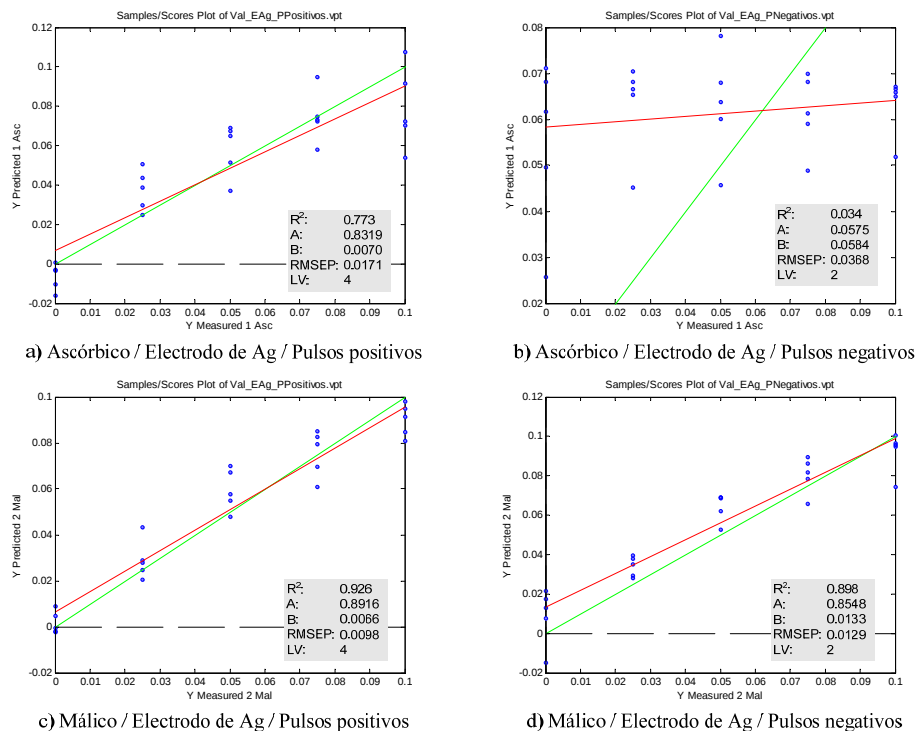


Figura 114. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para las mezclas binarias de ascórbico y málico

Estudio del efecto del pH sobre la predicción de los ácidos

Con el fin de comprobar cómo el pH puede afectar a la predicción de los ácidos en disoluciones binarias de ascórbico y cítrico se construyó un modelo en el que el pH se introdujo como tercera variable dependiente, es decir, un modelo capaz de predecir simultáneamente la concentración de ascórbico, de cítrico y de los protones H^+ (10^{-pH}). Para este estudio se incluyeron todos los electrodos y todos los pulsos. En la Figura 115 se muestran las gráficas de observado frente a predicho correspondientes a dicho modelo.

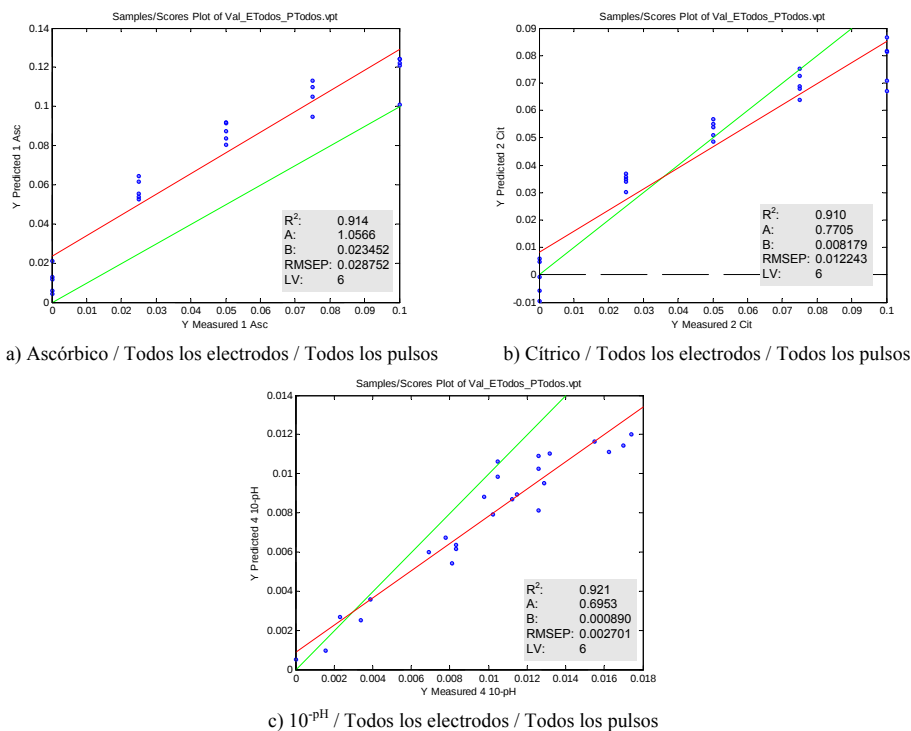


Figura 115. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para las mezclas binarias de ascórbico y cítrico incluyendo el pH como variable dependiente

Como puede apreciarse el modelo generado es capaz de predecir adecuadamente los tres parámetros. De hecho los valores de R^2 y RMSEP para las predicciones de la concentración de ascórbico y cítrico son similares a los obtenidos con el modelo en el que no se consideró el pH (ver Tabla 28). Además la validación del modelo para la concentración de protones H^+ presenta un coeficiente de determinación de 0,921 y un error cuadrático medio de 0,0027. Todo ello demuestra que el sistema diseñado, trabajando en configuración de lengua electrónica (todos los electrodos), es capaz de predecir estos tres parámetros de forma independiente, es decir, la cuantificación de la concentración de los ácidos no está condicionada por el pH.

La Figura 116 muestra las gráficas de observado frente a predicho de un modelo construido con los datos de todos los electrodos y todos los pulsos como variables independientes y los valores de la concentración de ascórbico, málico

y protones H^+ (10^{-pH}) como variables dependientes. Al igual que ocurre con las mezclas de ascórbico y cítrico, las predicciones de concentración de ascórbico y málico presentan valores de R^2 y RMSEP similares a los obtenidos en los modelos del estudio realizado únicamente con dos variables dependientes (ver Tabla 29). En cuanto a la concentración de los protones H^+ , la predicción es incluso mejor que la obtenida para las mezclas de ascórbico y cítrico, probándose de esta manera que la cuantificación de los ácidos en las disoluciones binarias de ascórbico y málico tampoco se ve afectada por el pH.

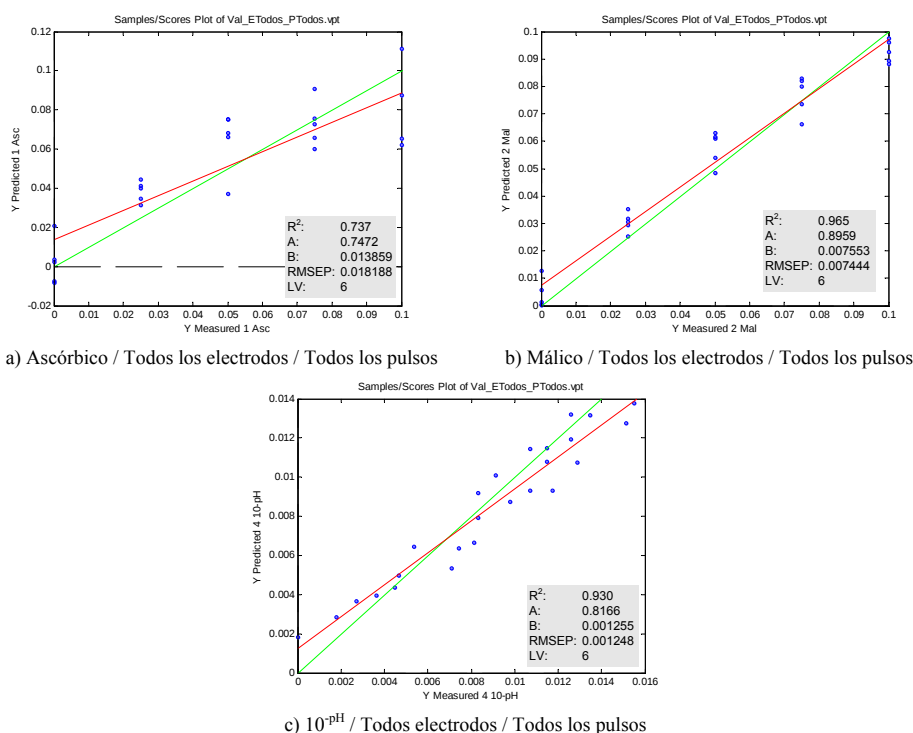


Figura 116. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS para las mezclas binarias de ascórbico y málico incluyendo el pH como variable dependiente

4.3. Conclusiones

Las experiencias llevadas a cabo en este apartado tuvieron como objetivo determinar la capacidad del sistema para generar modelos que permitiesen la predicción de concentraciones de ácidos en mezclas binarias. Para ello se pusieron en marcha dos experiencias: una con mezclas binarias de ascórbico y cítrico y la otra con mezclas de ascórbico y málico. Para ambas experiencias se llevaron a cabo 3 tandas de ensayos en cada una de las cuales se midieron 25 disoluciones con distintas concentraciones de ambos ácidos. En primer lugar se realizó un análisis mediante componentes principales sobre los datos de la primera tanda de medidas. A continuación se utilizaron las dos primeras tandas para generar modelos predictivos mediante PLS; y se utilizó la tercera tanda para validarlos. Con el fin de establecer la capacidad de discriminación y cuantificación del sistema en función del tipo de pulso utilizado, los estudios se llevaron a cabo para tres casos: utilizando todos los pulsos, utilizando solo los pulsos negativos y utilizando solo los pulsos positivos. También se construyeron modelos incorporando la concentración de protones H^+ como tercera variable dependiente para evaluar hasta qué punto el pH afectaba a las predicciones de los ácidos. Las conclusiones que se extrajeron de estos estudios fueron:

- El sistema diseñado permite la discriminación y la cuantificación de los ácidos ascórbico, cítrico y málico en mezclas binarias tanto de ascórbico-cítrico como de ascórbico-málico. La cuantificación no resulta por lo general tan precisa como lo era en disoluciones simples pero los resultados obtenidos son aceptables para el ácido ascórbico (con excepción de los electrodos de Cu y Ni), buenos para el ácido cítrico y muy buenos para el ácido málico. Este empeoramiento de los resultados de validación se debe a las interacciones entre los ácidos, que producen cambios en los procesos electroquímicos que se desarrollan en la interfaz electrodo-mezcla. El comportamiento de los modelos de predicción del ácido ascórbico en las mezclas con málico empeora ligeramente respecto a las mezclas con cítrico; lo que seguramente indica que las interacciones ascórbico-málico producen un mayor enmascaramiento del ascórbico que las interacciones ascórbico-cítrico.
- Los modelos construidos a partir de pulsos negativos exclusivamente presentan, en el caso del ascórbico, un comportamiento malo no siendo

viable la cuantificación de su concentración en dichas condiciones. Es necesario recurrir a los pulsos positivos para poder construir modelos de predicción fiables. Este hecho se debe a que el ácido ascórbico no presenta un comportamiento electroquímico a potenciales negativos que le permita diferenciarse de los otros dos ácidos. Sin embargo, a potenciales positivos la reacción de oxidación del ascórbico descrita en el apartado 2.2 de este capítulo supone una clara diferencia de comportamiento entre este ácido y los otros dos. Por otro lado, los modelos para el cítrico y el málico presentan resultados de validación similares tanto para pulsos negativos como positivos.

- En todos los casos se observa que la configuración de lengua electrónica (combinación de todos los electrodos) da lugar a modelos de predicción tan fiables como los obtenidos con los mejores electrodos. La fiabilidad de dichos modelos implica que dicha configuración es válida para su aplicación a la cuantificación de estos ácidos en mezclas; sin embargo al no apreciarse ninguna mejora apreciable, cabría plantearse la posibilidad de reducir el número de electrodos utilizados, lo que abarataría el sistema, simplificaría el procedimiento de ensayo y disminuiría su duración.
- Los modelos construidos incluyendo la concentración de protones H^+ como tercera variable dependiente dieron lugar a predicciones de los ácidos fiables, lo que demuestra que su cuantificación no está condicionada por el pH.

Se ha demostrado, por lo tanto, que el sistema diseñado permite la cuantificación de los ácidos ascórbico, cítrico y málico en mezclas binarias. Sin embargo, las matrices complejas sobre las que se quiere llevar a cabo las determinaciones (zumos y frutas) incorporan más componentes como azúcares polifenoles, fibras, minerales, etc. que afectarán de forma significativa al comportamiento electroquímico del conjunto. Es por tanto necesario investigar las interacciones entre estos nuevos compuestos y los ácidos para determinar qué electrodos y qué tipo de pulsos permitirán una mejor discriminación entre todos los elementos de la matriz.

Capítulo 3. Aplicación a la detección de glifosato

El objetivo de este capítulo es estudiar la aplicabilidad del sistema de lengua electrónica diseñado a la detección del glifosato. En concreto se pretende desarrollar modelos de predicción que permitan establecer la concentración de glifosato en disoluciones simples.

El capítulo se ha dividido en tres partes:

- En el apartado de Introducción se describe la importancia de desarrollar un sistema para la detección del glifosato que puedan trabajar on-line y se hace un repaso de cuáles han sido hasta la fecha las metodologías empleadas.
- En el segundo apartado se evalúa la posibilidad de obtener modelos predictivos para la concentración del glifosato mediante el sistema diseñado utilizando 8 electrodos nobles y no nobles en configuración de lengua electrónica (ET). A partir de los resultados obtenidos se establecen cuáles son los materiales más adecuados para la detección del glifosato mediante técnicas voltamétricas.
- En el tercer apartado se intenta mejorar la resolución en la determinación de la concentración de glifosato. Para ello se repite la experiencia del apartado anterior pero en este caso utilizando únicamente aquellos electrodos de trabajo que mejor resultado dieron. Por otro lado, y con el objeto de maximizar la señal en corriente para aumentar la resolución de la medida, los ensayos se llevan a cabo con los electrodos de trabajo en configuración RDE (electrodo rotatorio).

1. Introducción

El Glifosato (ácido fosfonometil amino acético $C_3H_8NO_5P$ ver Figura 117) es un herbicida sistémico, no selectivo, de amplio espectro y de extensa aplicación en agricultura [160]. Aunque tradicionalmente se ha considerado al glifosato como un compuesto de baja toxicidad, recientes estudios han demostrado su capacidad de producir efectos cancerígenos en células humanas a determinados niveles de concentración [161].

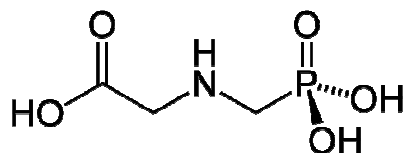


Figura 117. Fórmula estructural del glifosato

Existe una estricta normativa sobre el uso del glifosato tanto en España [162] como en la Unión Europea [163], pero en algunos países de Asia y América su uso no está tan controlado. Recientemente se han desarrollado variedades de cultivos que han sido modificados genéticamente para ser resistentes a este herbicida; lo que permite que, en dichos países, su aplicación pueda llevarse a cabo mediante aspersión con avioneta. Este modo de aplicación presenta el riesgo de que el herbicida acabe depositándose en otras zonas fuera del cultivo afectado al agua, suelo, flora, fauna y también de manera directa e indirecta al ser humano [164].

Por todo ello, resulta de gran interés establecer mecanismos que permitan la monitorización de este herbicida en distintos ámbitos (agua, pescado, frutas, verduras y otros). Sin embargo, la detección y cuantificación del glifosato presenta ciertas dificultades debido a su alta solubilidad en agua, su insolubilidad en disolventes orgánicos, su alta pureza y su baja volatilidad [160][164][165][166]. Los métodos más comúnmente utilizados para la determinación del glifosato son complejos y costosos, y por lo general requieren un proceso de derivatización pre o post columna.

En los últimos años han aparecido nuevas metodologías de medida que incorporan técnicas electroquímicas y eliminan la necesidad de procesos de derivatización. En [164], por ejemplo, se combina la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con técnicas voltamétricas aplicadas a un electrodo de oro para determinar concentraciones de glifosato de $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Igualmente, Coutinho et al. en [167] y Sato et. al. en [168] asocian técnicas electroquímicas con HPLC. En [167] la técnica electroquímica utilizada es la coulombimetría controlada por tensión aplicada a un electrodo de cobre; mientras que en [168] se utiliza la voltametría cíclica y la cronoamperometría en electrodos de oro.

En [165] Jin et al. aplican una señal senoidal superpuesta con una rampa de tensión a un electrodo de carbono modificado y miden simultáneamente la

corriente generada y la electroluminiscencia derivada de la reacción entre el glifosato y la superficie modificada del electrodo. Esta técnica permite la detección del glifosato sin necesidad de procesos de derivatización. Una metodología similar es empleada en [166], esta vez aplicada a un electrodo de indio-óxido de estaño (ITO).

Estos trabajos, a pesar de obtener niveles de detección muy bajos, presentan el inconveniente de combinar las técnicas electroquímicas con otras técnicas más complejas que ralentizan y encarecen los procedimientos de medida y obligan a que su desarrollo se lleve a cabo en un laboratorio. Un método de detección basado exclusivamente en técnicas electroquímicas sencillas permitiría implementar procedimientos analíticos rápidos, económicos e “in situ”. En este sentido en [169] se presentan unos electrodos de NiAl-LDH que mediante voltametría cíclica permiten la cuantificación del glifosato en el rango de concentraciones de 0,01 mM a 0,9 mM. Por último, Sierra et al. aplican la voltametría cíclica a electrodos de cobre y de hidróxido de níquel para determinar concentraciones de glifosato en un rango de 0,3 a 4,1 mM [160].

Otros trabajos van encaminados a la búsqueda de nuevos electrodos que permitan mejorar el nivel de resolución en las determinaciones de concentración del herbicida. Ensayos de voltametría se llevan a cabo sobre un electrodo de trabajo de platino en presencia partículas de carbonato de plata en [170] con el fin de facilitar la detección del glifosato. En [171] y [172] se analiza el comportamiento del cobre en de presencia del glifosato en ensayos de voltametría y cronoamperometría. La conclusión de este trabajo es que el glifosato altera el comportamiento electroquímico del cobre, lo que abre las puertas al uso de este material para su cuantificación. Songa et al. presentan en [173] un trabajo en el que se utilizan biosensores y la técnica de voltametría cíclica para la detección del glifosato. En primer lugar se hace interaccionar el biosensor con el glifosato, y a continuación, se le aplica voltametría cíclica en una disolución de H_2O_2 . Los resultados del estudio demuestran que el glifosato altera el comportamiento electroquímico del biosensor, lo que permite su detección hasta un límite de $1,7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Aquino et al. estudian en [174] el proceso de electro-oxidación del glifosato sobre electrodos de RuO_2 y IrO_2 en función del pH, la base utilizada y la densidad de corriente con el objeto de diseñar un técnica que permita la eliminación del glifosato en el tratamiento de aguas residuales

El objetivo de este capítulo es aplicar la voltametría de pulsos para generar modelos de predicción que permitan la cuantificación del glifosato utilizando el equipo diseñado. En una primera experiencia los ensayos se llevan a cabo utilizando como electrodos de trabajo 8 metales puros. La finalidad es establecer si la configuración en lengua electrónica presenta alguna ventaja con respecto al uso individual de los electrodos y determinar qué materiales son más adecuados para la detección del glifosato. En la segunda experiencia se intenta mejorar la resolución de la medida mediante el uso de electrodos rotatorios (RDE).

2. Experiencia con electrodos en configuración de lengua electrónica

Una primera aproximación a la generación de un sistema que permita la detección del glifosato mediante una lengua electrónica voltamétrica es establecer qué materiales son los más adecuados para la construcción de los electrodos. Con ese fin se planteó una experiencia en la que disoluciones de glifosato en distinto grado de concentración fueron medidas mediante el sistema diseñado utilizando 8 electrodos de trabajo de distintos metales nobles y no nobles. También se evaluó la viabilidad del uso de la configuración de lengua electrónica (varios electrodos) para la cuantificación de este herbicida.

2.1. Materiales y métodos

Preparación de las disoluciones

Las disoluciones se prepararon sobre una base de sodio di-hidrogeno fosfato anhidro NaH_2PO_4 (referencia SO0330 de Sharlau) a una concentración de 0,1 M y con un pH regulado a 6,7 en la que se diluyó glifosato $\text{C}_3\text{H}_8\text{NO}_5\text{P}$ (referencia M12086870 de Molekula) a distintas concentraciones. En total se llevaron a cabo 3 tandas de medidas, en cada una de las cuales se midieron 11 muestras. Las concentraciones de las disoluciones utilizadas para las tres tandas se detallan en la Tabla 30.

En las publicaciones consultadas, la voltametría cíclica permitía cuantificar la concentración de glifosato hasta niveles de concentración de 10^{-5} M. En esta experiencia se intentó aplicar la voltametría de pulsos para alcanzar

resoluciones similares; de ahí que se eligiesen concentraciones en el rango de $5 \cdot 10^{-3}$ M a $2,5 \cdot 10^{-5}$ M.

Muestra	Concentración de ácido
1	0 M (Base)
2	$2,5 \cdot 10^{-5}$ M
3	$5 \cdot 10^{-5}$ M
4	$0,625 \cdot 10^{-4}$ M
5	$1,25 \cdot 10^{-4}$ M
6	$2,5 \cdot 10^{-4}$ M
7	$5 \cdot 10^{-4}$ M
8	$0,625 \cdot 10^{-3}$ M
9	$1,25 \cdot 10^{-3}$ M
10	$2,5 \cdot 10^{-3}$ M
11	$5 \cdot 10^{-3}$ M

Tabla 30. Concentraciones de las disoluciones simples de ácidos

Configuración de los ensayos de voltametría de pulsos

Partiendo de la información extraída de las publicaciones consultadas y de los resultados de ensayos previos de voltametría cíclica se estableció un patrón de 9 pulsos cuyas amplitudes se corresponden con valores de tensión característicos del glifosato. Dado que en este caso el interés del estudio se centraba en los procesos farádicos, se eligió una duración de pulso de 40 ms lo que permitía estudiar la evolución de las corrientes derivadas de dichos procesos (ver Figura 118).

La configuración de electrodos para esta experiencia fue:

- Electrodos de trabajo: dos lenguas electrónicas (ET) una de metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) y la otra de metales no nobles (Ag, Co, Cu y Ni), tal y como se describe en el apartado 5.1 del Capítulo 1.
- Contraelectrodo: estructura cilíndrica de acero inoxidable de las ET's.
- Electrodo de referencia: electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical)

El montaje experimental fue similar la utilizado para las experiencias de antioxidantes (ver Figura 96).

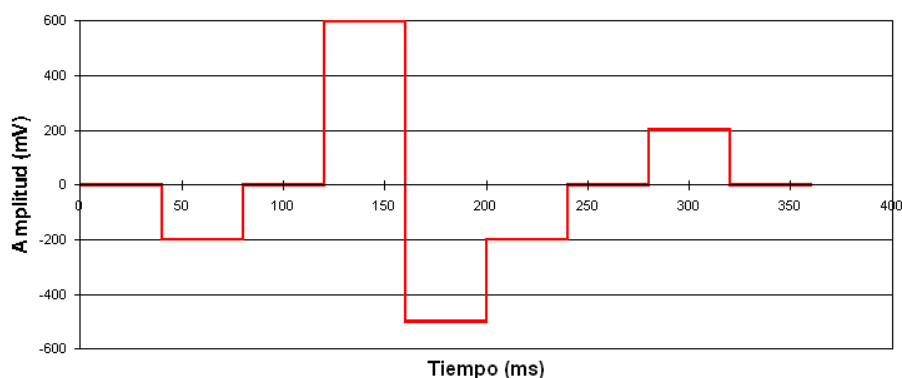


Figura 118. Patrón para los ensayos de voltametría de pulsos

Para cada disolución la medida se repitió tres veces. En cada medida se aplicó el patrón de la Figura 118 de forma secuencial a cada uno de los 8 electrodos, recogiendo para cada uno de ellos 1000 muestras correspondientes a la evolución temporal de la señal de corriente. Es decir, cada fichero de medida estaba compuesto por 8000 datos. Después de cada medida los electrodos fueron pulidos siguiendo el método descrito en el apartado 5.3 del Capítulo 1. Al finalizar la 3ª medida los datos eran analizados mediante el formulario de Promediado de Repeticiones de la aplicación software con el fin de evaluar la dispersión entre las tres medidas, aplicando el algoritmo de la Dispersión Media con respecto a la Mediana descrito en el apartado 4.2.3 del Capítulo 1. Si alguna repetición presentaba un valor de DMM mayor de 4 los datos correspondientes eran desechados y se llevaba a cabo una nueva medida sobre la misma muestra. Cuando se obtenían tres repeticiones con un DMM inferior a 4 los datos de las tres medidas eran promediadas dando lugar al fichero de ensayo de la muestra analizada.

Análisis estadístico de los datos

Para cada tanda se obtuvieron 11 ficheros de ensayo. Los 22 ficheros correspondientes a las dos primeras tandas se utilizaron para generar los ficheros de experiencia a partir de los cuales se crearon los modelos. Los ficheros de experiencia para la validación de los modelos se construyeron a partir de los 11 ficheros de ensayo de la última tanda. Se crearon 9 lotes de ficheros de experiencias (cada lote estaba compuesto por un fichero de

generación del modelo y otro de validación): un lote en el que se incluyeron los datos de todos los electrodos y a continuación un lote por cada electrodo de trabajo. En el apartado 3.2 del capítulo 2 se evaluaron tres métodos de compresión de los datos de voltametría de pulsos y se demostró que todos ellos permitían obtener modelos con una viabilidad similar a la que se obtenía utilizando todos los datos. Por ello, para esta experiencia se decidió trabajar con una técnica de compresión consistente en tomar 1 de cada 5 puntos; lo que permite reducir a una quinta parte el tamaño de los ficheros manteniendo una forma de onda de las señales de corriente muy similar a la original.

La generación y validación de los 9 modelos se llevó a cabo mediante la herramienta *PLS_Toolbox* de Eigenvector Research Inc. Los ficheros de experiencia de calibración fueron procesados mediante un algoritmo de mínimos cuadrados parciales (PLS) con el objetivo de generar los modelos predictivos. Para la determinación del número de variables latentes óptimo que debían incluirse en cada modelo, se realizó una validación cruzada de tipo *Venetian Blinds* con un tamaño para los conjuntos de test de 4 (ver apartado 6 de la Introducción). Una vez establecidos, los modelos fueron validados a partir de los datos contenidos en los ficheros de experiencia de validación. La calidad de dicha validación se estableció en base a las gráficas de observado frente a predicho de las cuales se analizaron los siguientes parámetros: coeficiente de determinación (R^2), error cuadrático medio de predicción (RMSEP) y pendiente (A) y ordenada en el origen (B) de la recta de tendencia.

2.2. Resultados y discusión

Estudio de la evolución temporal de las señales de corriente

Como paso previo a la generación de los modelos se llevó a cabo una inspección visual de los datos de la evolución temporal de la señal de corriente en el electrodo de trabajo. A modo de ejemplo en la Figura 119, la Figura 120, la Figura 121 y la Figura 122 se muestra la evolución temporal de la corriente a distintas concentraciones de glifosato para los electrodos de Ir, Ni, Cu y Co respectivamente. El comportamiento de todos los metales nobles (Ir, Rh, Pt y Au) fue muy parecido al que aparece en la Figura 119, las señales correspondientes a cada una de las concentraciones está prácticamente superpuestas no apreciándose ninguna diferencia significativa entre ellas. El

electrodo de Ag tiene un comportamiento similar al Ni, es decir, las señales aparecen separadas (sobre todo en el caso de Ni) pero su distribución no se corresponde con la gradación de las concentraciones. Por último, el Co y el Cu presentan una distribución que sí que está relacionada con la gradación de concentraciones: conforme aumenta la concentración mayor es la amplitud de la señal de corriente. Para el Co (Figura 122) este comportamiento es únicamente apreciable a concentraciones altas para el pulso 4; mientras que para el Cu (Figura 121) esta pauta se apreció a concentraciones medias y altas y en los pulsos 4 y 8.

Las conclusiones que podrían derivarse del estudio de la evolución temporal de las señales de corriente son que los electrodos de Ir, Rh, Pt, Au, Ag y Ni no permiten la obtención de modelos predictivos válidos puesto que para los 4 primeros no hay ninguna relación entre la corriente medida y la concentración del glifosato, y para los dos últimos los cambios en la corriente no parecen obedecer a ningún patrón de comportamiento. En principio solo el Co y fundamentalmente el Cu parecían tener la capacidad de detectar y cuantificar el glifosato.

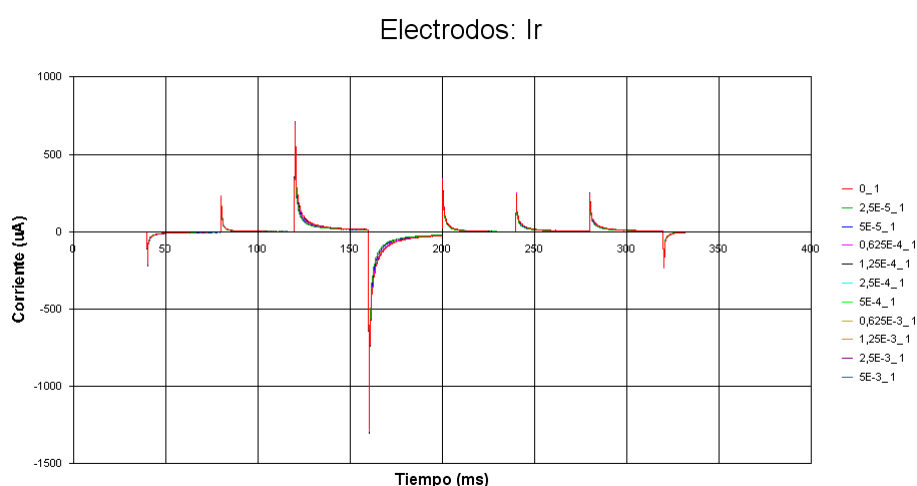


Figura 119. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de Ir para disoluciones de glifosato de distintas concentraciones

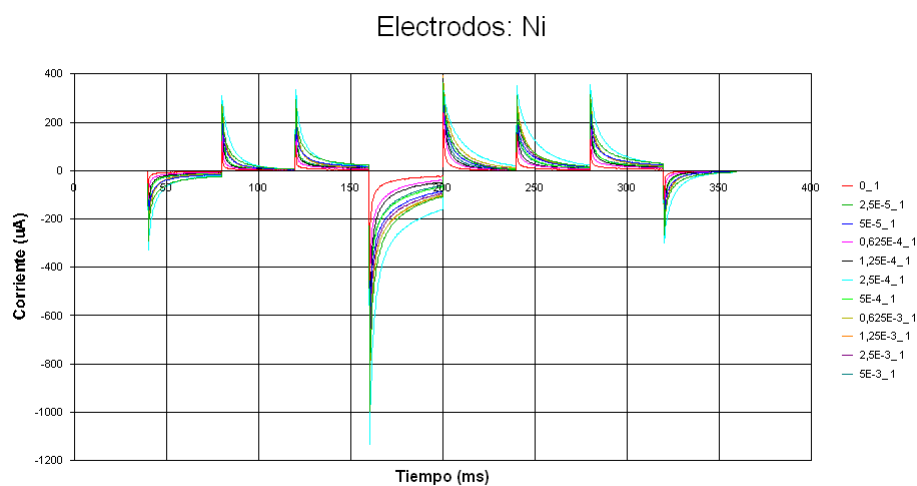


Figura 120. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de Ni para disoluciones de glifosato de distintas concentraciones

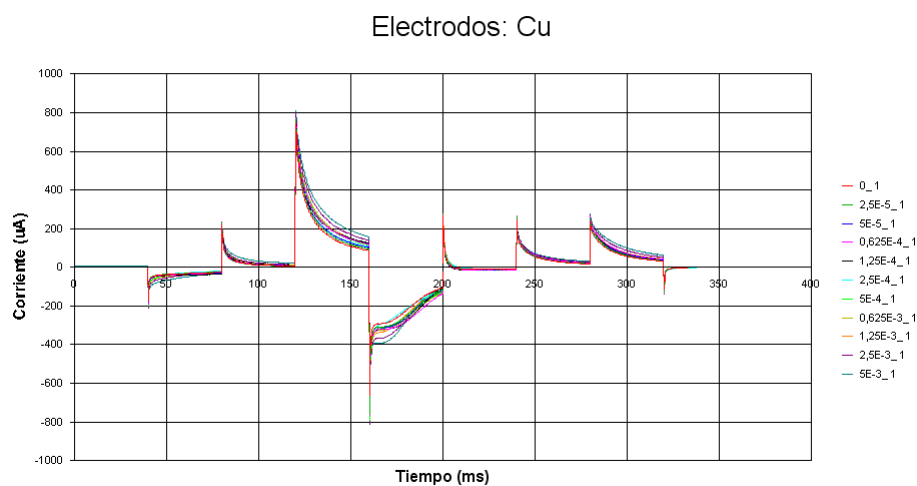


Figura 121. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de Cu para disoluciones de glifosato de distintas concentraciones

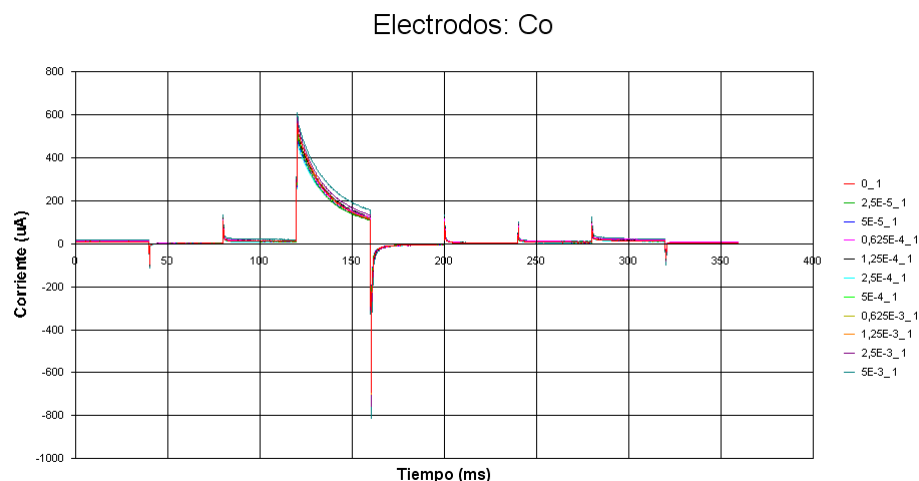


Figura 122. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de Co para disoluciones de glifosato de distintas concentraciones

Faltaba comprobar si al generar los modelos estas hipótesis se confirmaban y también ver con qué resolución el Co y e Cu eran capaces de determinar la concentración de glifosato.

Modelos de predicción mediante regresión por mínimos cuadrados parciales

En la Figura 123 se muestran las gráficas de observado frente a predicho correspondientes a la validación de los modelos correspondientes a los electrodos de trabajo nobles (Ir, Rh, Pt y Au). Tal y como se anticipó al examinar la evolución temporal de las señales de corriente, los resultados de predicción de estos modelos son muy malos con coeficientes de determinación por debajo de 0,2 (0,024 en el caso del Rh). Esto significa que ninguno de estos electrodos es adecuado para la cuantificación del glifosato mediante técnicas voltamétricas.

La Figura 124 muestra las gráficas de observado frente a predicho para los electrodos no nobles (Ag, Co, Cu y Ni). Tanto la Ag como el Ni presentan coeficientes de determinación muy bajos, lo que confirma las conclusiones extraídas de la observación de las señales de corriente. Aunque estos dos electrodos presentaron diferencias en las señales de corriente, estas diferencias no parecen estar relacionadas con la concentración de glifosato. Por tanto,

ninguno de estos dos electrodos permite la obtención de modelos predictivos para la cuantificación de glifosato. El R^2 de la validación del modelo del electrodo de Co es de 0.897, aunque su RMSEP es muy alto (0.00347) y la línea de tendencia está muy alejada del comportamiento ideal. Esto puede significar que es posible la cuantificación del glifosato mediante el Co aunque quizás no para todas las concentraciones estudiadas. Por último, el electrodo de Cu presenta un R^2 de 0,936 y un error cuadrático medio de predicción muy bajo (0,00039). Parece, por tanto, que sería posible obtener modelos de predicción fiables mediante el electrodo de Cu.

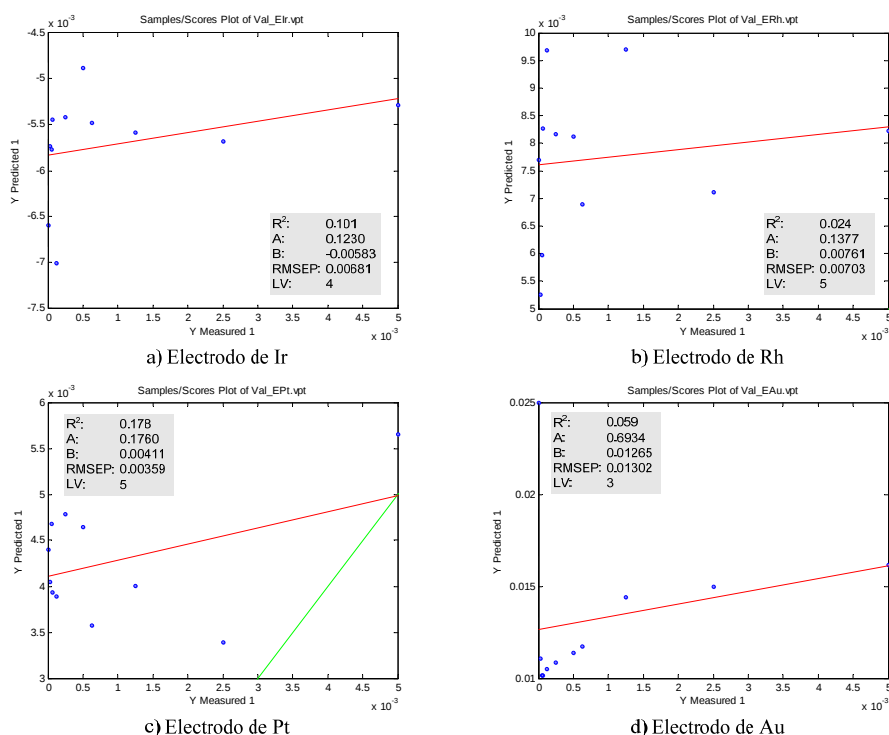


Figura 123. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS correspondientes los electrodos nobles (Ir, Rh, Pt y Au)

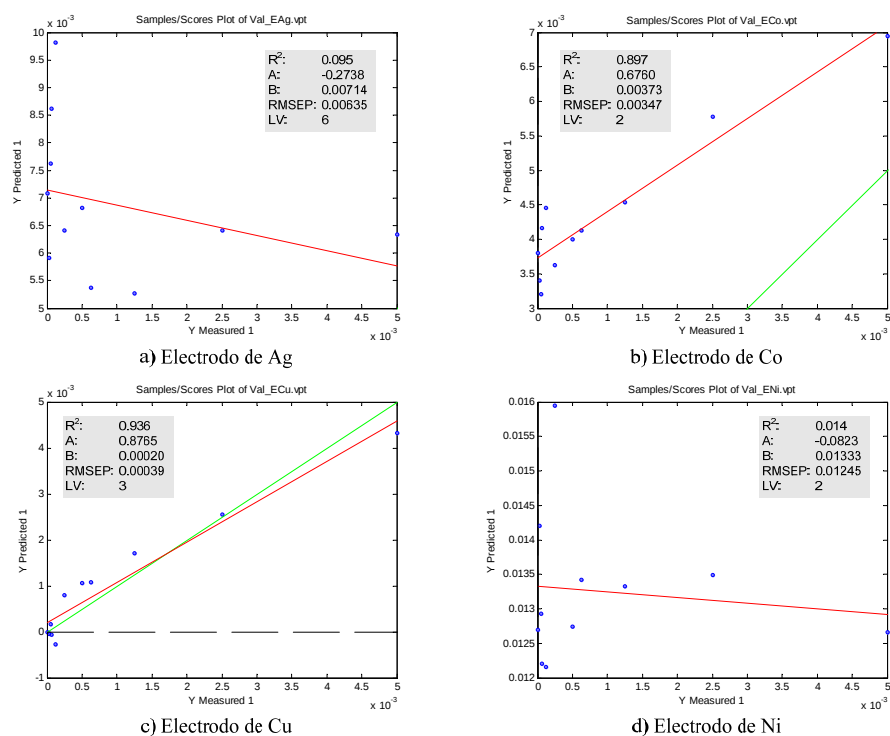


Figura 124. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS correspondientes a los electrodos no nobles (Ag, Co, Cu y Ni)

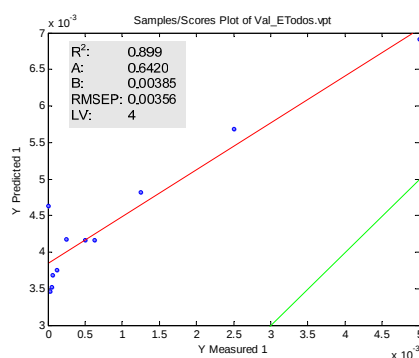


Figura 125. Gráfica de observado frente a predicho de la validación del modelo PLS para todos los electrodos

En la Figura 125 se muestran los resultados de validación para el caso de la configuración de lengua electrónica (combinación de todos los electrodos). El resultado es parecido al obtenido con el Co, es decir, un coeficiente de determinación aceptable pero un RMSEP alto y una recta de tendencia alejada del comportamiento ideal. Teniendo en cuenta esto y que los resultados de validación para la mayoría de los electrodos (Ir, Rh, Pt, Au, Ag y Ni) son malos, cabe pensar que la configuración de lengua electrónica no es una buena alternativa para la cuantificación del glifosato. Las dos únicas opciones válidas serían, por tanto el Cu (que ya aparece en alguna publicación [171][172] como una alternativa válida) y el Co. Sin embargo, cabría plantearse hasta qué nivel de concentraciones estos dos metales serían capaces de cuantificar el contenido en glifosato.

Para estudiar el nivel de resolución de estos dos electrodos se generó un nuevo modelo para cada uno de ellos, con los mismos datos pero eliminando las altas concentraciones ($5 \cdot 10^{-3}$ M, $2,5 \cdot 10^{-3}$ M y $1,25 \cdot 10^{-3}$ M) tanto del fichero de experiencia de calibración como el de validación. El resultado de la validación de estos nuevos modelos se muestra en la Figura 126. En a) aparece la gráfica de observado frente a predicho correspondiente al modelo del Co a bajas concentraciones mientras que en b) se muestra la misma gráfica para el Cu. Se puede apreciar cómo los resultados de validación para el Co son muy malos ($R^2=0,172$); mientras que el electrodo de Cu mantiene los buenos resultados obtenidos para todas las concentraciones aunque la recta de tendencia se desvía del comportamiento ideal.

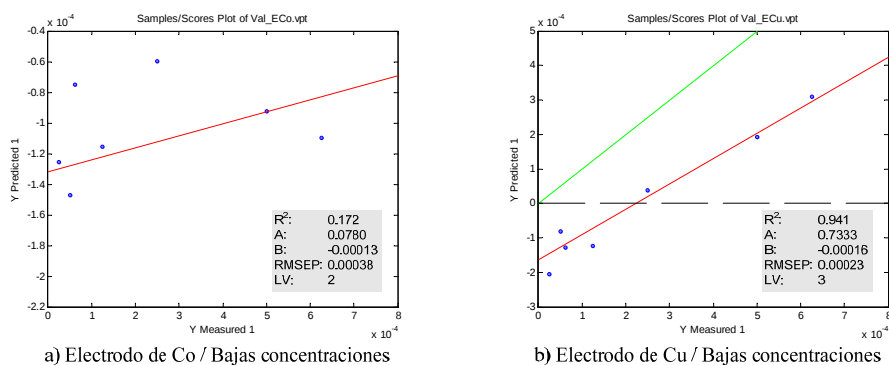


Figura 126. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS correspondientes a los electrodos Co y Cu para bajas concentraciones

Por tanto, parece que el electrodo de Co con la configuración actual no sería adecuado para la cuantificación del glifosato a bajas concentraciones; mientras que el Cu sigue siendo una buena opción, aunque pierde precisión cuando las concentraciones se hacen pequeñas.

2.3. Conclusiones

En la experiencia descrita en este apartado se evaluó la capacidad de una serie de metales nobles y no nobles para cuantificar el glifosato en disoluciones simples mediante técnicas voltamétricas. Para ello se llevaron a cabo ensayos de voltametría de pulsos sobre una serie de disoluciones simples con distintos niveles de concentración de glifosato. Las medidas realizadas se utilizaron para generar y validar los modelos de predicción correspondientes a cada uno de los electrodos. Los modelos se generaron mediante la técnica de análisis multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS). Tras el estudio de los resultados de validación de estos modelos se llegó a las siguientes conclusiones:

- De los 8 electrodos evaluados (Ir, Rh, Pt, Au, Ag, Co, Cu y Ni) solo el Co y fundamentalmente el Cu dieron lugar a modelos robustos. El resto de materiales no parecen, en principio, una buena alternativa para la cuantificación del glifosato mediante técnicas voltamétricas.
- Cuando el estudio se limita a las concentraciones bajas el Cu, aunque empeora su comportamiento, mantiene unos resultados de predicción aceptables; mientras que la validación del Co da lugar a un coeficiente de determinación muy bajo (0,172). Parece, por tanto, que en las condiciones en las que se llevó a cabo el ensayo, el Co no sería una opción válida para la cuantificación del glifosato a bajas concentraciones.
- En este caso concreto la utilización de la configuración en lengua electrónica (combinación de todos los electrodos) no parece una opción válida puesto que los resultados obtenidos con esta configuración son claramente peores que los resultados obtenidos con el Cu.

Los niveles de concentración con los que se ha trabajado en esta experiencia están muy por encima de los valores umbrales establecidos en la legislación. Es

necesario, por tanto, modificar la configuración de los ensayos con el fin de mejorar la resolución de la medida, para intentar detectar la presencia de glifosato a los niveles de concentración establecidos por la ley. Como primera aproximación se pueden evaluar nuevas geometrías de electrodo de trabajo o nuevas configuraciones de ensayo que permitan mejorar los modelos generados.

3. Experiencia con electrodos rotatorios (RDE)

En el apartado anterior se estableció que los electrodos más adecuados para la detección de glifosato mediante voltametría de pulsos son el Cu y el Co. Los modelos predictivos generados para estos electrodos son adecuados para la cuantificación del contenido de glifosato a altas concentraciones; sin embargo, a bajas concentraciones el modelo para el Co no es viable mientras que el modelo con el Cu empeora su comportamiento.

En este apartado se propone un cambio en la configuración de los electrodos de trabajo con el fin de aumentar la resolución de la medida y mejorar los resultados de los modelos predictivos. Dicho cambio consiste por una parte en el aumento de la superficie del electrodo (pasando de un diámetro de 1 mm a 2 mm) y por otra parte en hacer girar el electrodo de forma que maximice la respuesta en corriente tal y como se explicó en el apartado 5.2 del Capítulo 1. Se trata, por tanto, de repetir la experiencia del apartado anterior pero esta vez utilizando electrodos RDE de Co y de Cu. Con el fin de poder establecer una comparación con respecto a los resultados del apartado anterior se decidió mantener los mismos niveles de concentración para los ensayos con RDE.

Dado que las señales de corriente recogidas corresponden al solapamiento de los procesos debidos a la presencia de la base (sodio di-hidrogeno fosfato anhidro NaH_2PO_4) y los debidos al glifosato, cabe preguntarse si eliminando la aportación de la base podría mejorarse la resolución de la predicción. Con objeto de comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un estudio en el que la señal de corriente de la base fue restada a las señales de corriente de las disoluciones de glifosato.

3.1. *Material y métodos*

Preparación de las disoluciones

Como se acaba de mencionar para esta experiencia se utilizaron la misma base y las mismas concentraciones que en el apartado anterior con el fin de poder comparar los resultados obtenidos con los dos tipos de electrodos. Se realizaron tres tandas de medidas sobre 11 disoluciones (ver Tabla 30), tal y como se describe en el apartado 2.1 de este capítulo.

Configuración de los ensayos de voltametría de pulsos

El patrón aplicado al electrodo de trabajo fue el mismo que el utilizado en el apartado anterior (ver Figura 118).

En cuanto a los electrodos, la configuración utilizada para esta experiencia fue:

- Electrodos de trabajo: se construyeron dos electrodos RDE (uno de Cu y otro de Co), tal y como se explica en el apartado 5.2 del Capítulo 1. El electrodo se acopla al agitador electrónico de hélice RW 16 basic de la empresa IKA y durante los ensayos se le hizo girar a una velocidad de 1500 RPM.
- Contraelectrodo: electrodo de Platino (referencia W367MC de Crison Instruments).
- Electrodo de referencia: electrodo de calomelanos (referencia XR110 de Radiometer Analytical).



Figura 127. Montaje experimental para el electrodo RDE

En la Figura 127 se muestra el montaje experimental para el electrodo RDE. En ella pueden apreciarse el electrodo de referencia (a la derecha), el contraelectrodo (a la izquierda) y el electrodo RDE (en el centro).

Se midieron 3 tandas de 11 disoluciones. El procedimiento de medida de cada muestra fue el mismo que el llevado a cabo para los electrodos en configuración de lengua electrónica: se realizaron 3 repeticiones de la medida sobre cada muestra y, tras un proceso de evaluación de la dispersión (en el cual las medidas con valores de DMM superiores a 4 eran repetidas), se calculó el promedio de las 3 repeticiones. En cada repetición se recogieron 1000 valores correspondientes a la evolución temporal de la señal de corriente. Después del proceso de promediado se obtuvo un fichero de ensayo para cada muestra medida.

Análisis de los datos

Los 22 ficheros correspondientes a las dos primeras tandas se utilizaron para generar el fichero de experiencia de calibración y con los datos de los 11 ficheros de ensayo de la última tanda se compuso el fichero de experiencia de validación. En los ficheros de experiencia se incluyeron 1 de cada 5 puntos de los ficheros de ensayo con el fin de comprimir la información. Mediante el software *PLS_Toolbox* se generaron los modelos de predicción a partir de los ficheros de experiencia de calibración. Dichos modelos fueron validados mediante los ficheros de experiencia de validación. Como resultado del proceso de validación se obtuvieron las gráficas de observado frente a predicho que se utilizaron para evaluar la calidad de los modelos generados.

Además se realizó un segundo estudio en el que, mediante el formulario de eliminación de base de la aplicación software, se restó la señal de corriente de la base a los ficheros de experiencia de calibración y validación. Sobre los nuevos ficheros de experiencia se llevó a cabo un análisis idéntico al descrito en el párrafo anterior.

3.2. Resultados y discusión

Estudio de la evolución temporal de las señales de corriente

Antes de proceder a la creación de los modelos predictivos se llevó a cabo una inspección visual de la evolución temporal de la corriente tanto para el electrodo de Cu (ver Figura 128) como para el de Co (ver Figura 129). Si comparamos el comportamiento de las corrientes para el caso de estos electrodos en configuración de lengua electrónica (ver Figura 121 y Figura 122) con el de los electrodos RDE observamos las siguientes diferencias:

- En primer lugar la amplitud de las corrientes es sensiblemente superior para los electrodos RDE. Por ejemplo, el rango de variación de las corrientes del Cu en configuración ET va desde $-800 \mu\text{A}$ hasta $+800 \mu\text{A}$ y en configuración RDE desde $-1600 \mu\text{A}$ hasta $+1000 \mu\text{A}$. En el caso del Co el rango de corriente en configuración ET va desde $-800 \mu\text{A}$ hasta $+600 \mu\text{A}$; mientras que en configuración RDE las corrientes varían entre $-1700 \mu\text{A}$ y $+900 \mu\text{A}$.

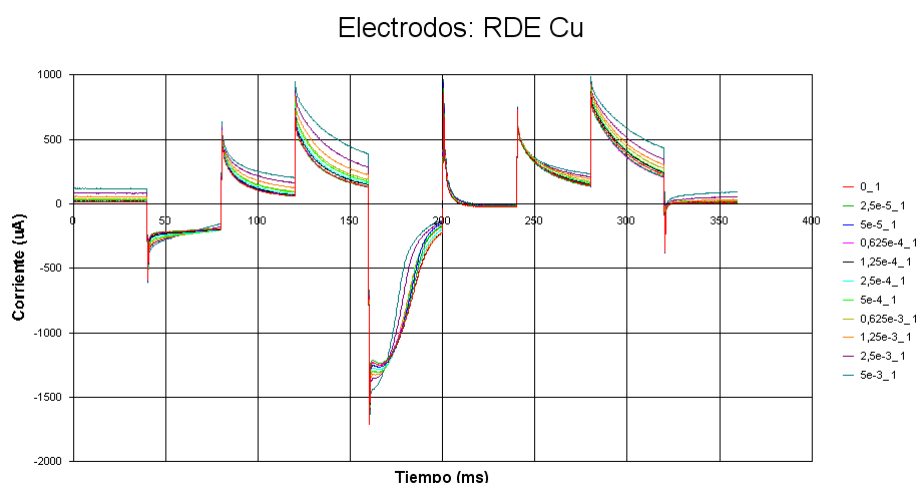


Figura 128. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de RDE Cu para disoluciones de glifosato de distintas concentraciones

- Por otro lado, la discriminación entre las señales de corriente para cada concentración es más apreciable en los electrodos RDE. En el caso del

electrodo de Cu comparando la Figura 121 con la Figura 128 se observa que la separación de las señales de corriente en los pulsos 4 y 8 es mucho más acentuada para el electrodo RDE. En cuanto al Co (ver Figura 122 y Figura 129) ese efecto del RDE es más notable puesto que no solo se aprecia una mejora de la discriminación entre las señales de corriente para el pulso 4, sino que también se observa una discriminación para los otros pulsos (1, 3, 7 y 8) que no existía en las medidas con electrodo en configuración ET.

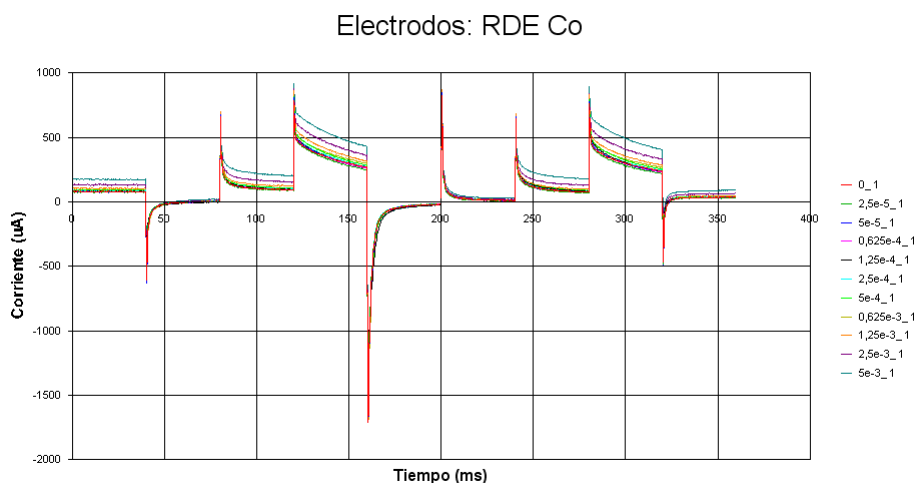
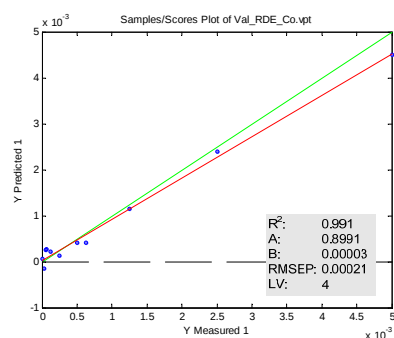


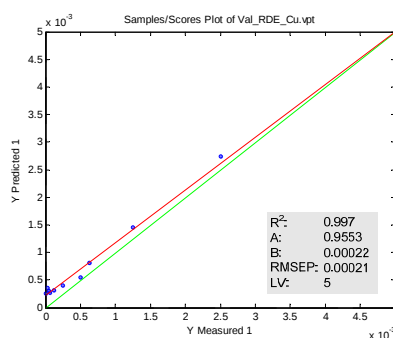
Figura 129. Evolución temporal de la señal de corriente en electrodo de RDE Co para disoluciones de glifosato de distintas concentraciones

Modelos de predicción mediante regresión por mínimos cuadrados parciales

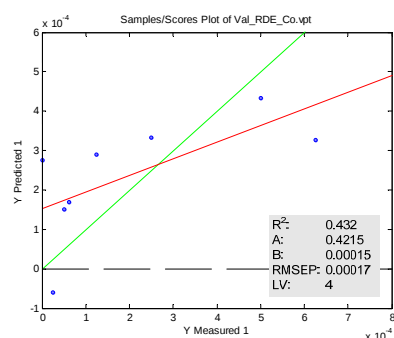
En la Figura 130 se muestran las gráficas de observado frente a predicho correspondientes a la validación de los modelos generados a partir de los ensayos con electrodos RDE. En a) se muestran los datos de validación correspondientes al electrodo RDE de Co utilizando todas las concentraciones mientras que en c) se muestran los datos correspondientes al mismo electrodo pero limitando el estudio a las concentraciones bajas (es decir, eliminando tanto del set de calibración como del de validación las concentraciones $5 \cdot 10^{-3}$ M, $2,5 \cdot 10^{-3}$ M y $1,25 \cdot 10^{-3}$ M). En b) y d) se visualizan los datos correspondientes a la validación de los modelos para el electrodo RDE de Cu.



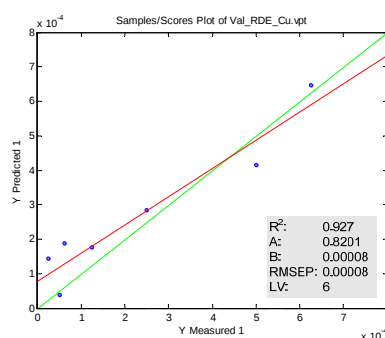
a) Electrodo RDE de Co / Todas las concentraciones



b) Electrodo RDE de Cu / Todas las concentraciones



c) Electrodo RDE de Co / Concentraciones bajas



d) Electrodo RDE de Cu / Concentraciones bajas

Figura 130. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS correspondientes a los electrodos RDE de Co y Cu para altas y bajas concentraciones

Si se consideran todas las concentraciones, se observa una mejora sustancial en los modelos predictivos obtenidos con los electrodos RDE con respecto a los obtenidos en la configuración de lengua electrónica. En efecto para el electrodo de Co se pasa de un R^2 de 0,897 a un R^2 de 0,991 y el RMSEP se ve claramente reducido de 0,00347 a 0,00021. Además la recta de tendencia en el caso del electrodo RDE se acerca mucho más al comportamiento ideal. En cuanto al electrodo de Cu el R^2 aumenta del 0,936 al 0,997; mientras que el RMSEP se ve reducido prácticamente a la mitad (de 0,00039 a 0,00021).

Cuando el estudio se centra en concentraciones bajas de glifosato, el modelo de predicción mediante el electrodo RDE de Co no es fiable. Si que mejora con respecto al obtenido mediante el mismo electrodo en configuración ET, pero su R^2 es bajo (0,432) y la recta de tendencia se desvía claramente del comportamiento ideal. Respecto al electrodo de Cu los datos de validación del

modelo son buenos y mejoran el comportamiento observado en la configuración de lengua electrónica. Aunque el R^2 disminuye ligeramente (se pasa de 0.941 a 0.927), el RMSEP para el electrodo RDE es casi 4 veces más pequeño (de 0,00023 a 0,0008) y la recta de tendencia se aproxima más al comportamiento ideal.

En definitiva, se puede decir que la utilización de electrodos RDE combinados con voltametría de pulsos permite obtener modelos de predicción mucho más robustos. Sin embargo, para el caso del Co, cuando se trabaja a bajas concentraciones esta mejora no es suficiente.

Mejora de la predicción mediante la eliminación del efecto de la base

La Figura 131 muestra las gráficas de observado frente a predicho correspondientes a la validación de los modelos generados a partir de los datos sin base. Las gráficas a) y c) representan el comportamiento del modelo correspondiente al Co, mientras que en b) y d) aparecen las gráficas correspondientes a los modelos para el Cu. En los modelos de a) y b) se consideran todas las concentraciones, mientras que en los modelos de c) y d) el estudio se ha limitado a las concentraciones bajas. Si se comparan estos resultados con los obtenidos considerando las señales originales (es decir sin eliminar la base), se puede concluir que la sustracción de la base permite mejorar la resolución de la predicción. Esta mejoría es más acentuada en el caso del electrodo de Co, cuyo modelo a concentraciones bajas presenta un notable incremento del R^2 que pasa de 0,432 a 0,949. Así mismo, se aprecia una importante mejora del RMSEP no solo cuando se consideran todas las concentraciones (de 0,00021 a 0,00011), sino también para el caso de concentraciones bajas (de 0,00017 a 0,00009). En cuanto al electrodo de Cu esta mejoría es apreciable únicamente para el modelo a bajas concentraciones cuyo R^2 aumenta ligeramente y cuyo RMSEP sufre una leve disminución. Si se analiza la evolución temporal de las señales de corriente para el Cu y el Co (Figura 128 y Figura 129 respectivamente), se aprecia que efectivamente la señal correspondiente a la base (curva de color rojo) presenta valores más altos para el Co que para Cu, lo que explica que la eliminación de la base tenga un efecto más apreciable para el primer electrodo que para el segundo.

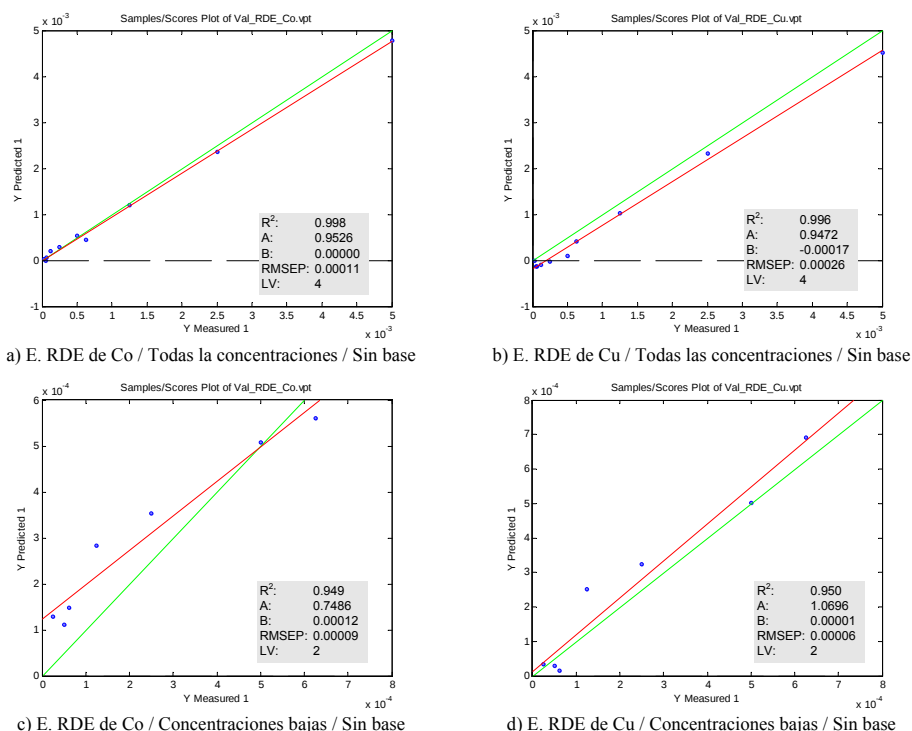


Figura 131. Gráficas de observado frente a predicho de la validación de los modelos PLS correspondientes a los electrodos RDE de Co y Cu para altas y bajas concentraciones eliminando el efecto de la base

3.3. Conclusiones

En este apartado se evaluó el uso de la técnica de Rotating Disk Electrode (RDE) en ensayos de voltametría de pulsos para aumentar la resolución de las medidas y mejorar la robustez de los modelos predictivos generados para la determinación de glifosato en disoluciones simples. Esta técnica se aplicó a los electrodos que mejor resultado habían dado en los ensayos con la configuración de lengua electrónica (ET) del apartado 2 de este capítulo, es decir, el Co y el Cu. Para ello se llevaron a cabo ensayos sobre disoluciones de glifosato a distintas concentraciones y mediante regresión de mínimos cuadrados parciales se generaron y validaron los modelos predictivos. De los datos de validación de dichos modelos se extrajeron las siguientes conclusiones:

- El uso de electrodos RDE no solo aumenta la amplitud de las señales de corriente sino que también incrementa la separación entre las señales para las distintas concentraciones. En el caso del electrodo de Co las medidas con RDE permitieron que la separación entre las señales de corriente en función de la concentración fuese apreciable no solo para el pulso 4 (como ocurría en la configuración ET) sino también en los pulsos 1, 3, 7 y 8.
- Los modelos predictivos generados con electrodos RDE son más robustos que los construidos a partir de la configuración ET y presentan un error cuadrático medio mucho menor.
- Para el electrodo de Co los modelos obtenidos mediante RDE son válidos a concentraciones altas-medias pero empeoran cuando el estudio se limita a las concentraciones bajas. Por tanto, el Co no es un buen candidato para la cuantificación del glifosato en los niveles establecidos por la legislación.
- Los modelos generados para el electrodo RDE de Cu presentan un buen comportamiento tanto a altas como a bajas concentraciones. Si bien los datos de validación con la configuración en ET para el Cu a bajas concentraciones ya eran buenos, el uso del electrodo RDE permite reducir el error cuadrático medio a una cuarta parte.
- La eliminación de la base de los datos de corriente permite una mejora de los modelos predictivos, sobre todo para el caso del electrodo de Co.

En consecuencia, de todos los metales estudiados el Cu queda como único candidato válido para la cuantificación del glifosato a bajas concentraciones. Sin embargo, las concentraciones utilizadas en esta tesis todavía están por encima de los límites de detección fijados en la ley. Es, por tanto, necesario seguir investigando nuevas metodologías de ensayo para incrementar la resolución de las medidas. A priori se podrían plantear nuevos ensayos en los que se evaluase cómo el aumento de la superficie del electrodo RDE o la modificación de la velocidad de giro del electrodo afectan a la resolución de la medida.

Conclusiones finales

Se ha diseñado un sistema de lengua electrónica basado en técnicas voltamétricas que consta de un Equipo Electrónico de Medida, una aplicación software y una serie de electrodos de diversos metales nobles y no nobles. El Equipo Electrónico de Medida ha mostrado unos excelentes niveles de precisión y exactitud en los ensayos de validación que se han llevado a cabo. La aplicación software incorpora una serie de herramientas de visualización y de preprocesado que facilitan la preparación de los datos para su posterior análisis mediante técnicas multivariantes. El sistema de lengua electrónica ha sido aplicado a la cuantificación de antioxidantes en disoluciones tanto simples como binarias lográndose buenos niveles de predicción en los modelos generados mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). En esta experiencia la configuración de lengua electrónica (conjunto de todos los electrodos) permitió obtener resultados similares a los alcanzados con cualquiera de los electrodos por separado. También se han evaluado distintos tipos de compresión de los datos generados los cuales han mostrado altos niveles de eficacia. En una segunda experiencia se ha aplicado el sistema diseñado a la detección de glifosato en disoluciones simples. En este caso los resultados con la configuración de lengua electrónica no han sido satisfactorios. Los electrodos de cobre y cobalto fueron los únicos que mostraron un nivel de predicción aceptable a concentraciones altas y medias. Con objeto de mejorar la resolución de los modelos de predicción a bajas concentraciones se han llevado a cabo nuevos ensayos empleando estos dos electrodos en configuración de electrodo rotatorio (RDE). La utilización de electrodos RDE ha permitido mejorar considerablemente la resolución de la medida a bajas concentraciones.

Aunque las experiencias descritas en esta tesis se han desarrollado sobre disoluciones simples, el sistema diseñado se está aplicando también a medidas sobre muestras reales tanto líquidas (zumos y aguas residuales) como sólidas (carne de cerdo y pescado). Los ensayos con matrices complejas líquidas están dando muy buenos resultados, sin embargo los ensayos con alimentos sólidos están presentando ciertas complicaciones derivadas de la dificultad de obtener un buen contacto entre las muestras y los electrodos. Estas desviaciones deberán ser corregidas cambiando la geometría de los electrodos de forma que se garantice un contacto homogéneo de los mismos con la muestra.

La experiencia adquirida en el diseño de sistemas de lengua electrónica y en la generación de modelos de predicción permitirá en un futuro la implementación de equipos portátiles y autónomos capaces de realizar medidas on-line y de clasificar muestras reales o cuantificar alguno de sus parámetros fisicoquímicos. Dichos equipos no solo incorporarán la electrónica necesaria para llevar a cabo estos ensayos sino también los algoritmos correspondientes a los modelos de predicción. Con el fin de mejorar la eficacia de estos sistemas será necesaria la combinación de varias técnicas electroquímicas (voltametría, potenciometría y espectroscopía de impedancias) así como la utilización de diversos tipos de electrodos.

Líneas futuras

Este trabajo es un paso más en el camino hacia la implementación de sistemas de lengua electrónica fiables, económicos y de fácil manejo que puedan ser utilizados en entornos industriales con el fin de facilitar el análisis del producto y optimizar el control de procesos. No obstante, todavía deben realizarse notables esfuerzos para que el uso de estos equipos pueda generalizarse a nivel industrial.

En primer lugar es necesario resolver los problemas que plantean las interferencias que se producen entre las distintas especies que componen la muestra. En relación con la cuantificación de antioxidantes se han puesto en marcha nuevas experiencias en las que se miden mezclas de estos ácidos con otros elementos como azúcares o polifenoles. También se están llevando a cabo experiencias que permitan la cuantificación del ácido ascórbico en muestras reales de zumo de distinta naturaleza. En ambos casos los objetivos fundamentales que se persiguen son: la determinación de los electrodos y la configuración de pulsos que permitan obtener mejores resultados de predicción.

En cuanto a los ensayos con glifosato son dos los retos que deben afrontarse: por un lado es necesario poner en marcha experiencias sobre sistemas reales como aguas de río y, por otro, debe trabajarse en la mejora de la resolución de la medida con el fin de alcanzar los límites de detección establecidos en la legislación. En este sentido, deben ponerse en marcha nuevas experiencias encaminadas a comprobar cómo afectan a la medida la velocidad de giro y la superficie de los electrodos RDE.

Es muy probable que la mejora de la capacidad predictiva de estos sistemas pase por la combinación de diversas técnicas electroquímicas. Aunque el Equipo Electrónico de Medida permite la realización de ensayos de espectroscopía de impedancias sería interesante trabajar en un nuevo prototipo que mejorase las prestaciones de dicha técnica, aumentando el rango de frecuencias hasta al menos 1 MHz y proporcionando mejores niveles de precisión, exactitud y estabilidad en las medidas. Además este nuevo prototipo debería ser capaz de llevar a cabo ensayos de potenciometría. El sistema debería

diseñarse de forma que los ensayos con las distintas técnicas puedan secuenciarse y la información generada pueda ser procesada en conjunto.

Otro de los aspectos que debe ser tratado en el futuro es el tema de los electrodos. Aunque en el caso de la potenciometría no resulta relevante, un buen contacto entre el electrodo y la muestra es fundamental para obtener medidas reproducibles en las técnicas de voltametría de pulsos y espectroscopía. Por tanto, un primer objetivo debe ser la búsqueda de nuevas geometrías de electrodo que faciliten dicho contacto. Por otro lado, la miniaturización de los electrodos permitiría realizar medidas no destructivas sobre muestras de alimentos. Sin embargo, son varias las dificultades que plantea trabajar con electrodos de tamaño reducido. Por una parte, los problemas de contacto con la muestra podrían aumentar y, por otra, las señales de corriente serían de menor amplitud y, por tanto, la medida se vería más afectada por el ruido electromagnético.

Si el objetivo es la aplicación de la lengua electrónica a medidas on-line es necesario encontrar sistemas que permitan realizar ensayos consecutivos sobre los electrodos. En los ensayos de voltametría las reacciones que se producen durante la medida pueden generar residuos sobre la superficie del electrodo que afectarían a las medidas posteriores. Es, por tanto, necesario implementar mecanismos automáticos de limpieza de los electrodos después de cada ensayo. En este sentido se plantean dos alternativas: el pulido electroquímico (tema sobre el cual ya existen algún trabajo publicado [175]) y el diseño de un proceso de limpieza mecánica automatizado. Ambas alternativas deben ser evaluadas para establecer cuál de ellas es la más adecuada para cada aplicación y para cada tipo de electrodo.

Referencias bibliográficas

- [1] B. Kolb, I. Q. Whishaw. Organization of the Sensory Systems. En Fundamentals of Human Neuropsychology. 5th Ed. Academic Press (2008) 641-685.
- [2] R. S. Jackson. Sensory Preception and Wine Assessment. En Wine science: principles and applications. 3rd Ed. Academic Press (2008) 641-685.
- [3] V. B. Collings. Human taste response as a function of locus of stimulation on the tongue and soft palate Perception & Psychophysics 16 (1974) 169-174.
- [4] Y. G. Vlasov, A. V. Legin, and A. M. Rudnitskaya. Electronic Tongue: Chemical Sensor Systems for Analysis of Aquatic Media. Russian Journal of General Chemistry 78 (2008) 2532-2544.
- [5] P. Ciosek, W. Wróblewski. Sensor arrays for liquid sensing – electronic tongue systems. Analyst 132 (2007) 963-978.
- [6] L. Escuder-Gilabert, M. Peris. Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis. Analytica Chimica Acta 665 (2010) 15-25.
- [7] M. Ghasemi-Varnamkhasti, S. S. Mohtasebi, M. Siadat. Biomimetic-based odor and taste sensing systems to food quality and safety characterization: An overview on basic principles and recent achievements. Journal of Food Engineering 100 (2010) 377-387.
- [8] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitzkreutz. Taste sensing systems (electronic tongues) for pharmaceutical applications. International Journal of Pharmaceutics In-Press (2010).
- [9] V. Anand, M. Kataria, V. Kukkar, V. Saharan, P. K. Choudhury. The latest trends in the taste assessment of pharmaceuticals. Drug Discovery Today 12 (2007) 257-265.
- [10] C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winqvist, I. Lundström. Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review. Analytica Chimica Acta 426 (2001) 217-226.
- [11] A. Bratov, N. Abramova, A. Ipatov. Recent trends in potentiometric sensor arrays—A review. Analytica Chimica Acta 678 (2010) 149-159.
- [12] F. Winqvist. Voltammetric electronic tongues – basic principles and applications. Microchimica Acta 163 (2008) 3-10.
- [13] A. Gutés, F. Céspedes, M. del Valle. Electronic tongues in flow analysis. Analytica Chimica Acta 600 (2007) 90-96.

- [14] A. J. Bard, L. R. Faulkner. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. (2001).
- [15] P. T. Kissinger, W. R. Heineman. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker, Inc. (1996).
- [16] D. Harvey. *Modern Analytical Chemistry*. The McGraw-Hill Companies, Inc. (2000).
- [17] C. G. Zoski. *Handbook of Electrochemistry*. Elsevier (2007).
- [18] L. Gil. Tesis Doctoral: Diseño de lenguas electrónicas potenciométricas construidas con electrodos metálicos y con tecnología de capa gruesa para análisis de medios complejos. Universidad Politécnica de Valencia. (2007).
- [19] J. R. Macdonald, E. Barsoukov. *Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment and Applications*. 2nd Edition, John Wiley & Sons, Inc. 2005.
- [20] F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström. Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry. *Measurement Science and Technology* 9 (1998) 1937-1946.
- [21] R. Masot. Tesis Doctoral: Desarrollo de un sistema de medida basado en espectroscopía de impedancia para la determinación de parámetros fisicoquímicos en alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. (2010).
- [22] *Electrochemical Impedance Measurements: Instrumentation and Techniques*. Technical Note AC-3. Princeton Applied Research.
- [23] K. Toko. Taste sensor. *Sensors and Actuators B* 64 (2000) 205-215.
- [24] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitzkreutz. A comparative study on two electronic tongues for pharmaceutical formulation development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 (2011) 272-281.
- [25] K. Beullens, P. Mészáros, S. Vermeir, D. Kirsanov, A. Legin, S. Buysens, N. Cap, B. M. Nicolaï, J. Lammertyn. Analysis of tomato taste using two types of electronic tongues. *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 10-17.
- [26] L. Lvova, S. S. Kim, A. Legin, Y. Vlasov, J. S. Yang, G. S. Cha, H. Nama. All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis. *Analytica Chimica Acta* 468 (2002) 303-314.
- [27] R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. Garcia-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Llobet. An “electronic tongue” design for the qualitative analysis of natural waters. *Sensors and Actuators B* 104 (2005) 302-307.
- [28] A. M. Peres, L. G. Dias, T. P. Barcelos, J. Sá Morais, A. A. S. C. Machadoc. An electronic tongue for juice level evaluation in non-alcoholic beverages. *Procedia Chemistry* 1 (2009) 1023-1026.

- [29] L. Lvova, R. Paolesse, C. Di Natale, A. do D'Amico. Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 118 (2006) 439-447.
- [30] A. Rudnitskaya, S.M. Rocha, A. Legin, V. Pereira, J.C. Marques. Evaluation of the feasibility of the electronic tongue as a rapid analytical tool for wine age prediction and quantification of the organic acids and phenolic compounds. The case-study of Madeira wine. *Analytica Chimica Acta* 662 (2010) 82-89.
- [31] E. Polshina, A. Rudnitskaya, D. Kirsanov, A. Legin, D. Saison, F. Delvaux, F. R. Delvaux, B. M. Nicolaï, J. Lammertyn. Electronic tongue as a screening tool for rapid analysis of beer. *Talanta* 81 (2010) 88-94.
- [32] W. He, X. Hua, L. Zhao, X. Liao, Y. Zhang, M. Zhang, J. Wua. Evaluation of Chinese tea by the electronic tongue: Correlation with sensory properties and classification according to geographical origin and grade level. *Food Research International* 42 (2009) 1462-1467.
- [33] A. Legin, A. Rudnitskaya, B. Seleznev, Yu. Vlasov. Electronic tongue for quality assessment of ethanol, vodka and eau-de-vie. *Analytica Chimica Acta* 534 (2005) 129-135.
- [34] P. Ciosek, R. Maminska, A. Dybko, W. Wróblewski. Potentiometric electronic tongue based on integrated array of microelectrodes. *Sensors and Actuators B* 127 (2007) 8-14.
- [35] M. Hruskar, N. Major, M. Krpan. Application of a potentiometric sensor array as a technique in sensory analysis. *Talanta* 81 (2010) 398-403.
- [36] T. Mottram, A. Rudnitskaya, A. Legin, J. L. Fitzpatrick, P. D. Eckersall. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2689-2693.
- [37] P. Ciosek, W. Wróblewski. Miniaturized electronic tongue with an integrated reference microelectrode for the recognition of milk samples. *Talanta* 76 (2008) 548-556.
- [38] A. Rudnitskaya, D. Kirsanov, A. Legin, K. Beullens, J. Lammertyn, B. M. Nicolaï, J. Irudayaraj. Analysis of apples varieties – comparison of electronic tongue with different analytical techniques. *Sensors and Actuators B* 116 (2006) 23-28.
- [39] D. B. Kantor, G. Hitka, A. Fekete, C. Balla. Electronic tongue for sensing taste changes with apricots during storage. *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 43-47.
- [40] A. M. Peres, L. G. Dias, A. C.A. Veloso, S. G. Meirinho, J. Sá Morais, A. A. S. C. Machado. An electronic tongue for gliadins semi-quantitative detection in foodstuffs. *Talanta* 83 (2011) 857-864.

- [41] Z. Wei, J. Wang, W. Liao. Technique potential for classification of honey by electronic tongue. *Journal of Food Engineering* 94 (2009) 260-266.
- [42] L. Gil, J. M. Barat, E. Garcia-Breijo, J. Ibañez, R. Martinez-Máñez, J. Soto, E. Llobet, J. Brezmes, M.-C. Aristoy, F. Toldrá. Fish freshness analysis using metallic potentiometric electrodes. *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 362-370.
- [43] J. M. Barat, L. Gil, E. García-Breijo, M.-C. Aristoy, F. Toldrá, R. Martínez-Máñez, J. Soto. Freshness monitoring of sea bream (*Sparus aurata*) with a potentiometric sensor. *Food Chemistry* 108 (2008) 681-688.
- [44] L. Gil, J. M. Barat, D. Baigts, R. Martínez-Máñez, J. Soto, E. Garcia-Breijo, M.-C. Aristoy, F. Toldrá, E. Llobet. Monitoring of physical-chemical and microbiological changes in fresh pork meat under cold storage by means of a potentiometric electronic tongue. *Food Chemistry* 126 (2011) 1261-1268.
- [45] P. C. Kayumba, N. Huyghebaert, C. Cordella, J. D. Ntawukulirayo, C. Vervaet, J. P. Remon. Quinine sulphate pellets for flexible pediatric drug dosing: Formulation development and evaluation of taste-masking efficiency using the electronic tongue. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 66 (2007) 460-465.
- [46] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitzkreutz. Rational development of taste masked oral liquids guided by an electronic tongue. *International Journal of Pharmaceutics* 400 (2010) 114-123.
- [47] C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, A. Legin, Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, B. Selezenev. Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 44 (1997) 423-428.
- [48] Y. G. Mourzina, J. Schubert, W. Zander, A. Legin, Y. G. Vlasov, H. Lüth, M. J. Schöning. Development of multisensor systems based on chalcogenide thin film chemical sensors for the simultaneous multicomponent analysis of metal ions in complex solutions. *Electrochimica Acta* 47 (2001) 251-258.
- [49] M. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle. Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples. *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008) 795-802.
- [50] L. Lvova, E. Martinelli, F. Dini, A. Bergamini, R. Paolessea, C. Di Natale, A. D'Amico. Clinical analysis of human urine by means of potentiometric Electronic tongue. *Talanta* 77 (2009) 1097-1104.
- [51] A. Buczkowska, E. Witkowska, Ł. Górski, A. Zamojska, K. W. Szewczyk, W. Wróblewski, P. Ciosek. The monitoring of methane fermentation in

- sequencing batch bioreactor with flow-through array of miniaturized solid state electrodes. *Talanta* 81 (2010) 1387-1392.
- [52] F. Winqvist, P. Wide, I. Lundström. An electronic tongue based on voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 357 (1997) 21-31.
- [53] L. Pigani, G. Foca, K. Ionescu, V. Martina, A. Ulrici, F. Terzi, M. Vignali, C. Zanardi, R. Seeber. Amperometric sensors based on poly (3,4-ethylenedioxythiophene)-modified electrodes: Discrimination of white wines. *Analytica Chimica Acta* 614 (2008) 213-222.
- [54] L. Pigani, G. Foca, A. Ulrici, K. Ionescu, V. Martina, F. Terzi, M. Vignali, C. Zanardi, R. Seeber. Classification of red wines by chemometric analysis of voltammetric signals from PEDOT-modified electrodes. *Analytica Chimica Acta* 643 (2009) 67-73.
- [55] V. Parra, T. Hernando, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja. Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon paste electrodes for discrimination of red wines. *Electrochimica Acta* 49 (2004) 5177-5185.
- [56] M. Gay, C. Apetrei, I. Nevares, M. del Alamo, J. Zurro, N. Prieto, J. A. De Saja, M. L. Rodríguez-Méndez. Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine. *Electrochimica Acta* 55 (2010) 6782-6788.
- [57] V. Parra, A. A. Arrieta, J.-A. Fernández-Escudero, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. De Saja. Electronic tongue based on chemically modified electrodes and voltammetry for the detection of adulterations in wines. *Sensors and Actuators B* 118 (2006) 448-453.
- [58] M. Gutiérrez, C. Domingo, J. Vila-Planas, A. Ipatova, F. Capdevila, S. Demming, S. Büttgenbach, A. Llobera, C. Jiménez-Jorquera. Hybrid electronic tongue for the characterization and quantification of grape variety in red wines. *Sensors and Actuators B* In-Press (2011).
- [59] S. K. Schreyer, S. R. Mikkelsen. Chemometric analysis of square wave voltammograms for classification and quantitation of untreated beverage samples. *Sensors and Actuators B* 71 (2000) 147-153.
- [60] A. A. Arrieta, C. Apetrei, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja. Voltammetric sensor array based on conducting polymer-modified electrodes for the discrimination of liquids. *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4543-4551.
- [61] A. A. Arrieta, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja, C. A. Blanco, D. Nimubona. Prediction of bitterness and alcoholic strength in beer using an electronic tongue. *Food Chemistry* 123 (2010) 642-646.

- [62] P. Ivarsson, S. Holmin, N.-E. Höjer, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist. Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms. *Sensors and Actuators B* 76 (2001) 449-454.
- [63] M. Palit, B. Tudub, N. Bhattacharyya, A. Dutta, P. K. Dutta, A. Jana, R. Bandyopadhyay, A. Chatterjee. Comparison of multivariate preprocessing techniques as applied to electronic tongue based pattern classification for black tea. *Analytica Chimica Acta* 675 (2010) 8-15.
- [64] M. Palit, B. Tudub, P. K. Dutta, A. Dutta, A. Jana, J. K. Roy, N. Bhattacharyya, R. Bandyopadhyay, A. Chatterjee. Classification of Black Tea Taste and Correlation with Tea Taster's Mark Using Voltammetric Electronic Tongue. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement* 59 (2010) 2230-2239.
- [65] F. Winqvist, R. Bjorklun, C. Krantz-Rülcker, I. Lundströma, K. Östergren, T. Skoglund. An electronic tongue in the dairy industry. *Sensors and Actuators B* 111-112 (2005) 299-304.
- [66] F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström. Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on the basis of voltammetry. *Measurement Science and Technology* 9 (1998) 1937-1946.
- [67] M. L. Rodríguez-Méndez, C. Apetrei, J. A. de Saja. Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors. *Electrochimica Acta* 53 (2008) 5867-5872.
- [68] C. Apetrei, F. Gutierrez, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja. Novel method based on carbon paste electrodes for the evaluation of bitterness in extra virgin olive oils. *Sensors and Actuators B* 121 (2007) 567-575.
- [69] I. Campos, R. Masot, M. Alcañiz, L. Gil, J. Soto, J. L. Vivancos, E. García-Breijo, R. H. Labrador, J. M. Barat, R. Martínez-Mañez. Accurate concentration determination of anions nitrate, nitrite and chloride in minced meat using a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 149 (2010) 71-78.
- [70] R. H. Labrador, R. Masot, M. Alcañiz, D. Baigts, J. Soto, R. Martínez-Mañez, E. García-Breijo, L. Gil, J. M. Barat. Prediction of NaCl, nitrate and nitrite contents in minced meat by using a voltammetric electronic tongue and an impedimetric sensor. *Food Chemistry* 122 (2010) 864-870.
- [71] M. L. Rodríguez-Méndez, M. Gay, C. Apetrei, J. A. De Saja. Biogenic amines and fish freshness assessment using a multisensor system based on voltammetric electrodes. Comparison between CPE and screen-printed electrodes. *Electrochimica Acta* 54 (2009) 7033-7041.
- [72] E. Tønning, S. Sapelnikova, J. Christensen, C. Carlsson, M. Winther-Nielsen, E. Dock, R. Solna, P. Skladal, L. Nørgaard, T. Ruzgas, J. Emnéus.

- Chemometric exploration of an amperometric biosensor array for fast determination of wastewater quality. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 608-617.
- [73] A. Gutiérrez, F. Cespedes, M. del Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rülcker, F. Winquist. A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters. *Sensors and Actuators B* 115 (2006) 390-395.
- [74] F. Winquist, J. Olsson, M. Eriksson. Supervision of rinses in a washing machine by a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* 683 (2011) 192-197.
- [75] P. Ivarsson, M. Johansson, N.-E. Höjer, C. Krantz-Rülcker, F. Winquist, I. Lundström. Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 108 (2005) 851-857.
- [76] J. Olsson, P. Ivarsson, F. Winquist. Determination of detergents in washing machine wastewater with a voltammetric electronic tongue. *Talanta* 76 (2008) 91-95.
- [77] C. Söderström, H. Borén, F. Winquist, C. Krantz-Rülcker. Use of an electronic tongue to analyze mold growth in liquid media. *International Journal of Food Microbiology* 83 (2003) 253-261.
- [78] C. Söderström, H. Borén, C. Krantz-Rülcker. Use of an electronic tongue and HPLC with electrochemical detection to differentiate molds in culture media. *International Journal of Food Microbiology* 97 (2005) 247-257.
- [79] G. Zhao, X. Lin, W. Dou, S. Tian, S. Deng, J. Shi. Use of the smart tongue to monitor mold growth and discriminate between four mold species grown in liquid media. *Analytica Chimica Acta* 690 (2011) 240-247.
- [80] I. Campos, L. Gil, R. Martínez-Mañez, J. Soto, J. L. Vivancosa. Use of a voltammetric electronic tongue for predicting levels of nerve agent mimics. *Analytica Chimica Acta* 690 (2011) 240-247.
- [81] R. Masot, M. Alcañiz, A. Fuentes, F. C. Schmidt, J. M. Barat, L. Gil, D. Baigts, R. Martínez-Mañez, J. Soto. Design of a low-cost non-destructive system for punctual measurements of salt levels in food products using impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators A* 158 (2010) 217-223.
- [82] G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, A. Ahluwalia. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue Part I. Characterization. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2618-2623.
- [83] G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, R. Leardi, A. Ahluwalia. A composite sensor array impedentiometric electronic tongue Part II. Discrimination of basic tastes. *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2624-2628.

- [84] A. Riul, A. M. Gallardo Soto, S. V. Mello, S. Bone, D. M. Taylor, L. H. C. Mattoso. An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline. *Synthetic Metals* 132 (2003) 109-116.
- [85] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M. del Valle, F. J. Muñoz, M. A. Alonso-Lomillo. Characterization of an ion-selective polypyrrole coating and application to the joint determination of potassium, sodium and ammonium by electrochemical impedance spectroscopy and partial least squares method. *Analytica Chimica Acta* 597 (2007) 231-237.
- [86] M. Cortina-Puig, X. Muñoz-Berbel, M. A. Alonso-Lomillo, F. J. Muñoz-Pascual, M. del Valle. EIS multianalyte sensing with an automated SIA system-An electronic tongue employing the impedimetric signal. *Talanta* 72 (2007) 774-779.
- [87] A. P. Bhondekar, M. Dhiman, A. Sharma, A. Bhakta, A. Ganguli, S.S. Bari, Renu Vig, P. Kapur, M. L. Singla. A novel iTongue for Indian black tea discrimination. *Sensors and Actuators B* 148 (2010) 601-609.
- [88] J. Yáñez Herasa, D. Pallarola, F. Battaglini. Electronic tongue for simultaneous detection of endotoxins and other contaminants of microbiological origin. *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2470-2476.
- [89] M. L. Moraes, N. C. de Souza, C. O. Hayasaka, M. Ferreira, U. P. Rodrigues Filho, A. Riul, V. Zucolotto, O. N. Oliveira. Immobilization of cholesterol oxidase in LbL films and detection of cholesterol using ac measurements. *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 442-447.
- [90] A. Riul, H. C. de Sousa, R. R. Malmegrim, D. S. dos Santos, A. C. P. L. F. Carvalho, F. J. Fonseca, O. N. Oliveira, L. H. C. Mattoso. Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks. *Sensors and Actuators B* 98 (2004) 77-82.
- [91] G. Sehra, M. Cole, J. W. Gardner. Miniature taste sensing system based on dual SH-SAW sensor device: an electronic tongue. *Sensors and Actuators B* 103 (2004) 233-239.
- [92] I. I. Leonte, G. Sehra, M. Cole, P. Hesketh, J. W. Gardner. Taste sensors utilizing high-frequency SH-SAW devices. *Sensors and Actuators B* 118 (2006) 349-355.
- [93] J. P. Santos, M. J. Fernández, J. L. Fontecha, J. Lozano, M. Aleixandre, M. García, J. Gutiérrez, M. C. Horrillo. SAW sensor array for wine discrimination. *Sensors and Actuators B: Chemical* 107 (2005) 291-295.
- [94] A. Tuantranont, A. Wisitsora-at, P. Sritongkham, K. Jaruwongrunsee. A review of monolithic multichannel quartz crystal microbalance: A review. *Analytica Chimica Acta* 687 (2011) 114-128.

- [95] H. Sun, Z. H. Mo, J. T. S. Choy, D. R. Zhu, Y. S. Fung. Piezoelectric quartz crystal sensor for sensing taste-causing compounds in food. *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 148-158.
- [96] P. Chen, X. Liu, B. Wang, G. Cheng, P. Wang. A biomimetic taste receptor cell-based biosensor for electrophysiology recording and acidic sensation. *Sensors and Actuators B* 139 (2009) 576-583.
- [97] W. Hu, H. Cai, J. Fu, P. Wang, G. Yang. Line-scanning LAPS array for measurement of heavy metal ions with micro-lens array based on MEMS. *Sensors and Actuators B* 129 (2008) 397-403.
- [98] P. Montes-Navajas, L. A. Baumes, A. Corma, H. Garcia. Dual-response colorimetric sensor array for the identification of amines in water based on supramolecular host-guest complexation. *Tetrahedron Letters* 50 (2009) 2301-2304.
- [99] K.-H. Chang, R. L. C. Chen, B.-C. Hsieh, P.-C. Chen, H.-Y. Hsiao, C.-H. Nieh, T.-J. Cheng. A hand-held electronic tongue based on fluorometry for taste assessment of tea. *Biosensors and Bioelectronics* 26 (2010) 1507-1513.
- [100] C. Söderström, A. Rudnitskaya, A. Legin, C. Krantz-Rülcker. Differentiation of four *Aspergillus* species and one *Zygosaccharomyces* with two electronic tongues based on different measurement techniques. *Journal of Biotechnology* 119 (2005) 300-308.
- [101] F. Winquist, S. Holmin, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström. A hybrid electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* 406 (2000) 147-157.
- [102] M. Gutiérrez, C. Domingo, J. Vila-Planas, A. Ipatov, F. Capdevila, S. Demming, S. Büttgenbach, A. Llobera, C. Jiménez-Jorquera. Hybrid electronic tongue for the characterization and quantification of grape variety in red wines. *Sensors and Actuators B* In-Press (2011).
- [103] H. Men, S. Zou, Y. Li, Y. Wang, X. Ye, P. Wang. A novel electronic tongue combined MLAPS with stripping voltammetry for environmental detection. *Sensors and Actuators B* 110 (2005) 350-357.
- [104] C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, A. Legin, L. Lvova, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov. Electronic nose and electronic tongue integration for improved classification of clinical and food samples. *Sensors and Actuators B* 64 (2000) 15-21.
- [105] C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, M. Ubigli, A. Legin, L. Lvova, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov. Application of a combined artificial olfaction and taste system to the quantification of relevant compounds in red wine. *Sensors and Actuators B* 69 (2000) 342-347.

- [106] C. Di Natale, R. Paolesse, M. Burgio, E. Martinelli, G. Pennazza, A. D'Amico. Application of metalloporphyrins-based gas and liquid sensor arrays to the analysis of red wine. *Analytica Chimica Acta* 513 (2004) 49-56.
- [107] S. Buratti, D. Ballabio, S. Benedetti, M. S. Cosio. Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models. *Food Chemistry* 100 (2007) 211-218.
- [108] S. Buratti, S. Benedetti, M. Scampicchio, E. C. Pangero. Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* 525 (2004) 133-139.
- [109] M. S. Cosio, D. Ballabio, S. Benedetti, C. Gigliotti. Evaluation of different storage conditions of extra virgin olive oils with an innovative recognition tool built by means of electronic nose and electronic tongue. *Food Chemistry* 101 (2007) 485-491.
- [110] C. Apetrei, I. M. Apetrei, S. Villanueva, J. A. de Saja, F. Gutierrez-Rosales, M. L. Rodriguez-Mendez. Combination of an e-nose, an e-tongue and an e-eye for the characterisation of olive oils with different degree of bitterness. *Analytica Chimica Acta* 663 (2010) 91-97.
- [111] F. Winqvist, I. Lundström, P. Wide. The combination of an electronic tongue and an electronic nose. *Sensors and Actuators B* 58 (1999) 512-517.
- [112] R. N. Bleibaum, H. Stone, T. Tan, S. Labreche, E. Saint-Martin, S. Isz. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. *Food Quality and Preference* 13 (2002) 409-422.
- [113] W. A. Collier, D. B. Baird, Z. A. Park-Ng, N. More, A. L. Hart. Discrimination among milks and cultured dairy products using screen-printed electrochemical arrays and an electronic nose. *Sensors and Actuators B* 92 (2003) 232-239.
- [114] M. Laureati, S. Buratti, A. Bassoli, G. Borgonovo, E. Pagliarini. Discrimination and characterisation of three cultivars of *Perilla frutescens* by means of sensory descriptors and electronic nose and tongue analysis. *Food Research International* 43 (2010) 959-964.
- [115] K. Woertz, C. Tissen, P. Kleinebudde, J. Breitzkreutz. A comparative study on two electronic tongues for pharmaceutical formulation development. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55 (2011) 272-281.

- [116] J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle. A flow-injection electronic tongue based on potentiometric sensors for the determination of nitrate in the presence of chloride. *Sensors and Actuators B* 101 (2004) 72-80.
- [117] A.S. Abdul Rahman, M.M. Sim Yap, A.Y. Md. Shakaff, M.N. Ahmad, Z. Dahari, Z. Ismail, M.S. Hitam. A microcontroller-based taste sensing system for the verification of *Eurycoma longifolia*. *Sensors and Actuators B* 101 (2004) 191-198.
- [118] J. Kim, H. Byun, D. Kim, Y. Ham, W. Jung, C. Yoon. A simple taste analyzing system design for visual and quantitative analysis of different tastes using multi-array chemical sensors and pattern recognition techniques. *Talanta* 70 (2006) 546-555.
- [119] R. Doeling. Potentiostats. Bank Elektronik – Intelligent Controls GmbH (2000).
- [120] A. V. Gopinath, D. Russell. An Inexpensive Field-Portable Programmable Potentiostat. *Chemical Educator* 11 (2006) 23-28.
- [121] Y. Shi, H. Dou, A. Zhou, Y. Chen. Design and fabrication of a miniaturized electrochemical instrument and its preliminary evaluation. *Sensors and Actuators B* 131 (2008) 516-524.
- [122] S. Yunus, A. Attout, G. Vanlancker, P. Bertrand. A method to probe electrochemically active material state in portable sensor applications. *Sensors and Actuators B* In Press (2011).
- [123] Potentiostat stability mystery explained. Application note n°4. Bio-Logic Science Instruments (2010).
- [124] J. E. Davis, E. C. Toren. On the Instability of Current Followers in Potentiostat Circuits. *Analytical Chemistry* 46 (1974) 647-650.
- [125] Reference Electrode Effects on Potentiostat Performance. Gamry Instruments (2009).
- [126] Getting to Know Your Potentiostat: Potentiostat Stability Considerations. Technical Note 200. Princeton Applied Research.
- [127] Potencial error correction (iR compensation). Technical Note 101. Princeton Applied Research.
- [128] S. Makarychev-Mikhailov, A. Shvarev, E. Bakker. New trends in ion-selective electrodes. En *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. Academic Press, Inc (2008) 71-114
- [129] B. Adhikari, S. Majumdar. Polymers in sensor applications. *Progress in Polymer Science* 29 (2004) 699-766.
- [130] L. A. Berrueta, R. M. Alonso-Salces, K. Héberger. Supervised pattern recognition in food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1158 (2007) 196-214.

- [131] Y. Ni, S. Kokot. Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis?. *Analytica Chimica Acta* 626 (2008) 130-146.
- [132] J. Brezmes. Tesis Doctoral: Diseño de una nariz electrónica para la determinación no destructiva del grado de maduración de la fruta. Universitat Politècnica de Catalunya. (2001).
- [133] E. L. Hines, E. Llobet, J. W. Gardner. Electronic noses: a review of signal processing techniques. *IEE Proceedings Circuits, Devices & Systems* 146 (1999) 297-310.
- [134] H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd. 2001.
- [135] B. Martín del Brío, Bonifacio, A. Sanz Molina, *Redes Neuronales y Sistemas Borrosos*. Ra-Ma 2006.
- [136] P. Ciosek, Z. Brzózka, W. Wróblewski, E. Martinelli, C. Di Natale, A. D'Amico. Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue—Effect of supervised feature extraction. *Talanta* 67 (2005) 590-596.
- [137] L. Moreno-Barón, R. Cartas, A. Merkoçi, S. Alegret, M. del Valle, L. Leija, P. R. Hernandez, R. Muñoz. Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in a voltammetric electronic. *Sensors and Actuators B* 113 (2006) 487-499.
- [138] A. Gútes, F. Céspedes, R. Cartas, S. Alegret, M. del Valle, J. M. Gutierrez, R. Muñoz. Multivariate calibration model from overlapping voltammetric signals employing wavelet neural networks. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 83 (2006) 169-179.
- [139] S. Holmin, P. Spangeus, C. Krantz-Rülcker, F. Winqvist. Compression of electronic tongue data based on voltammetry - a comparative study. *Sensors and Actuators B* 76 (2001) 455-464.
- [140] T. Artursson, P. Spångeus, M. Holmberg. Variable reduction on electronic tongue data. *Analytica Chimica Acta* 452 (2002) 255-264.
- [141] T. Artursson, M. Holmberg. Wavelet transform of electronic tongue data. *Sensors and Actuators B* 87 (2002) 379-391.
- [142] J. P. Lopez Veraguas. *Compatibilidad electromagnética*. Marcombo (2006)
- [143] R. G. Lyons. *Understanding Digital Signal Processing*. Prentice Hall (2001).
- [144] M. M. Theron, J. F. Lues. *Nature and Composition of Organic Acids en Organic Acids and Food Preservation*. Taylor & Francis Group (2011) 21-50.

- [145] A. R. Vicente, G. A. Manganaris, G. O. Sozzi, C. H. Crisosto. Nutritional Quality of Fruits and Vegetables. En *Postharvest Handling: A Systems Approach*. 2nd Ed. Elsevier Inc. (2009) 57-106
- [146] Y. Huang, B. A. Rasco, A. G. Cavinato. Fruit Juices. En *Postharvest Handling: A Systems Approach*. 2nd Ed. Elsevier Inc. (2009) 355-375
- [147] A. J. Hinton. Growth of *Campylobacter* in media supplemented with organic acids. *Journal of Food Protection* 69 (2006) 34-38
- [148] R. M. Seabra, P. B. Andrade, P. Valentão, E. Fernandes, F. Carvalho, M. L. Bastos. Anti-oxidant compounds extracted from several plant materials. En *Biomaterials from aquatic and terrestrial organism*. Science Publishers (2006) 115-174.
- [149] M. Blasa, L. Gennari, D. Angelino, P. Ninfali. Fruit and Vegetable Antioxidants in Health. En *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables*. 1st Ed. Academic Press (2010).
- [150] O. Chailapakul, E. Popa, H. Tai, B. Sarada, D. Tryk, A. Fujishima. The electrooxidation of organic acids at boron-doped diamond electrodes. *Electrochemistry Communications* 2 (2000) 422-426.
- [151] A. O. Barba, M. C. Hurtado, M. S. Mata, V. F. Ruiz, M. L. Tejada. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Food Chemistry* 95 (2006) 328-336.
- [152] F. M. Campos, S. M. Rocha Ribeiro, C. M. Della Lucia, H. M. Pinheiro-Sant'Ana, P. C. Stringheta. Optimization of methodology to analyze ascorbic and dehydroascorbic acid in vegetables. *Química Nova* 32 (2009) 87-91.
- [153] S. Intarakamhang, C. Leson, W. Schuhmann, A. Schulte. A novel automated electrochemical ascorbic acid assay in the 24-well microtiter plate format. *Analytica Chimica Acta* 687 (2011) 1-6.
- [154] F. Winquist, J. Olsson, M. Eriksson. Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* 683 (2011) 192-197.
- [155] M. Seruga, I. Novak, L. Jakobek. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry* 124 (2011) 1208-1216.
- [156] M. J. Aguirre, Y. Y. Chen, M. Isaacs, B. Matsuhira, L. Mendoza, S. Torres. Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. *Food Chemistry* 121 (2010) 44-48.

- [157] A. A. Ensafi, M. Taei, T. Khayamian, A. Arabzadeh. Highly selective determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid by differential pulse voltammetry using poly(sulfonazo III) modified glassy carbon electrode. *Sensors and Actuators B* 147 (2010) 213-221.
- [158] A. K. N. Reddy, B. Rao The mechanism of passivation of nickel as determined by an automatic recording ellipsometer. *Canadian Journal of Chemistry* 47 (1969) 2693-2698.
- [159] Vitamina C en alimentos. <http://vitaminas.org.es/vitamina-c-alimentos>.
- [160] E. V. Sierra, M. A. Méndez, V. M. Sarria, M. T. Cortés. Electrooxidación de Glifosato sobre Electrodo de Níquel y Cobre. *Química Nova* 31 (2008) 220-226.
- [161] C. Gasnier, C. Dumont, N. Benachour, E. Clair, M.-C. Chagnon, G.-E. Séralini. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines *Toxicology* 262 (2009) 184-191.
- [162] Ministerio de la Presidencia. Orden PRE/876/2007 de 30 de Marzo por la que se modifican los anexos II de los Reales Decretos 569/1990 de 27 de abril y 280/1994 de 18 de febrero, por los que se establecen los límites máximos de residuos plaguicidas y su control en determinados productos de origen animal y vegetal, respectivamente. *Boletín Oficial del Estado*, 83, (2007), pp 37.
- [163] Comisión de las Comunidades Europeas. DIRECTIVA 2006/60/CE DE LA COMISION de 7 de julio de 2006 que modifica los anexos de la Directiva 90/642/CEE del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de trifloxistrobin, tiabendazol, abamectina, benomilo, carbendazima, tiofanato-metil, miclobutanil, glifosato, trimetilsulfonio, fenpropimorf y cloromequat. *Diario Oficial de la Unión europea*, 206, (2006), pp 11.
- [164] F. Sánchez-Bayo, R. V. Hyne, K. L. Desseille. An amperometric method for the detection of amitrole, glyphosate and its aminomethyl-phosphonic acid metabolite in environmental waters using passive samplers. *Analytica Chimica Acta* 675 (2010) 125-131.
- [165] J. Jin, F. Takahashi, T. Kaneko, T. Nakamura. Characterization of electrochemiluminescence of tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II) with glyphosate as coreactant in aqueous solution. *Electrochimica Acta* 55 (2010) 5532-5537.
- [166] H. Y. Chiu, Z. Y. Lin, H. L. Tu, C. W. Whang. Analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1177 (2008) 195-198.

- [167] C. F. B. Coutinho, L. F. M. Coutinho, L. H. Mazo, S. L. Nixdorf, C. A. P. Camara. Rapid and direct determination of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water using anion-exchange chromatography with coulometric detection. *Journal of Chromatography A* 1208 (2008), 246-249.
- [168] K. Sato, J. Y. Jin, T. Takeuchi, T. Miwa, K. Suenami, Y. Takekoshi, S. Kanno. Integrated pulsed amperometric detection of glufosinate, bialaphos and glyphosate at gold electrodes in anion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 919 (2001) 313-320.
- [169] A. Khenifi, Z. Derriche, C. Forano, V. Prevot, C. Mousty, E. Scavetta, B. Ballarin, L. Guadagnini, D. Tonelli. Glyphosate and glufosinate detection at electrogenerated NiAl-LDH thin films. *Analytica Chimica Acta* 654 2 (2009) 97-102.
- [170] M. A. Méndez, M. F. Suárez, M. T. Cortés, V. M. Sarria. Electrochemical properties and electro-aggregation of silvercarbonate sol on polycrystalline platinum electrode and its electrocatalytic activity towards glyphosate oxidation. *Electrochemistry communications* 9 (2007), 2585-2590.
- [171] C.F.B. Coutinho, M.O. Silva, M.L. Calegari, S.A.S. Machado, L.H. Mazo. Investigation of copper dissolution in the presence of glyphosate using hydrodynamic voltammetry and chronoamperometry. *Solid State Ionics* 178 (2007) 161-164.
- [172] C. F. B. Coutinho, M. O. Silva, S. A. S. Machado, L. H. Mazo. Influence of glyphosate on the copper dissolution in phosphate buffer. *Applied Surface Science* 253 (2007) 3270-3275.
- [173] E. A. Songa, O. A. Arotiva, J. H. O. Owino, N. Jahed, P. G. L. Baker, E. I. Iwuoha. Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix. *Bioelectrochemistry* 75 (2009) 117-123.
- [174] S. Aquino Neto, A.R. de Andrade. Electrooxidation of glyphosate herbicide at different DSA compositions: pH, concentration and supporting electrolyte effect. *Electrochimica Acta* 54 (2009) 2039-2045.
- [175] F. Winkvist, E. Rydberg, S. Holmin, C. Krantz-Rülcker, I. Lundström. Flow injection analysis applied to a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta* 471 (2002) 159-172.