

Document downloaded from:

<http://hdl.handle.net/10251/135954>

This paper must be cited as:

Gil Sánchez, L. (2007). Diseño de lenguas electrónicas potenciométricas construidas con electrodos metálicos y con tecnología de capa gruesa para análisis de medios complejos [Tesis doctoral no publicada]. Universitat Politècnica de València.
<https://doi.org/10.4995/Thesis/10251/135954>



The final publication is available at

Copyright Universitat Politècnica de València

Additional Information

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA ELECTRÓNICA



DISEÑO DE LENGUAS ELECTRÓNICAS
POTENCIOMÉTRICAS CONSTRUIDAS CON ELECTRODOS
METÁLICOS Y CON TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA
PARA ANÁLISIS DE MEDIOS COMPLEJOS.

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Luis Gil Sánchez

Directores:

Dr. D. Juan Soto Camino

Dr. D. Eduard Llobet Valero

Dr. D. Eduardo Garcia Breijo

Valencia Abril 2007

RESUMEN

En la presente tesis doctoral se desarrollan sistemas electrónicos de medida que tienen como elemento sensor múltiples electrodos de naturaleza electroquímica. Cada uno de los electrodos posee una sensibilidad no específica ante algunos de los parámetros o compuestos químicos de las muestras a analizar. El conjunto de electrodos aportan una serie de señales que se analizan de forma conjunta, para así obtener conclusiones de interés, normalmente en la discriminación de muestras complejas o la cuantificación de algunos de sus componentes. A este tipo de sistemas de medida se le denominan lenguas electrónicas.

Los sistemas de medida desarrollados utilizan sensores de tipo potenciométrico y están contruidos con pastas de la tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*), y también por electrodos metálicos simples en estado puro. Con este método se consiguen dispositivos con características de sencillez de construcción, robustez mecánica, fácil manejo y bajo costo. Con las señales obtenidas se aplican técnicas de reconocimiento de patrones, como son el Análisis de Componentes Principales (PCA), redes neuronales artificiales, técnicas predictivas como PLS, etc.

Se desarrollan varios tipos de aplicaciones, la primera con muestras de fuerte carácter iónico como son las aguas naturales. De esta forma, se realiza un análisis de varios tipos de aguas envasadas y de suministro urbano, alcanzando una buena discriminación de las muestras por medio de análisis PCA. Por medio de técnicas PLS (*Partial Least Square*) se predice la concentración de los iones presentes en esas aguas. Las experiencias con disoluciones acuosas continúan con disoluciones artificiales para lograr la discriminación de dichas disoluciones según el tipo de anión o de catión, concluyendo que es más fácil la discriminación de las disoluciones con distintos anión que con distinto catión, tanto en disoluciones puras como en compuestas.

Las experiencias siguen con muestras líquidas pero de naturaleza más compleja como es el vino. Este tipo de muestras facilita ser analizadas por sistemas de lenguas electrónicas porque están formados por una gran cantidad de componentes, algunos en proporción elevada como es el agua y el alcohol, pero otros en pequeña proporción que son los que proporcionan las características organolépticas del vino. Las experiencias se realizan primero sobre muestras artificiales con algunas características químicas

similares al vino y posteriormente con vinos reales de distinto tipo y tonalidad, consiguen una buena discriminación de las diferentes muestras. Pero la novedad más destacable de los análisis con vino es el desarrollo de un sistema de detección de volátiles por medio de sensores potenciométricos, de esta forma se obtiene un sistema de nariz electrónica húmeda.

En el tercer tipo de experiencias se utilizan muestras de alimentos sólidos pero con gran proporción de agua, como son la carne y el pescado. En el caso del pescado, se realiza múltiples experiencias con varios tipos de electrodos metálicos y se comprueba que los que ofrecen un mejor resultado son los electrodos de oro y de plata, en ambos casos con un comportamiento bastante repetitivo. Aprovechando estos fenómenos se realizan una serie de análisis con redes neuronales para al final obtener un sistema que ofrece un análisis cualitativo que permite determinar la conservación del pescado en tres posibles estados: Apto, Dudoso y no Apto. Este análisis se acompaña con experiencias de bioquímicas y microbianas para así correlacionar con las medidas potenciométricas.

El último tipo de experiencias es el análisis de lomo de cerdo. Por un lado, también se realizan experiencias para determinar si un sistema multielectrodo formado por múltiples metales es capaz de detectar el deterioro de la carne con el paso del tiempo. Un segundo tipo de análisis consiste en lograr una discriminación de diversas piezas de lomo curado de cerdo. Estas piezas se diferencian entre sí por la distinta composición de sales, tanto de NaCl que es el más habitual en el consumo, como KCl, y CaCl₂.

Por lo tanto, el desarrollo de los sistemas de lengua y nariz electrónica que se presente en esta memoria puede mejorar el control de calidad de las muestras analizadas, con buenas perspectivas de aplicación en múltiples campos económicos, sobretodo en la industria alimentaria.

RESUM

En la present tesi doctoral es desenvolupen sistemes electrònics de mesura que tenen com element sensor múltiples elèctrodes de naturalesa electroquímica. Cadascun dels elèctrodes posseïx una sensibilitat no específica davant alguns dels paràmetres o compostos químics de la mostra a analitzar. El conjunt d'elèctrodes aporten una sèrie de senyals que s'analitzen de forma conjunta, per a així obtenir conclusions d'interès, normalment en la discriminació de mostres complexes o la quantificació d'alguns dels seus components. A aquest tipus de sistemes de mesura se li denominen llengües electròniques.

Els sistemes de mesura desenvolupats utilitzen sensors de tipus potenciomètric i estan construïts amb pastes de la tecnologia de capa gruixuda (Thick-Film), i també per elèctrodes metàl·lics simples en estat pur. Amb aquest mètode s'assoleixen dispositius amb característiques de senzillesa de construcció, robustesa mecànica, fàcil maneig i reduït cost. Amb els senyals obtinguts s'apliquen tècniques de reconeixement de patrons, com són l'Anàlisi de Components Principals (PCA), xarxes neuronals artificials, tècniques predictives com PLS, etc.

Es desenvolupen diversos tipus d'aplicacions, la primera amb mostres de fort caràcter iònic com són les aigües naturals. D'aquesta forma, es realitza una anàlisi de diversos tipus d'aigües envasades i de subministrament urbà, arribant a una bona discriminació de les mostres per mitjà d'anàlisi PCA. Amb tècniques PLS (Partial Least Square) es prediu la concentració dels ions presents en aquestes aigües. Les experiències amb dissolucions aquoses continuan amb dissolucions artificials per a assolir la discriminació d'aquestes dissolucions segons el tipus d'anió o de catió, conclouent que és més fàcil la discriminació de les dissolucions amb diferents anió que amb diferent catió, tant en dissolucions pures com en compostes.

Les experiències segueixen amb mostres líquides però de naturalesa més complexa com és el vi. Aquest tipus de mostres es presta a ser analitzades per sistemes de llengües electròniques perquè estan formats per una gran quantitat de components, alguns en proporció elevada com és l'aigua i l'alcohol, però altres en petita proporció que són els quals proporcionen les característiques organolèpticas del vi. Les experiències es realitzen primer sobre mostres artificials amb algunes característiques químiques

similars al vi i posteriorment amb vins reals de diferent tipus i tonalitat, aconsegueixen una bona discriminació de les diferents postres. Però la novetat més destacable de les anàlisis amb vi és el desenvolupament d'un sistema de detecció de volàtils per mitjà de sensors potenciomètrics, d'aquesta forma s'obté un sistema de nas electrònic humida.

En el tercer tipus d'experiències s'utilitzen mostres d'aliments sòlids però amb gran proporció d'aigua, com són la carn i el peix. En el cas del peix es realitza múltiples experiències amb diversos tipus d'elèctrodes metàl·lics i es comprova que els quals ofereixen un millor resultat són els elèctrodes d'or i de plata. En ambdós casos tenien un comportament bastant repetitiu. Aprofitant aquests fenòmens es realitzen una sèrie d'anàlisi amb xarxes neuronals per al final obtenir un sistema que ofereix una anàlisi qualitativa que permet determinar la conservació del peix en tres possibles estats: Apte, Dubtós i no Apte. Aquesta anàlisi s'acompanya amb experiències de bioquímiques i microbianes per a així correlacionar amb les mesures potenciomètrics.

L'últim tipus d'experiències és l'anàlisi de llom de porc. D'una banda, també es realitzen experiències per a determinar si un sistema multielèctrode format per múltiples metalls és capaç de detectar la deterioració de la carn amb el pas del temps. Un segon tipus d'anàlisi consisteix a assolir una discriminació de diverses peces de llom guarit de porc. Aquestes peces es diferencien entre si per la diferent composició de sals, tant de NaCl que és el més habitual en el consum, com KCl, i CaCl₂.

Per tant, el desenvolupament dels sistemes de llengua i nas electrònic que es presenti en aquesta memòria pot millorar el control de qualitat de les mostres analitzades, amb bones perspectives d'aplicació en múltiples camps econòmics, fonamentalment a la indústria alimentària.

ABSTRACT

In the present doctoral thesis electronic systems of measurement have been developed. As element sensor, they include multiple electrodes of nature electrochemical. Each of the electrodes possesses a not specific sensibility to some of the parameters or chemical compounds of the sample to analyzing. The set of electrodes contribute a series of signs that are analyzed of joint form, this way conclusions of interest are obtained, normally the discrimination of complex samples or the quantification of some of their components. This type of measurement systems is denominated electronic tongues.

The systems of measurement developed use sensors of type potentiometric and are constructed by pastes of thick film technology, and also by simple metallic electrodes in pure state. With this method, devices with characteristics of construction simplicity, mechanical robustness, easy handling and low cost are obtained. With the data obtained pattern recognition techniques are applied, such as, Principal Components Analysis (PCA), artificial neuronal networks, predictive techniques (PLS), etc.

Several types of applications are developed, first with samples of strong ionic character as they are the natural waters. This way, an analysis of several types of packaged and urban provision waters is made, reaching a good discrimination of the samples by means of analysis PCA. By means of techniques PLS (Partial Least Square) the concentration of present ions in those waters is predicted. The experiences with acuosis dissolutions continue with artificial dissolutions to obtain the discrimination according to the type of anion or cation, concluding that is easier the discrimination of dissolutions with different anion that with different cation, as much in pure as in complex dissolutions.

The experiences continue with liquid samples but of more complex nature as it is the wine. This type of samples facilitates to be analyzed by systems of electronic tongue because they are formed by a great amount of components, some in elevated proportion as it is the water and the alcohol, but others in small proportion and that are those that provide the organoleptic characteristics of the wine. The experiences are made first on artificial samples with some chemical characteristics similar to the wine and later with real wines of different type and tonality. A good discrimination of the different samples

are obtained. But the most remarkable newness of the analyses with wine is the development of a system of detection of volatile by means of potentiometric sensors, from this form, a system of humid electronic nose is obtained.

In the third type of experiences samples of solid foods are used but with great proportion of water, as they are meat and fish. In the case of the fish, manifold experiences with several types of metallic electrodes is achieved, and it is verified that those that offer better results are the silver and gold electrodes, in both cases with a quite repetitive behavior. Taking advantage of these phenomena, a series of analysis with neuronal networks is carried-out, in order to obtain a system that offers a qualitative analysis that determines the conservation of the fish in three possible states: Apt, Doubtful and Non-Apt. This analysis is accompanied with biochemical and microbial experiences by thus correlating them with the potentiometric measures.

The last type of experiences is the analysis of pork back. On the one hand, also experiences are made to determine if a system multielectrode formed by multiple metals is able to detect the deterioration of the meat through of time. A second type of analysis consists of obtaining a discrimination of diverse pieces of cured back of pork. These pieces are different to each other by the different composition from salts, as much of NaCl that is most habitual in the consumption, like KCl, and CaCl₂.

Therefore, the development of systems of electronic noses and tongues that appears in this memory can improve the control of quality of the analyzed samples, with good perspective of application in multiple economic fields, fundamentally in food industry.

Agradecimientos

En la elaboración de esta tesis doctoral he recibido numerosas ayudas y apoyos, y ahora es el momento que aprovecho para agradecerlas. Este apartado empieza, como no, por los directores de la tesis, en este caso son tres.

A **Juan Soto Camino**, del Departamento de Química, que ha planteado los criterios y las experiencias de esta tesis. Me enseñó a realizar las medidas electroquímicas y estuvo siguiendo las medidas de forma muy directa. Fueron muchos días de largas de estancia en el laboratorio pero que al final han dado el fruto deseado.

A **Eduard Llobet Valero** de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, que me introdujo en las técnicas de reconocimiento de patrones. A pesar de la distancia siempre ha estado disponible, de forma rápida y eficaz, Este agradecimiento es también extensible al resto de miembros de su grupo de investigación, concretamente Jesús Brezmes que me aportó los algoritmos de cálculo para ha permitido una mejor interpretación de los resultados.

A **Eduardo Garcia Breijo** director, compañero y amigo desde hace ya bastantes años, alma del Grupo de Microelectrónica Híbrida. Después del reto en el agradecimiento de su tesis me resulta complicado responderle. Simplemente que gracias a su determinación, su empuje y sus ánimos he podido alcanzar este objetivo. Y hablando del Grupo de Microelectrónica es necesario citar a **Javier Ibáñez**, amigo y compañero desde que entramos juntos como profesores en la universidad. Espero que acabes pronto tu tesis

A **Ramón Martínez Máñez**, director del Instituto de Química Molecular Aplicada (CIQMA), además de buenos consejos, me ha permitido sacar buen partido de los trabajos que he realizado, asesorando en la escritura de los artículos.

José Manuel Barat del Departamento de Tecnología de los Alimentos, que me ofreció la oportunidad de trabajar en su laboratorio con las experiencias de pescado y carne. Este trabajo fue acompañado con experiencias de tipo bioquímicos que fueron realizados, que yo sepa, por **Diana, Paqui, Marta, Gema**, etc, a las cuales también agradezco su colaboración

A **Álvaro Tormos** por la inestimable ayuda en los programas de adquisición de datos, de forma metódica, clara y precisa. A **Fernando Ibáñez** tutor de los Trabajos de Investigación, y al resto de compañeros del Departamento de Ingeniería Electrónica, sin olvidar a la secretaria **Roberta Matéu** que siempre resuelve cualquier gestión de los largos trámites de doctorado.

A todo el grupo de Desarrollo de Sensores. Algunos me ayudaron en la preparación de electrodos y disoluciones químicas, en un principio **M^a Jesús Seguí**, y posteriormente **Carmen Coll** y **R. Hanoi Labrador**; a **Beatriz García** por la colaboración en los cálculos que lograron publicarse. Y el resto del grupo, que hemos compartido espacio limitado en el laboratorio con compañía y amistad.

A **Sandra Carreres** y **Teresa Pardo** que colaboraron en la realización de las medidas para los análisis con vino.

A **Enrique Ballester** director de la E.T.S.I.D. que ha creído en nosotros y nos ha ofrecido el espacio dentro de la Escuela para el Laboratorio de Microelectrónica Híbrida, desde su pequeña y oscura sede inicial hasta la luminosa, espaciosa e envidiable sede actual. Esta técnica electrónica se ha implantado en este laboratorio gracias al apoyo y experiencia de **Ramiro Álvarez Santos**.

Dedicatoria

En el apartado de agradecimientos he omitido citar a otras personas, que aunque no han colaborado directamente en la tesis, si que me han facilitado la tarea.

*Lógicamente me refiero a toda mi familia, y muy especialmente a mi mujer **Loli**, que mientras yo he estado realizando todo lo que voy a narrar a continuación, ella le ha tocado hacer las faenas de la casa y de los hijos. Sirva este motivo como una sincera dedicatoria.*

INDICE

<i>Capítulo 1. Introducción.....</i>	<i>1</i>
1.1 <i>SIMILITUD ENTRE LENGUA ELECTRÓNICA CON EL SENTIDO DEL GUSTO BIOLÓGICO.....</i>	<i>3</i>
1.1.1 Sentido del Gusto Humano	3
2 LENGUA ELECTRÓNICA	5
2.1 <i>APLICACIONES DE NARICES Y LENGUAS ELECTRÓNICAS.....</i>	<i>6</i>
2.2 <i>ETAPAS DE LA LENGUA ELECTRÓNICA</i>	<i>7</i>
2.2.1 Sensores de la Lengua Electrónica.....	8
2.2.2 Sistema de Acondicionamiento de la Señal	9
2.2.3 Sistema de Adquisición de Datos.....	9
2.2.4 Análisis Multivariante de los Datos	9
3 OBJETIVOS.....	9
4 CONTENIDO.....	13
<i>Capítulo 2. _Sensores para Lenguas Electrónicas.....</i>	<i>17</i>
1 CLASIFICACION DE LOS SENSORES	17
2 SENSORES FÍSICOS	17
2.1 <i>SENSORES MÁSICOS.....</i>	<i>18</i>
2.1.1 Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)	18
2.1.2 Onda Acústica de Superficie (SAW)	20
2.2 <i>SENSORES OPTICOS.....</i>	<i>21</i>
2.2.1 Espectrometría	21
2.2.2 Luminiscencia	22
2.2.3 Resonancia por Plasmón en Superficie (SPR)	23
3 SENSORES QUÍMICOS.....	23
3.1 <i>SENSORES QUÍMICOS ÓPTICOS.....</i>	<i>24</i>
3.1.1 Biosensores	25
3.2 <i>SENSORES ELECTROQUÍMICOS.....</i>	<i>26</i>
4 FUNDAMENTOS DE LOS SENSORES ELECTROQUÍMICOS	26
4.1 <i>CELDA ELECTROQUÍMICAS.....</i>	<i>26</i>
4.1.1 Conducción en una Celda.....	27
4.1.2 Estructura de la Disolución: la Doble Capa	28
4.1.3 Corrientes Faradaicas y no Faradaicas	28
4.1.4 Celdas Galvánicas y Electrolíticas	29
4.2 <i>TERMODINÁMICA QUÍMICA.....</i>	<i>30</i>
4.2.1 Energía Libre de Gibbs	30
4.2.2 Energía Libre y Voltaje de una Pila	31
4.3 <i>ECUACIÓN DE NERNST.....</i>	<i>32</i>
4.3.1 Ecuación de Nicolsky-Eisenman.....	33
4.4 <i>TIPOS DE MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS.....</i>	<i>34</i>
5 TÉCNICAS POTENCIOMÉTRICAS.....	35
5.1 <i>TIPOS DE ELECTRODOS.....</i>	<i>36</i>

5.1.1	Electrodo de Referencia	36
5.1.2	Electrodo Indicador	37
5.2	<i>ELECTRODOS INDICADORES METÁLICOS</i>	38
5.2.1	Electrodos de Clase 0 o Redox.....	38
5.2.2	Electrodos de 1ª Clase.....	39
5.2.3	Electrodos de 2ª Clase.....	40
5.2.4	Electrodos de 3ª Clase.....	41
5.3	<i>MODELO PARA DESCRIBIR EL POTENCIAL REDOX EN ELECTRODOS</i> <i>INDICADORES DE 1ª, 2ª Y 3ª CLASE</i>	41
5.4	<i>ELECTRODOS INDICADORES DE MEMBRANA</i>	42
5.4.1	Clasificación de las Membranas.....	42
5.5	<i>OTROS DISPOSITIVOS PARA MEDIDAS POTENCIOMÉTRICAS</i>	43
5.5.1	Transistores de Efecto de Campo Selectivos de Iones (ISFET).....	44
5.5.2	Electrodos Sensibles a Moléculas	45
5.6	<i>INSTRUMENTOS PARA MEDIR LOS POTENCIALES DE CELDA</i>	46
5.6.1	Medidas Potenciométricas Directas	46
6	<i>TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS</i>	46
6.1	<i>SEÑALES E INSTRUMENTACIÓN EN VOLTAMETRÍA</i>	47
6.2	<i>VOLTAMETRÍA CÍCLICA</i>	47
7	<i>OTRAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS</i>	48
7.1	<i>CULOMBIMETRÍA</i>	48
7.2	<i>CONDUCTIMETRÍA</i>	49
7.2.1	Medida de la Conductividad	49
8	<i>TECNOLOGÍAS DE FABRICACIÓN DE SENSORES QUÍMICOS EN</i> <i>ESTADO SÓLIDO</i>	50
8.1	<i>TECNOLOGÍA THICK-FILM o CAPA GRUESA</i>	52
8.1.1	Otras Técnicas de Deposición de Materiales	53
8.2	<i>TENDENCIAS ACTUALES EN TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA PARA</i> <i>SENSORES</i>	56
 <i>Capítulo 3. Procesado de Datos</i>		59
1	<i>ESQUEMA DE BLOQUES</i>	60
1.1	<i>SELECCION DE DATOS</i>	61
1.2	<i>MATRIZ DE DATOS</i>	62
2	<i>PREPROCESADO DE DATOS</i>	62
2.1	<i>CENTRADO RESPECTO AL VALOR MEDIO</i>	63
2.2	<i>ESTANDARIZACIÓN</i>	63
2.3	<i>NORMALIZACIÓN DEL SENSOR</i>	64
2.4	<i>NORMALIZACIÓN DE LA MATRIZ</i>	65
3	<i>PROCESADO DE DATOS</i>	66
3.1	<i>TÉRMINOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE DATOS</i>	66
3.1.1	Métodos paramétricos o no paramétricos,.....	66
3.1.2	Métodos supervisados o no supervisados.....	66

3.1.3	Métodos Lineales y No lineales	67
3.2	CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PROCESADO DE DATOS	67
3.3	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)	68
3.3.1	Objetivo PCA	69
3.3.2	Calculo de PCA	70
3.4	AGRUPACIÓN JERÁRQUICA	73
3.5	Clasificación Basada en Distancias	75
3.5.1	K-means	75
3.5.2	Vecino más Próximo (NN)	75
3.5.3	k-Vecinos más Próximos (k- NN)	75
3.6	Análisis de Función Discriminante (DFA)	76
3.7	CLASIFICADORES CON REDES NEURONALES	77
3.7.1	Perceptron Multicapa	78
3.7.2	Función de Base Radial (RBF),	80
4	REGRESIÓN	80
4.1	MEDIDAS DE DEPENDENCIA LINEAL	81
4.1.1	Diagramas de Dispersión	81
4.1.2	Covarianza	81
4.1.3	Correlación	82
4.1.4	Recta de Regresión	82
4.1.5	Regresión Lineal Múltiple	83
4.2	Regresión de Componentes Principales (PCR)	84
4.3	REGRESIÓN PLS (Partial Least Square)	84
4.3.1	Modelo Básico	85
4.3.2	Objetivo de la Regresión PLS: Predecir Y a Partir de X	85
4.3.3	Proceso de Cálculo de PLS	86
5	VALIDACIÓN	87
6	PERPECTIVAS DEL PROCESADO DE DATOS	89
7	REDES FUZZY ARTMAP	90
7.1	LIMITACIONES DE LAS REDES NEURONALES PERCEPTRON	90
7.2	Teoría de la Resonancia Adaptativa (ART)	91
7.2.1	Arquitectura de la Red ART	92
7.2.2	FUZZY ART	93
7.2.3	ARTMAP	94
7.2.4	FUZZY ARTMAP	94
7.2.5	Implementación	97
Capítulo 4. Desarrollo de las <u>Lenguas Electrónicas</u>		99
1	Lenguas Electrónicas Utilizando Técnicas Potenciométricas	99
1.1	Lenguas Electrónicas con Sensores de Polímero-Lípido	100
1.1.1	Sistema de Medida	101
1.1.2	Experiencias	104
1.2	Lenguas Electrónicas con Sensores de Vidrio de Calcogenuro	107
1.2.1	“ELECTRONIC TONGUE”	109

1.2.2	Nuevos Microsensores	111
1.2.3	Aplicaciones Recientes	111
1.2.4	Fusión de Distintos Métodos de Medida.....	113
1.2.5	Otros Grupos de Investigación sobre Sensores de Calcogenuro.....	114
1.3	<i>LENGUA ELECTRÓNICA CON ELECTRODOS ION-SELECTIVOS</i>	115
1.3.1	Electrodos Ion-Selectivos (ISE) de Membranas de Polímeros de PVC.....	117
1.3.2	Otros Grupos de Investigación con Electrodo Ion-Selectivos	119
1.4	<i>ELECTRODOS METÁLICOS Y ELEMENTOS SIMPLES</i>	120
2	<i>Lenguas Electrónicas con Técnicas Voltamétricas</i>	122
2.1	<i>Voltametría con Electrodo Metálicos</i>	122
2.2	<i>Voltametría con Polímeros Conductores</i>	128
2.3	<i>Otras Lenguas Electrónicas Voltamétricas</i>	131
3	<i>Lenguas Electrónicas Amperométricas</i>	132
4	<i>Lenguas Electrónicas por Variación de Impedancia</i>	133
5	<i>Lenguas Electrónicas con Técnicas de Onda Acústica de Superficie (SAW)</i>	135
6	<i>Lenguas Electrónicas con Microbalanzas de Cristal de Cuarzo (QCM)</i>	137
7	<i>Lenguas Electrónicas con ISFET</i>	139
8	<i>Lengua Electrónica con Sensores Colorimétricos</i>	139
9	<i>Sistemas de Lengua Electrónica Comerciales</i>	140
 <i>Capítulo 5. Experiencias en Medio Acuoso</i>		 143
1	<i>ANÁLISIS DEL AGUA</i>	143
1.1	<i>AGUAS POTABLES</i>	144
2	<i>OBJETIVO DEL ANÁLISIS</i>	145
2.1	<i>ELECTRODOS</i>	146
2.1.1	Multielectrodo en Tecnología de Capa Gruesa	147
2.1.2	Electrodos Individuales.....	149
2.2	<i>PROCESO DE MEDIDA</i>	150
2.3	<i>RESULTADOS</i>	151
2.4	<i>ANÁLISIS MULTIVARIANTE</i>	154
2.4.1	Análisis Datos de Aguas Embotelladas.....	156
2.5	<i>REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRODOS</i>	157
2.5.1	Predicción del Tipo de Muestra	157
2.6	<i>ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES EN AGUA</i>	158
3	<i>DISCRIMINACIÓN DE DISOLUCIONES PREPARADAS</i>	160
3.1	<i>SISTEMA DE MEDIDA</i>	160
3.2	<i>RESULTADOS</i>	161
3.2.1	Análisis con Mezclas de Disoluciones	165
3.3	<i>CONCLUSIÓN</i>	169
 <i>Capítulo 6. Experiencias. Análisis de Vino</i>		 171

1	COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL VINO	172
1.1	<i>EL PROCESO DE VINIFICACIÓN</i>	173
1.1.1	Fermentación Alcohólica	174
1.1.2	Fermentación Maloláctica	175
1.1.3	Acidez Volátil	175
1.1.4	Ácido Acético	175
2	ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE VINO CON LENGUA Y NARIZ ELECTRÓNICA	176
2.1	<i>SISTEMAS DE NARICES ELECTRÓNICAS APLICADOS A LOS VINOS</i>	177
2.1.1	Sensores Resistivos de Óxidos Estaño	177
2.1.2	Sensores de Óxido Metálico Semiconductor (WO ₃).....	180
2.1.3	Sensores con Películas Langmuir-Blodgett.....	181
2.1.4	Sensores de Ondas Acústicas Superficiales (SAW).....	181
2.1.5	Otros Sistemas de Análisis de Vino con Narices Electrónicas	182
3	SISTEMA DE MEDIDA	182
3.1	<i>DESARROLLO DE SENSORES PARA LA LENGUA ELECTRÓNICA</i>	183
3.1.1	Electrodos Discretos.....	184
3.1.2	Multielectrodo para Lengua Electrónica	184
4	MEDIDAS CON VINOS.....	186
4.1	<i>ANÁLISIS DE VINOS CON ELECTRODOS DISCRETOS</i>	186
4.1.1	Resultados. Análisis PCA	186
4.2	<i>ANÁLISIS VINOS TINTOS CON MULTIELECTRODO</i>	187
5	NARIZ ELECTRÓNICA PARA VINOS	188
5.1	<i>NARIZ ELECTRÓNICA CON ELECTRODOS DISCRETOS</i>	189
5.1.1	Sensor de Vidrio.....	189
5.1.2	Funda para Varios Electrodo	190
5.1.3	Conclusión	191
6	MONITORIZACION DETERIORO DEL VINO CON SISTEMA DE LENGUA Y NARIZ ELECTRÓNICA. ACIDEZ VOLÁTIL	192
6.1	<i>SISTEMA DE MEDIDA. MULTIELECTRODO PARA NARIZ ELECTRÓNICA</i>	192
6.1.1	Multielectrodo para Nariz Electrónica	193
6.2	<i>EXPERIENCIAS</i>	193
6.3	<i>MEDIDA DE LA ACIDEZ</i>	193
6.4	<i>MEDIDAS DE LA LENGUA ELECTRÓNICA</i>	195
6.4.1	Análisis PCA de la Lengua Electrónica	197
6.4.2	Pesos de Cada Electrodo en los Componentes Principales (PC).....	198
6.5	<i>RESULTADOS DE LA NARIZ ELECTRÓNICA</i>	198
6.6	<i>COMBINACIÓN DE LOS DATOS DE LA NARIZ ELECTRÓNICA Y DE LA LENGUA ELECTRÓNICA</i>	201
<i>Capítulo 7. Experiencias: Análisis de la Conservación de Pescado</i>		207
1	ASPECTOS BIOLÓGICOS	208
1.1	<i>ANATOMÍA DEL MÚSCULO DE LOS PECES</i>	208
1.2	<i>COMPOSICIÓN QUÍMICA</i>	208
1.2.1	Lípidos	209

1.2.2	Proteínas.....	209
1.2.3	Compuestos Extractables que Contienen Nitrógeno.....	210
1.2.4	Compuestos que Contienen Azufre.....	210
1.2.5	Vitaminas y Minerales.....	210
1.3	<i>CAMBIOS POST-MORTEM Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO</i>	<i>211</i>
1.3.1	Cambios Sensoriales en el Pescado Fresco Crudo.....	211
1.3.2	Cambios en la Calidad Comestible.....	213
1.3.3	Cambios Físicos. Propiedades Eléctricas.....	214
1.3.4	Cambios de Parámetros Químicos.....	215
1.3.5	Cambios Autolíticos.....	218
1.3.6	Cambios Bacteriológicos.....	221
1.3.7	Nitrógeno Básico Volátil.....	222
1.3.8	Aminas Biógenas.....	223
2	LINEAS DE INVESTIGACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN CALIDAD DEL PESCADO CON MÉTODOS RÁPIDOS	224
2.1	<i>PROYETO EUROPEO DE INVESTIGACIÓN MUSTEC</i>	<i>225</i>
2.2	<i>MEDIDA DE VOLÁTILES EN EL PESCADO</i>	<i>228</i>
2.2.1	Aplicación de Técnicas Multivariante para el Control de la Frescura del Pescado. Narices Electrónicas.....	229
2.3	<i>ANÁLISIS DE CALIDAD DEL PESCADO POR MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS</i>	<i>231</i>
2.4	<i>ELECTRODOS METÁLICOS PARA EL CONTROL DE LA FRESCURA DEL PESCADO</i>	<i>232</i>
3	EXPERIENCIAS	234
3.1	<i>ESTUDIO DE LOS SENSORES EN DISOLUCIONES DE REFERENCIA</i>	<i>234</i>
3.1.1	Estandarización pH.....	235
3.1.2	Caracterización al Potencial Redox.....	236
3.1.3	Calibrado con Cisteína.....	238
3.1.4	Normalización de la Salinidad.....	240
3.1.5	Conclusión de las Experiencias con Disoluciones de Referencia.....	242
4	ANÁLISIS CON PESCADO	242
4.1	<i>SENSORES DE MEDIDA</i>	<i>242</i>
4.1.1	Multielectrodo en Tecnología de Capa Gruesa (<i>Thick-Film</i>).....	243
4.1.2	Sistema de Medida con Electrodo Punzantes.....	245
4.1.3	Sistema Triplicado de Adquisición de Datos.....	246
4.1.4	Muestras de Pescado y Protocolo de Medida.....	247
5	EXPERIENCIAS CON ELECTRODOS EN TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA	249
5.1.1	RESULTADOS DE LA PRIMERA EXPERIENCIA.....	249
5.2	<i>MEDIDAS POTENCIMÉTRICAS, VOLÁTILES Y EXPERIENCIAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS</i>	<i>251</i>
5.2.1	Medidas de Volátiles.....	251
5.2.2	Medidas Biológicas.....	252
5.2.3	Comparación de los Resultados de la Lengua Electrónica y Análisis Químicos.....	255
6	EXPERIENCIAS CON ELECTRODOS PUNZANTES	258
6.1	<i>MEDIDAS EN REFRIGERACIÓN CON PESCADO ENTERO</i>	<i>259</i>
6.2	<i>MEDIDAS A TEMPERATURA AMBIENTE (25°C) CON PESCADO ENTERO</i>	<i>260</i>

6.3	<i>MEDIDAS CON PESADO ENTERO Y TRITURADO</i>	261
7	EXPERIENCIAS CON MEDIDAS EN MODO DISCRETO	262
7.1	<i>EXPERIENCIA CON PESCADO ENTERO</i>	263
7.1.1	ANÁLISIS MULTIVARIANTE.	263
7.2	<i>MEDIDAS EN MODO DISCRETO CON PESCADO TRITURADO. ANÁLISIS</i> <i>BIOQUÍMICOS</i>	267
7.2.1	Resultados Medidas de Electrodo.....	268
7.2.2	Análisis Multivariante	268
7.2.3	Resultados de Medidas Biológicas con Pescado Triturado.....	272
7.2.4	Correlación de los datos Bioquímicos con los Potenciométricos.....	276
8	CONCLUSIONES.....	278
<i>Capítulo 8. Experiencias. Análisis de Carne</i>		279
1	ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE CARNE CON LENGUAS ELECTRÓNICAS	280
2	DETECCIÓN DEL DETERIORO DE LOMO FRESCO DE CERDO	281
2.1.1	Sistema de Medida	282
2.1.2	Sensores	282
2.2	<i>EXPERIENCIAS</i>	282
2.3	<i>RESULTADOS</i>	284
2.3.1	Resultados de las Gráficas Temporales.....	284
2.3.2	Análisis Multivariante.....	285
2.4	<i>ANÁLISIS DE DERIVAS DE LOS ELECTRODOS</i>	288
2.5	<i>CLASIFICACIÓN DE LAS MEDIDAS</i>	291
2.5.1	APLICACIONES DE REDES NEURONALES PERCEPTRON (MLP)	291
2.5.2	Aplicación de la Red <i>Fuzzy Artmap</i> con las Medidas de Lomo.....	293
2.6	<i>CONCLUSIONES DE LAS EXPERIENCIAS CON LOMO FRESCO</i>	294
3	MEDIDAS DE DIVERSOS TIPOS DE LOMO CURADO	295
3.1	<i>OBJETIVO</i>	295
3.2	<i>SISTEMA DE MULTIELECTRODOS</i>	296
3.3	<i>EXPERIENCIA</i>	296
3.4	<i>RESULTADOS</i>	297
3.5	<i>CONCLUSIÓN DE LAS MEDIDAS CON LOMO CURADO</i>	300
<i>Capítulo 9. Conclusiones</i>		301
1	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA: PATENTES, PUBLICACIONES, CONGRESOS Y PROYECTOS.	303
1.1	<i>PATENTES</i>	303
1.2	<i>PUBLICACIONES</i>	304
1.3	<i>CONGRESOS</i>	305
1.4	<i>PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN</i>	310

<i>Capítulo 10. Líneas Futuras</i>	313
1 PASTAS PROPIAS PARA TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA (<i>THICK-FILM</i>)	313
1.1 <i>CARACTERÍSTICAS DE LAS PASTAS DE TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA</i>	314
1.1.1 Fabricación de Pastas	314
2 OTROS TIPOS DE SENSORES	315
2.1 <i>DESARROLLO DE MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS (SAMs)</i>	315
3 VOLTAMETRÍA CÍCLICA	316
4 NARICES ELECTRÓNICAS	317
5 EQUIPOS DE MEDIDA PORTÁTILES.....	317
5.1 <i>PERSPECTIVAS DE FUTURO</i>	319
5.1.1 Etapa Transductora de Señal.....	320
5.1.2 Etapa de Acondicionamiento y Digitalización de la Señal	320
5.1.3 Etapas de Procesado y Control.....	320
5.1.4 Etapa de Salida.....	320
6 APLICACIÓN DE LENGUA ELECTRÓNICA A OTROS TIPOS DE ALIMENTOS	321
7 APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES A SENSORES CROMOGÉNICOS	321
 <i>Anexo I. Tecnología de Circuitos de Capa Gruesa</i>	 325
1 MATERIALES.....	325
1.1 <i>SUBSTRATOS</i>	325
1.2 <i>TINTAS O PASTAS</i>	326
1.2.1 Características de las Pastas	326
1.2.2 Clasificación de las Pastas	327
2 PROCESO DE FABRICACIÓN	330
2.1 <i>PANTALLAS SERIGRÁFICAS</i>	331
2.1.1 Marcos.....	332
2.1.2 Telas.....	332
2.1.3 Film Fotosensible.....	334
2.1.4 Insolado y Revelado.....	337
2.2 <i>SERIGRAFÍA</i>	339
2.2.1 Pastas.....	340
2.2.2 Rasqueta.....	340
2.2.3 Maquinas de Serigrafía	341
2.2.4 Nivelado y Secado.....	342
2.3 <i>CICLO TÉRMICO</i>	343
2.3.1 Hornos de Quemado.....	345
3 ELECTRODOS UTILIZADOS EN LAS EXPERIENCIAS.....	346
3.1 <i>MATERIALES</i>	346
3.1.1 Substratos	346
3.1.2 Pastas.....	346
3.2 <i>PANTALLAS Y TELAS SERIGRÁFICAS</i>	347
4 RESULTADOS FINALES.....	350
4.1 <i>SENSOR DE RuO₂</i>	350

4.2	<i>SENSOR DE CARBONO</i>	352
4.3	<i>ELECTRODO DE PLATA</i>	353
4.4	<i>ELECTRODO DE ORO</i>	354
4.5	<i>ELECTRODO DE PALADIO</i>	355
4.6	<i>ELECTRODO DE CLORURO DE PLATA</i>	356
4.7	<i>ELECTRODO DE COBRE</i>	357
<i>Anexo II. Sistema de Medida</i>		359
5	<i>ACONDICIONAMIENTO DE LA SEÑAL</i>	360
5.1	<i>PRIMERA ETAPA: AMPLIFICADOR DE ALTA IMPEDANCIA DE ENTRADA</i> ...	361
5.2	<i>SEGUNDA ETAPA: FILTROS</i>	362
5.3	<i>CALIBRADO DEL SISTEMA ACONDICIONADOR</i>	365
5.4	<i>MULTIPLEXACIÓN DE ENTRADAS</i>	366
6	<i>SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS</i>	366
6.1	<i>TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS PCI – 9112</i>	366
6.1.1	<i>Programas de Captura, Monitorización y Almacenamiento de Datos con VEE-Pro</i>	369

Capítulo 1. Introducción.

A lo largo de la historia de la investigación de los sensores químicos siempre se ha buscado dispositivos que sean lo más específicos posible hacia el parámetro que se desea medir, que logren la medida con la mayor precisión posible y que las medidas se realicen con la menor interferencia de otros parámetros no deseados. Bajo este planteamiento se desarrollaron electrodos específicos, como por ejemplo los electrodos selectivos de iones (ISE)¹. Pero existen múltiples aplicaciones en donde se busca una diferenciación cualitativa entre distintas muestras analizadas. En este caso, se puede medir diversos parámetros que estén relacionados con un criterio de diferenciación, pero en lugar de buscar una gran precisión en la medida de cada uno de estos parámetros de forma individual, se busca la relación entre los distintos parámetros, para así obtener una valoración cualitativa global.

Bajo estas premisas nacieron, hace algunas décadas, las denominadas narices electrónicas, que aplican sensores de gases para la detección y discriminación de aromas.² Reciben este nombre por su analogía con el sentido del olfato biológico³. Los sensores de gases suelen tener como característica principal la falta de selectividad. Esta característica es un inconveniente cuando se desea medir la presencia de un determinado gas en un conjunto de múltiples gases, pero en cambio puede ser una ventaja cuando se desea detectar y discriminar un conjunto de gases de otro distinto. Así es como actúa el olfato biológico, donde las moléculas volátiles provocadoras del olor son atrapadas por la cavidad nasal y a través del área olfativa (epitelio) la señal generada alcanza el

¹ K. Camman. *Working with Ion-Selective Electrodes*. Springer, Berlin (1979).

² J.W. Gardner, P.N. Bartlett, (eds.), *Sensors and Sensory Systems for an Electronic Nose*, NATO ASI Series E: Applied Sciences; Dordrecht: Kluwer (1992), Vol. 212.

³ T.C. Pearce, J.W. Gardner, W. Göpel. *Strategies for Mimicking Olfaction: The Next Generation of Electronic Noses*, Sensors Update, Vol. 3, Wiley-VCH, Weinheim, (1998), 61-130.

cerebro donde el conjunto de señales es procesado y comparado con las señales almacenadas en la memoria, identificando de esta forma los olores⁴.

Las narices electrónicas han encontrado múltiples aplicaciones, tanto en el campo de la industria alimentaria, como en otros campos, como la medicina para el diagnóstico no invasivo⁵, control de contaminación atmosférica, búsqueda de drogas y explosivos, etc. Posiblemente su mayor repercusión es en el control y clasificación de alimentos: vino⁶, frutas,⁷ café, aceites⁸, etc.

Más recientemente⁹, y siguiendo un concepto similar a las narices electrónicas, se están desarrollando las llamadas lenguas electrónicas para su aplicación en medios líquidos, asemejando por ello al sentido del gusto biológico.

El punto de partida de las lenguas electrónicas fue una extensión de las aplicaciones de los sensores ion-selectivos potenciométricos. Este tipo de sensores suele tener una buena precisión en disoluciones simples, pero en disoluciones complejas surgen problemas con los elementos interferentes, que afecta a la fiabilidad de las medidas. Como alternativa, se planteó un conjunto de sensores inespecíficos con sensibilidad cruzada. Es decir, sensores con sensibilidad a múltiples elementos interferentes, cada uno con diferente grado de sensibilidad pero logrando en conjunto una discriminación de muestras complejas.

Según lo indicado, se puede definir una lengua electrónica como un sistema electrónico que, por medio de múltiples sensores no específicos, puede realizar un análisis cualitativo con muestras de naturaleza líquida. Con el conjunto de electrodos se

⁴ J. Gardner, P. Barlett. *A brief history of electronic noses*. Sensors and Actuators, 18-19 (1994) 211-220.

⁵ C. Di Natale, A. Macagnano, R. Paolesse, E. Tarizzo, A. Mantini, A. D'Amico. *Human skin odour analysis by means of an electronic tongue*. Sensors and Actuators B, 65 (2000) 216-219.

⁶ M. Garcia, M. Aleixandre, J. Gutiérrez, M.C. Horrillo. *Electronic nose for wine discrimination*. Sensors and Actuators B, 113 (2006) 911-916.

⁷ J. Brezmes, E. Llobet, X. Vilanova, G. Saiz, X. Correig. *Fruit ripeness monitoring using an Electronic Nose*. Sensors and Actuators B, 69 (2000) 223-229.

⁸ A. Gutiérrez. *Evaluación de la calidad del aceite de oliva mediante dispositivos electrónicos basados en sensores de aromas y sensores ópticos*. Tesis Doctoral Universidad Politécnica de Valencia (2002).

⁹ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, F. Davide, A. D'Amico. *Tasting of beverages using an electronic tongue*. Sensors and Actuators B, 44 (1997) 291-296.

puede obtener una “huella electrónica” de la muestra, que corresponde con la expresión de las medidas del conjunto de electrodos¹⁰.

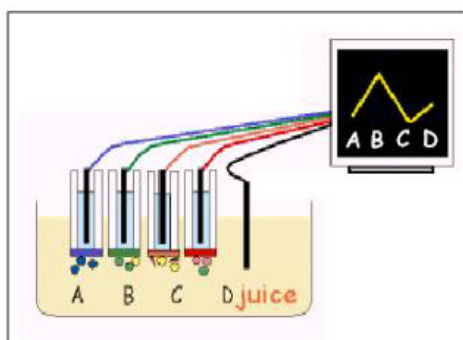


Figura 1. Huella electrónica de una muestra de zumo.

1.1 SIMILITUD ENTRE LENGUA ELECTRÓNICA CON EL SENTIDO DEL GUSTO BIOLÓGICO

El nombre de lengua electrónica da a entender su analogía con la lengua biológica y con un funcionamiento similar al sentido del gusto humano. Esta similitud queda reflejada en cada una de las etapas de ambos mecanismos.

1.1.1 Sentido del Gusto Humano

La lengua del hombre tiene incrustadas pequeñas protuberancias cónicas, o papilas, que albergan los brotes gustativos. Cada brote gustativo consta de células receptoras y en cada célula de este tipo existen vellosidades del gusto con sitios receptores para moléculas con sabor. Las células receptoras pueden distinguir cuatro sabores generales: dulce, salado, amargo y agrio. Las áreas de respuesta a estos sabores se encuentran localizadas en partes específicas de la lengua.

Los sabores **agri**os son producidos por los iones hidrógeno de los ácidos y los sabores **salad**os por los aniones de las sales (por ejemplo, los iones cloruro). El sabor **amargo** se debe principalmente a una clase de compuestos llamados alcaloides, por ejemplo, la quinina, la cafeína y la nicotina. Muchas sustancias distintas al azúcar

¹⁰ Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya, C. Di Natale, A. D'amico. *Nonspecific sensor arrays ("electronic tongue") for chemical analysis of liquids* (IUPAC technical report). *Pure and applied chemistry*, 77, (2005), 1966-1983.

pueden evocar un sabor **dulce**, por ejemplo etilenglicol (anticongelante), alcoholes, aminoácidos y ciertas sales de plomo y berilio. Recientemente se ha introducido un quinto sabor básico, denominado por el término japonés de **umami** y que se relaciona con el sabor de las carnes y pescados, su representante más significativo es el glutamato monosódico¹¹.

No se conoce el mecanismo exacto por el cual una molécula de sabor estimula a una célula del gusto, pero para que una molécula llegue a los brotes gustativos debe ser soluble en agua. Las moléculas que evocan un sabor se conocen como sápidas (del latín *sapere*, con sabor). Los sabores particulares son producidos por las unidades saporíferas de las moléculas. La unidad saporífera de lo dulce recibe el nombre glucóforo¹². Se cree que el glucóforo se une a su proteína receptora y forma enlaces de hidrógeno. La sacarina ($C_7H_5O_3NS$), un sustituto sintético del azúcar, contiene un glucóforo semejante a los del azúcar, cuando el átomo de H que está unido al átomo de N en la sacarina se reemplaza por un grupo metilo (CH_3), se pierde el sabor dulce. En la **Figura 2** se muestra un esquema del proceso de identificación del gusto. Las células receptoras de sabor se encuentran en distintas áreas de la lengua. En el ejemplo, la unidad saporífera de fructosa ($C_6H_{12}O_6$) forma enlaces de hidrógeno con el sitio receptor en los brotes de sabor dulce. La sacarina contiene una unidad saporífera semejante (el área sombreada) y por lo tanto evoca una respuesta equivalente de las células del sabor dulce. Las células receptoras generan una señal nerviosa que se transmite al cerebro por medio de los nervios sensitivos donde, por medio de una red de neuronas, se puede reconocer el sabor aplicando la memoria de anteriores tomas.

¹¹ Y. Kawamura and M. R. Kare (eds.) *Umami: A Basic Taste*, Marcel Dekker, New York, 1987.

¹² R. Chang *Química* 6ª ed. McGraw-Hill (1998).

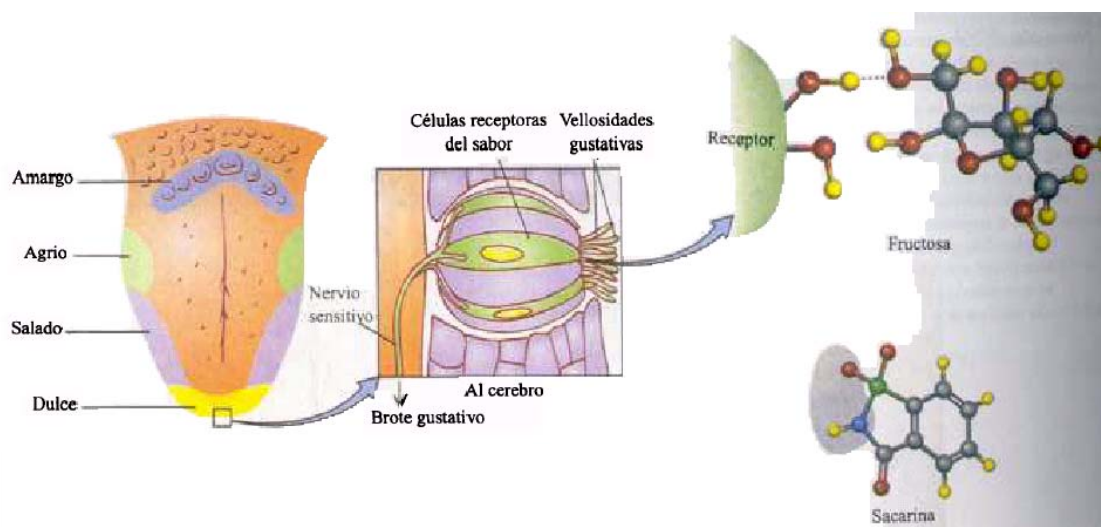


Figura 2. Sabores en lengua biológica

2 LENGUA ELECTRÓNICA

La similitud entre lengua biológica y lengua electrónica se manifiesta en cada una de sus etapas. Así, en los sistemas de lengua electrónica la función del alimento lo realizan muestras de carácter líquido, que al tener un contacto íntimo con los sensores actúan de forma similar a la relación de los alimentos con las papilas gustativas. Los sensores no suelen ser todos iguales sino que poseen normalmente diferentes tipos de sensibilidades, de la misma forma que hay diferentes papilas para diferentes gustos. Los sensores del sistema de lengua electrónica realizan medidas que adquieren forma de señal eléctrica, esta señal suele precisar un acondicionamiento antes de ser transmitida a un ordenador de forma semejante a los nervios sensitivos del gusto transmiten la señal nerviosa al cerebro. En el ordenador se realiza un análisis de los datos para reconocer patrones de medidas o realizar clasificaciones por analogía con análisis previos, que equivale al trabajo que realizan las neuronas del cerebro para procesar la información de la memoria y asociar el nuevo producto a un sabor conocido.

La similitud de la lengua electrónica con el sentido del gusto biológico queda resumida en el esquema de bloques de la **Figura 3**.

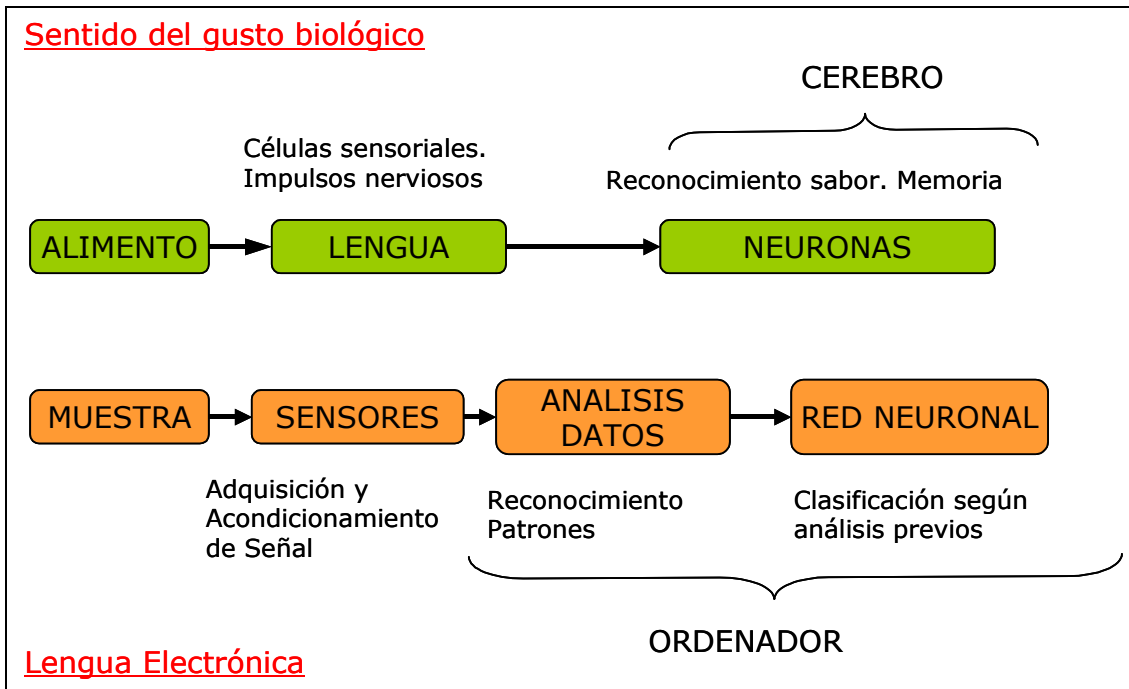


Figura 3. Símil del sentido gusto con lengua electrónica

2.1 APLICACIONES DE NARICES Y LENGUAS ELECTRÓNICAS

Son múltiples, y cada vez mayores, las aplicaciones de los sistemas de lenguas electrónicas. Algunas vienen como extensión de las narices electrónicas, donde se encontró aplicación en aquellas actividades donde era necesario un reconocimiento cualitativo de forma rápida, cómoda y sencilla. Ejemplos de posibles aplicaciones son las siguientes:

Medio ambiente¹³:

- Control contaminación del aire y agua.
- Vertidos tóxicos.

Industria alimentaria¹⁴:

¹³ S. Zampolli, I. Elmi, F. Ahmed, M. Passini, G. C. Cardinali, S. Nicoletti, L. Dori. *An electronic nose based on solid state sensor arrays for low-cost indoor air quality monitoring applications*. Sensors and Actuators B, 102 (2004) 117-125.

¹⁴ P. Mielle. *'Electronic noses': Towards the objective instrumental characterization of food aroma*. Trends in Food Science & Technology, 7 (1996) 432-434.

- Control de calidad en el almacenaje de productos perecederos: frutas, lácteos, carnes, pescados, etc.
- Detección de adulteración: vinos, zumos, licores, aceites, café, etc.
- Catas automáticas de bebidas

Medicina y Salud¹⁵:

- Diagnóstico no invasivo: respiración, sudor, etc.
- Sabor de medicamentos¹⁶.

Seguridad¹⁷: Búsqueda drogas, explosivos, etc.

- Protección de la propiedad industrial¹⁸:
- Perfumería, refrescos, etc. (Huellas electrónicas).

2.2 ETAPAS DE LA LENGUA ELECTRÓNICA

Como se ha indicado en el punto anterior, un sistema de lengua electrónica está formado por un conjunto de bloques enlazados en forma de cadena, de tal forma que a partir de la información que captan los sensores se obtenga finalmente una clasificación de las muestras según las características que sean de interés.

Los bloques que la constituyen son los siguientes:

- Sensores de la lengua electrónica.
- Sistema de acondicionamiento de la señal.
- Sistema de adquisición de datos.
- Análisis multivariante de los datos.

¹⁵ P. Wang, Y. Tan, H. Xie, F. Shen. *Novel method for diabetes diagnosis based on electronic nose Biosensors and Bioelectronics*, 12 (1997) 1031-1036.

¹⁶ L. Zhu, R. A. Seburg, E. Tsai, S., J.C. Mifsud. *Flavor analysis in a pharmaceutical oral solution formulation using an electronic-nose*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34 (2004) 453-461.

¹⁷ A. Norman, F. Stam, A. Morrissey, M. Hirschfelder, D. Enderlein. *Packaging effects of a novel explosion-proof gas sensor*. *Sensors and Actuators B*, 95 (2003) 287-290.

¹⁸ J. Poprawski, P. Boilot, F. Tetelin. *Counterfeiting and quantification using an electronic nose in the perfumed cleaner industry*. *Sensors and Actuators B*, 116 (2006) 156-160.

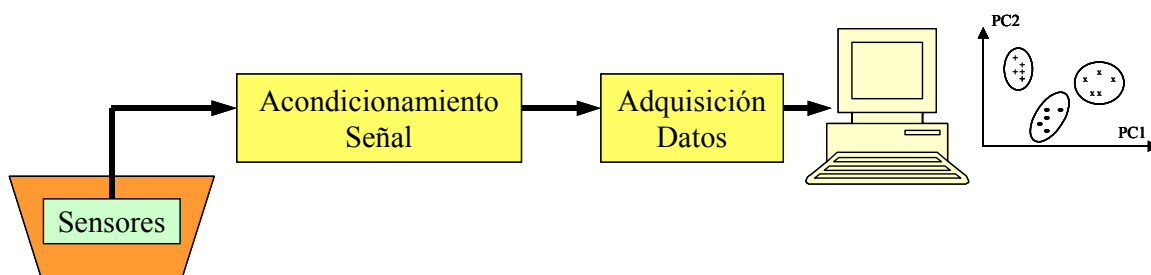


Figura 4. Esquema de bloques del sistema de Lengua Electrónica

2.2.1 Sensores de la Lengua Electrónica

Los **sensores** son dispositivos capaces de generar una señal proporcional al parámetro a medir o detectar. Cuando el dispositivo genera una señal eléctrica nos encontramos ante un **electrodo**. Si los sensores se agrupan en un conjunto de elementos se denominada **multielectrodo**. Si los sensores generan distintas señales útiles para poder caracterizar la muestra, se denomina **multisensor**. El multisensor es la parte inicial de una lengua electrónica. Los sensores suelen ser de carácter no específico y generalmente se procura que posean características de sensibilidad cruzada,¹⁹ es decir, que sean sensibles a alguna especie o parámetro químico pero con influencia de otros. Los sensores de las lengua electrónicas pueden estar contruidos específicamente para la aplicación o bien utilizar sensores convencionales para medidas de parámetros físicos o químicos pero aprovechando el efecto de las interferencias. Es decir, una circunstancia que en los sensores convencionales tienen un efecto negativo en el caso de las lenguas electrónicas posee un efecto positivo.

La señal eléctrica que se obtiene de un sensor electroquímico puede ser de distinto tipo, como: potencial eléctrico, corriente, resistencia, etc. En la mayoría de los sensores utilizados para lenguas electrónicas se aplican técnicas potenciométricas o voltamétricas. En el primer caso, el sensor genera un potencial eléctrico que depende de las características del medio a analizar, del sensor y de las circunstancias ambientales (temperatura, ruido eléctrico, etc.) y en el segundo se aplica a la muestra una tensión variable y se mide la corriente generada.

¹⁹ Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya. *Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions*. Sensors and Actuators B, 44 (1997) 532-537.

2.2.2 Sistema de Acondicionamiento de la Señal

Las señales eléctricas procedentes de los electrodos poseen valores y características que suelen precisar un tratamiento eléctrico para obtener una interpretación final. Por este motivo estas señales transitan por una etapa de acondicionamiento, formada por un sistema electrónico que obtiene a su salida una señal adecuada para ser aplicada a un sistema de adquisición de datos.

En las medidas potenciométricas, las señales eléctricas suelen tener valores muy bajos y es posible que su impedancia de salida sea elevada. Por este motivo suelen ser muy sensibles a las interferencias y ruidos eléctricos²⁰. Por eso, las etapas del sistema de acondicionamiento de la señal están formadas por una etapa amplificación de muy alta impedancia de entrada y una segunda etapa de filtros para rechazar las señales de ruido.

2.2.3 Sistema de Adquisición de Datos

Los sistemas de análisis y tratamiento de datos trabajan con señales digitales, por lo que debe existir una etapa de conversión analógica a digital con un número de bits adecuado para que la resolución sea la deseada. Este proceso suele realizarse en placa de adquisición de datos incluido en ordenador, que por medio de programas informáticos permiten la adquisición, monitorización y almacenamiento de las señales.

2.2.4 Análisis Multivariante de los Datos

Para obtener una adecuada clasificación de las muestras analizadas u otra conclusión de los resultados, es necesario aplicar métodos de análisis multivariante con los datos de las medidas. Los análisis se realizan con programas informáticos que realizan cálculos matemáticos complejos de reconocimiento de patrones.

3 OBJETIVOS

El Instituto de Química Molecular Aplicada (IQMA) de la Universidad Politécnica de Valencia ha desarrollado en los últimos años diversos electrodos potenciométricos

²⁰ E. Bakker E. Pretsch. *Potentiometric sensors for trace-level analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 24 (2005) 199-207.

que actúan como sensores de parámetros físicos y químicos en medios líquidos y son selectivos a determinadas sustancias presentes en ellos²¹. En todos estos desarrollos se ha procurado obtener dispositivos que sean los más precisos y específicos posibles para lograr la óptima medida del parámetro en cuestión. Uno de los principales problemas que se han tenido que solucionar con estos sensores son los relacionados con las interferencias sobre las medidas de los distintos parámetros entre sí y de los distintos elementos presentes en las muestras. En el caso de la presente tesis doctoral, el planteamiento de la investigación se realiza de forma totalmente distinta porque, en lugar de mitigar o eliminar los problemas de interferencias, se aprovechan de ellos y se buscan electrodos con una selectividad cruzada, para así conseguir un análisis cualitativo de muestras de naturaleza química compleja. En estas circunstancias nos encontramos ante un sistema de lengua electrónica.

A la hora de realizar un trabajo con lenguas electrónicas, uno de los planteamientos iniciales es elegir el tipo de sensor a utilizar. En la literatura sobre investigación con lenguas electrónicas se han presentado trabajos con distintos tipos de sensores. En caso de técnicas potenciométricas la mayoría utilizan sensores de naturaleza ion selectivo. Para técnicas voltamétricas también hay múltiples trabajos con electrodos metálicos, pero en cambio, apenas existen trabajos de lenguas electrónicas con electrodos metálicos utilizando técnicas potenciométricas.

El Instituto (IQMA) posee una línea de investigación dedicada al estudio y caracterización del comportamiento farádico de los metales y su aprovechamiento como sensores electroquímicos potenciométricos²². Para obtener sensores de estos materiales se puede recurrir a simples varillas de cada material de la forma más pura posible. De esta forma el proceso de fabricación del electrodo es rápido y sencillo y el comportamiento como sensor suele ser seguro, pero a cambio un sistema de electrodos formados por varillas puede tener un tamaño considerable y el sistema de conexión eléctrica más incomodo e inseguro.

²¹ M J. Seguí, J. Lizondo-Sabater, A. Benito, R. Martínez-Máñez, T. Pardo, F. Sancenón, J. Soto. *New ion-selective electrode for anionic surfactants*. *Talanta*, 71 (2007) 333-338.

²² J. Soto, R. H. Labrador, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, C. Coll, E. García-Breijo, L. Gil. *Introduction of a model for describing the redox potential in faradic electrodes*. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 594 (2006) 96-104.

El Grupo de Microelectrónica Híbrida, incorporado al mismo Instituto (IQMA), ha desarrollado sensores químicos a partir de pastas comerciales que se utilizan en la tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*). Estas pastas suelen tener características eléctricas conductoras o resistivas y poseen elementos químicos activos que se pueden aprovechar para medir diversos parámetros químicos. Así, los metales nobles como plata, oro y platino suelen generar un potencial eléctrico proporcional al potencial redox del medio en que se encuentran²³. Las pastas resistivas poseen RuO₂ que es sensible al pH²⁴, el carbono puede ser sensible al potencial redox y a la presencia de materia orgánica²⁵, etc. Con este tipo de pastas y con técnicas serigráficas se han presentado diversos trabajos de desarrollo de sensores de parámetros físicos y químicos con características de miniaturización, robustez, sencillez y economía, que son útiles para el fin propuesto pero que vienen afectados por interferencias de otros elementos y parámetros distintos al interesado²⁶.

Por otro lado, el grupo de investigación “Microsystems and Nanotechnologies for Chemical Analysis” (MINOS) del Departament d’Enginyeria Electrònica, Elèctrica i Automàtica de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona, han presentando desde hace una década múltiples sistemas de sensores de gases y narices electrónicas²⁷, destacando en el desarrollo de técnicas de reconocimiento de patrones y análisis de datos por medio de redes neuronales artificiales de distinto tipo²⁸. Los tipos de análisis que han utilizado también pueden ser aplicados a los resultados de las medidas con sensores metálicos potenciométricos obteniendo así un sistema de lengua electrónica.

²³ J. Lee, R. Myers, J. Am, P. Bhadri; F. Beyette Jr, W. Timmons, P. Bishop, I. Papautsky. *Potentiometric Microelectrode Sensors for In Situ. Environmental Monitoring*. IEEE Sensors 2004.

²⁴ J. A. Mihell, J. K. Atkinson. *Planar thick-film pH electrodes based on ruthenium dioxide hydrate*. Sensors and Actuators B, 48 (1998) 505-511.

²⁵ I. Poelsa, L. J. Nagelsa, G. Verreytb, H. J. Geise. *Potentiometric detection of organic acids in liquid chromatography using conducting oligomer electrodes*. Analytica Chimica Acta, 370, (1998) 105-113.

²⁶ R. Martínez-Mañez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Gadea. *A multisensor in thick-film technology for water quality control*. Sensors and Actuators A, 120 (2005) 589-595.

²⁷ J. Brezmes, B. Ferreras, E. Llobet, X. Vilanova and X. Correig. *Neural network based electronic nose for the classification of aromatic species*. Analytica Chimica Acta, 348 (1997) 503-509.

²⁸ J. Brezmes, N. Canyellas, E. Llobet, X. Vilanova, X. Correig. *Application of neural networks to the design and implementation of electronic olfaction systems*. 5th Seminar on Neural Application in Electrical Engineering NEUREL-2000.

Las aplicaciones iniciales del sistema de lengua electrónica propuesto son análisis de disoluciones acuosas, discriminando distintos tipos de aguas naturales o disoluciones preparadas. Estas aplicaciones se pueden extender a otros tipos de líquidos más complejos y con interés comercial como pueden ser el vino. Estos compuestos emanan vapores y gases que es interesante su detección por medios potenciométricos y trabajando a temperatura ambiente.

Una de las principales aplicaciones de las lenguas electrónicas es la determinación y control de la calidad de alimentos. Por este motivo se han realizado diversas experiencias en conjunción con el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Politécnica de Valencia. Distintos investigadores de este Departamento han desarrollado múltiples trabajos para determinar la frescura del pescado²⁹ y una de las nuevas líneas de investigación es la búsqueda de un sistema rápido, cómodo y cualitativo de la frescura del pescado y otros productos alimenticios.

La conjunción de estos tres grupos y sus respectivas líneas de investigación han servido para realizar esta tesis doctoral cuyos objetivos generales son los siguientes:

- Análisis de las distintas posibilidades de las lenguas electrónicas: sensores, técnicas de medida y análisis de datos.
- Construcción de sistemas de medida que permitan realizar las experiencias propuestas. Para lograr los sistemas de medida es necesario las siguientes etapas:
 - Estudiar, elegir y construir los sensores adecuados para un sistema de lengua electrónica.
 - Diseñar, construir, calibrar y aplicar sistemas de medidas electrónicos para acondicionar las señales eléctricas procedentes de electrodos potenciométricos.
 - Diseñar, programar, calibrar y aplicar sistemas informáticos para la adquisición de la señal, monitorización y almacenamiento de datos.

²⁹ J.M. Barat, L. Gallart-Jornet, A. Andrés, L. Akse, M. Carlehög, O.T Skjerdal. *Influence of cod freshness on the salting, drying and desalting stages*. Journal of Food Engineering, 73 (2006) 9-19.

- Utilizar las técnicas de reconocimiento de patrones, para procesar los datos a fin de obtener una discriminación de las muestras según criterios de interés, clasificación o correlación con otros parámetros.
- Aplicación del sistema de medida desarrollado para el análisis de medios acuosos. Discriminación de aguas naturales y disoluciones artificiales con iones de diferentes cationes y aniones.
- Aplicación del sistema de medida desarrollado para el análisis de alimentos:
 - Determinación del deterioro del pescado fresco almacenado en frío.
 - Determinación del deterioro de lomo de cerdo fresco almacenado en frío.
 - Discriminación de lomo curado con distintos tipos de sales.
- Desarrollo de un sistema de nariz electrónica húmeda. Aplicación del sistema de medida desarrollado para el análisis de vino. Determinación del deterioro de diferentes vinos en contacto con aire.

4 CONTENIDO

Para conseguir los objetivos propuestos se ha desarrollado un trabajo formado por 10 capítulos y 2 anexos cuyo contenido se expone brevemente a continuación:

Capítulo 1. Introducción a las lenguas electrónicas, características y aplicaciones.

Capítulo 2. En este capítulo se presenta los sensores que se suelen utilizar en los sistemas de lenguas electrónicas. Se revisa los tipos de sensores y sus fundamentos físicos con un especial énfasis en los sensores electroquímicos potenciométricos, que son el objetivo de esta tesis, indicando sus fundamentos y los principios de funcionamiento de los electrodos metálicos. También se realiza un repaso del estado del arte de los sensores con tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*).

Capítulo 3. Descripción de las distintas técnicas de análisis de los datos que permiten el reconocimiento de patrones que configuran la última etapa de las lenguas electrónicas.

Capítulo 4. Se realiza una revisión bibliográfica y la disertación sobre las principales líneas de investigación en las lenguas electrónicas, indicando los métodos,

técnicas, aplicaciones y resultados de los distintos grupos de investigación especializados en estas tareas. También se indican las perspectivas futuras.

Capítulo 5. En este capítulo se inicia la descripción experimental. Se comienza en medio acuoso, donde se aplican técnicas de reconocimiento de patrones para lograr la discriminación y la clasificación de las muestras.

Capítulo 6. Dedicado al estudio de la lengua electrónica para la caracterización de vinos. Se inicia con la discriminación de vinos comerciales. En la segunda parte se presenta como principal novedad la realización de un sistema que actúa como **nariz electrónica húmeda**, aplicándola de forma aislada y de forma conjunta con lengua electrónica para realizar una experiencia para determinar el deterioro del vino expuesto al aire durante mucho tiempo.

Capítulo 7. Las experiencias continúan con medios más complejos, como son los alimentos de origen animal. En este capítulo se realiza experiencias con pescado para lograr alguna técnica sencilla para determinar su grado de conservación. En principio se expone el proceso de deterioro del pescado fresco y los antecedentes de sistemas de lenguas electrónicas. Las experiencias se inician con disoluciones preparadas para seguir con con pescado real en distintas condiciones. Las experiencias de la lengua electrónica se complementan con medidas de carácter bioquímico para comparar sus resultados y lograr correlación entre ellos.

Capítulo 8. Experiencias con carne. El sistema de lenguas electrónica se extiende a otro tipo de alimento, lomo de cerdo. En primer lugar con carne fresca para determinar su deterioro con el paso del tiempo y posteriormente con carne curada con distintos tipos de sales.

Capítulo 9. En este capítulo se exponen las conclusiones de las experiencias, la discusión de los resultados y publicaciones derivadas de la investigación.

Capítulo 10. Se presentan las líneas futuras de investigación que se extraen de las experiencias realizadas.

Anexo I. Desarrolla las distintas etapas de la tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*), y se exponen los materiales, herramientas y equipos de esta tecnología que se han

utilizado para fabricar los sensores que han intervenido en las experiencias de esta tesis doctoral. También se muestran los resultados de un análisis microscópico y espectroscópico realizado a los electrodos de tecnología de capa gruesa utilizados en las experiencias.

Anexo II. En este anexo se exponen el sistema de medida que se ha desarrollado para realizar la parte experiencial de esta tesis doctoral. Este sistema esta compuesto por un lado por equipos electrónicos contruidos para realizar cada una de las experiencias y, por otro lado, por programas informáticos para la captura, visualización y almacenamiento de datos.

Existe poca literatura sobre el tema de lenguas electrónicas, y menos escritos en lengua castellana. Por este motivo, se ha aprovechado la escritura de la presente memoria para proporcionarle una visión enciclopédica, con capítulos extensos donde se abarca gran cantidad de contenidos.

Capítulo 2.

Sensores para Lenguas Electrónicas

Los sensores utilizados para el desarrollo de las lenguas electrónicas tienen la misma base que los sensores químicos convencionales, pero con la diferencia de que no se busca una especificidad hacia una especie química determinada, sino que se pretende una sensibilidad a múltiples especies de forma no específica. En este capítulo se realiza una revisión de los distintos tipos de sensores clasificados según el principio que determina su selectividad.

1 CLASIFICACION DE LOS SENSORES

Tradicionalmente, la clasificación de los sensores suele realizarse según los fundamentos o principios que determinan la selectividad del sensor. La clasificación más global distingue tres tipos principales de sensores: **físicos**, **químicos** y **biosensores**³⁰.

2 SENSORES FÍSICOS

El sensor físico detecta la modificación de una propiedad física, y generan una señal proporcional a dicha modificación. Por ejemplo un líquido se dilata y se contrae en función de la temperatura, un contacto bimetálico genera un potencial proporcional a T, un compuesto piezoeléctrico puede utilizarse para medir la presión, etc. En sistemas de lenguas electrónicas se utilizan fundamentalmente sensores **másicos** y **ópticos**.

³⁰ C. Jimenez, F. Muñoz, A. Bratov, C. Domínguez. *Lenguas electrónicas: sensores químicos aplicados a la medida del sabor y al control de calidad de alimentos*. CS2002 Tecnologías.

2.1 SENSORES MÁSICOS

Se denominan sensores másicos aquellos sistemas que aprovechan los efectos de la variación de la masa del dispositivo sobre alguna de sus propiedades físicas para generar una señal eléctrica. Entre ellos destacan: Ondas acústicas de superficie (*Surface Acoustic Wave*, SAW) y Microbalanzas de cristal de cuarzo (*Quartz crystal microbalance*, QCM).

2.1.1 Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM)

La microbalanza de cristal de cuarzo es un dispositivo que aprovecha las propiedades piezoeléctricas del cuarzo. Cuando el cuarzo se deforma mecánicamente se genera un potencial eléctrico a lo largo de su superficie y a su vez, cuando se aplica un potencial a través de las caras del cristal de cuarzo éste se deforma. Un cristal conectado a un circuito eléctrico apropiado oscila con una frecuencia que es proporcional a la masa y la forma del cristal. La frecuencia de oscilación es extraordinariamente constante, lo cual viene determinado porque la masa del cristal también es constante. Esta propiedad de algunos materiales cristalinos se conoce como efecto piezoeléctrico, y es el fundamento de la microbalanza de cuarzo (**Figura 5**)³¹.

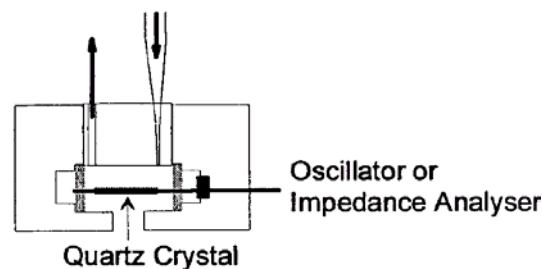


Figura 5 Sensor QCM

Si un cristal de cuarzo se recubre con un polímero que absorbe de manera selectiva ciertas moléculas, la masa del cristal aumenta cuando las moléculas están presentes, y por tanto disminuye la frecuencia de resonancia del cristal de cuarzo.

³¹ P. Hauptmann, R. Borngraeber, J. Schroeder. *Application of Novel Sensor Electronics for Quartz Resonators in Artificial Tongue*. 2000 IEEE/EIA International Frequency Control Symposium and Exhibition.

Cuando las moléculas se desorben de la superficie, el cristal recupera su frecuencia original. La relación entre el cambio en la masa del cristal Δm viene dado por

$$\Delta F = \frac{C \cdot F^2 \cdot \Delta m}{A}$$

donde m es la masa del cristal y A es el área de la superficie, F es la frecuencia de oscilación del cristal y C es una constante de proporcionalidad. La ecuación anterior indica que es posible medir cambios muy pequeños de la masa del cristal si se puede medir la frecuencia con mucha precisión. De aquí se deduce que es posible medir de forma bastante fácil cambios de frecuencia de una por cada 10^7 partes con una instrumentación estándar. El límite de detección de un sensor piezoeléctrico de este tipo es de alrededor de 1 pg. Los rangos de variación de la frecuencia suelen estar entre 5.000 MHz y 10.000 MHz

Estos sensores se han utilizado para detectar gran cantidad de analitos en fase gaseosa³² donde se mide la pequeña variación de masa de la superficie del sensor debido a la adherencia de moléculas gaseosas pero también en líquidos, pero también han encontrado aplicación como sensor de líquidos. En este caso se mide las variaciones de densidad, viscosidad y conductividad de los líquidos donde se sumergen los sensores.³³

Otras aplicaciones de los dispositivos QCM (**Figura 6**)³⁴ son como biosensores DNA, inmunosensores, etc.³⁵

³² P. Hauptman. *Resonant sensors and applications* Sensors and Actuators, A, 26 (1991) 371-377.

³³ T. Nomura. *Application of piezoelectric quartz crystals to chemical analysis in liquids (Review)*. Bunseki Kagaku 47 (1998) 751-767.

³⁴ International Crystal Manufacturing Company, Inc. (ICM).

³⁵ C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault. *Commercial quartz crystal microbalances – theory and applications. Review*. Biosensors & Bioelectronics 14 (1999) 663–670.

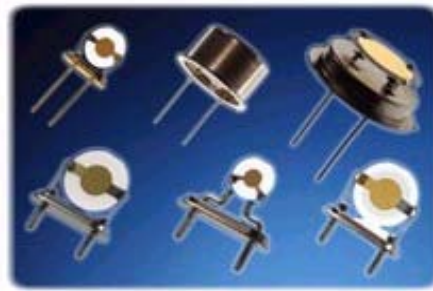


Figura 6. Dispositivos QCM

2.1.2 Onda Acústica de Superficie (SAW)

Los resonadores de ondas acústicas de superficie son el equivalente resonador del cristal de cuarzo pero en superficie³⁶. Los microsensores acústicos se utilizan para detectar propiedades de los líquidos y gases relacionadas con parámetros físicos como la densidad y viscosidad. La interacción de un analito químico con la superficie del sensor produce un cambio de las características de propagación de la onda. Los sensores de onda acústica de superficie (SAW) de ondas Reyleigh son los dispositivos más utilizados para sensores de gas³⁷, mientras que las de tipo SH (*Shear Horizontal*) son la alternativa más clara para elementos líquidos³⁸. En este caso, el desplazamiento de las partículas es paralelo a la superficie y perpendicular a la dirección de propagación de la onda.

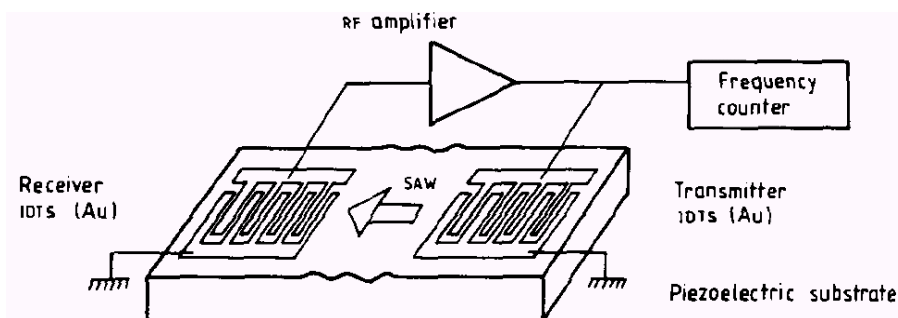


Figura 7. Dispositivo SAW cubierto de lípido

³⁶ D.T Bell Jr., R.C.M Li. *Surface acoustic wave resonators*. Proceedings of the IEEE, 64 (1976) 711-721.

³⁷ T. Bristol. *Acoustic Surface-Wave-Device Applications*. Microwave Journal 17 (1974) 25-27.

³⁸ D. S. Ballantine, R.M. White, S.J. Martin, A.J. Ricco, E.T. Zellers, G.C. Frye, H. Wohltjen. *Acoustic wave sensors theory, design and physico-chemical applications*. Academic Press (1997).

Las aplicaciones de los SAW como sensores han tenido acogida en los dispositivos para la medida a distancia (sin cables) de parámetros físicos y químicos³⁹. También se han utilizado para crear sistemas específicos para la detección de los sabores básicos⁴⁰.

2.2 SENSORES OPTICOS

Los sensores ópticos engloban a todos aquellos que se basan en los efectos de la **emisión** y **absorción** de una radiación electromagnética. Un caso particular de radiación magnética es la luz visible por el ojo humano (700 nm rojo a 420 nm violeta), pero existen radiaciones de frecuencias inferiores (infrarrojo, microondas y radiofrecuencia) y de frecuencias superiores (ultravioleta, rayos X y rayos gamma). La información que se extrae de la radiación electromagnética con objeto de cuantificar determinados parámetros se suele realizar midiendo su intensidad (flujo de energía por unidad de área en unidad de tiempo), índice de refracción, variaciones de la dirección de la luz, difracción, polarización, etc. Los métodos ópticos ofrecen las ventajas de no ser métodos destructivos, gran reproducibilidad y estabilidad en el tiempo, aunque precisan de instrumental y métodos más complejos.

Los métodos más utilizados en los sensores ópticos son:⁴¹ absorbancia, reflectancia y luminiscencia. Más recientemente, fibra óptica y Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR).

2.2.1 Espectrometría

La medida de la emisión y la absorción de la luz por parte de las sustancias se denomina **espectrometría** y se realiza con un espectrómetro. Un **espectrómetro** óptico o espectroscopio, es un instrumento que sirve para medir las propiedades de la luz en una determinada porción del espectro electromagnético. La variable que se mide generalmente es la intensidad de la luz pero se puede medir también el estado de

³⁹ R. Weigel, D. Morgan, J. Owens, A. Ballato, K. Lakin, K. Hashimoto, C. Ruppel, *Microwave Acoustic Materials, Devices, and Applications*. IEEE Transactions on Microwave Theory And Techniques, 50 (2002) 738- 749.

⁴⁰ I.I. Leonte, G. Sehra, M. Cole, P. Heskethb, J.W. Gardner. *Taste sensors utilizing high-frequency SH-SAW devices*. Sensors and Actuators B, 118 (2006) 349-355.

⁴¹ A. K. Deisingh, D. C. Stone, M. Thompson. *Applications of electronic noses and tongues in food analysis*. International Journal of Food Science and Technology, 39 (2004) 587-604.

polarización, por ejemplo. Los espectrómetros conocidos con el nombre de espectroscopios se utilizan en el análisis espectroscópico para identificar materiales

Las técnicas de análisis multivariante de datos propias de las lenguas y narices electrónicas también se extienden a sistemas de medidas con sensores de naturaleza óptica, como los basados en una matriz de sensores de ultravioleta y fluorescencia⁴² para la detección de múltiples analitos⁴³.

Otros desarrollos de nariz electrónica están formados por una matriz de sensores ópticos que contienen compuestos fluorescentes que generan una respuesta ante una exposición de vapores orgánicos⁴⁴.

El espectrómetro de radiación infrarrojos FTIR (*Fourier transform Infrared*) también ha tenido distintas aplicaciones en el análisis y discriminación de vinos⁴⁵ o como sensor de polifenoles (taninos)⁴⁶ o como nariz electrónica para detección de incendios⁴⁷.

2.2.2 Luminiscencia

La luminiscencia es una técnica óptica que se basa en la medida de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que previamente han absorbido energía radiante característica u otro tipo de energía. La estructura del sensor está formada por un emisor de luz, como un diodo LED y un receptor como fotodiodo o fototransistor.

⁴² J.J. Lavigne, S. Savoy, M. Clevenger, J. Ritchie, B. McDaniel, S. You, E. Anslyn, D. Neukirk. *Solution-Based Analysis of Multiple Analytes by a Sensor Array: Toward the Development of an 'Electronic Tongue'* J. Am. Chem. Soc., 120 (1998) 6429-6430.

⁴³ A. Goodey, J. J. Lavigne, S. M. Savoy, M. D. Rodriguez, T. Curey, A. Tsao, G. Simmons, J. Wright, S. J. Yoo, Y. Sohn, E.V. Anslyn, J. B. Shear, D. P. Neikirk, J. T. McDevitt, "Development of Multianalyte Sensor Arrays of Chemically Derivatized Polymeric Microspheres Localized in Micromachined Cavities" J. Am. Chem. Soc, 123 (2001) 2559-2570.

⁴⁴ D. R. Walta, T. Dickinsona, J. Whiteb, J. Kauerb, S. Johnsonc, H. Engelhardt, J. Sutterc, P. Jursc. *Optical sensor arrays for odor recognition*. Biosensors and Bioelectronics, 13 (1998) 697-699.

⁴⁵ A. Edelmann, J. Diewok, K. C. Schuster, B. Lendl. *A Rapid Method for Discrimination of Red Wine Cultivars Based on Mid-Infrared Spectroscopy of Phenolic Wine Extracts*. J. Agric. Food Chem., 49 (2001) 1139-1145.

⁴⁶ A. Edelmann and B. Lendl. *Towards the Optical Tongue: Flow-through Sensing of Tannin-Protein Interactions based on FTIR-Spectroscopy*. J. Am. Chem. Soc., 124 (2002) 14741-14744.

⁴⁷ E. Scorsone, A. M. Pisanelli, K. C. Persaud. *Development of an electronic nose for fire detection*. Sensors and Actuators B, 116 (2006) 55-61.

Este tipo de dispositivo es simple de construir y utilizar, y se puede combinar con otros tipos de sensores. De esta forma, se han construidos diversos sistemas de lenguas y narices electrónicas con un tercer elemento que actúa como *ojo electrónico* para obtener una fusión de los tres sentidos (vista, olfato y gusto) para el análisis de diversas bebidas, fundamentalmente vino⁴⁸. Con dispositivos ópticos más complejos tienen un amplio uso en sistemas de robótica para la visión artificial⁴⁹.

2.2.3 Resonancia por Plasmón en Superficie (SPR)

La Resonancia de Plasmón de Superficie (*Surface Plasmon Resonance - SPR*) es un sensor basado en la excitación de plasmones (un **plasmón** es una cuasi-partícula resultante de la excitación colectiva de los electrones de un metal, de manera que se crean oscilaciones cuantificadas)⁵⁰. Con este tipo de dispositivos se están desarrollando biosensores para la detección de analitos⁵¹. Aplicado a diversos campos, entre ellos el control de calidad del vino⁵².

3 SENSORES QUÍMICOS

El sensor químico es una molécula sintetizada capaz de reconocer un sustrato, cuya selectividad está basada en interacciones químicas entre el sustrato y una parte de la molécula denominada centro receptor, y que es capaz de generar una señal que pone de manifiesto esa interacción⁵³. Por ejemplo los indicadores colorimétricos, los I.S.E., etc.

⁴⁸ M.L. Rodríguez-Mendez, A. Arrieta, V. Parra, A. Bernal, A. Vegas, S. Villanueva, R. Gutiérrez-Osuna, J. A. de Saja. *Fusion of Three Sensory Modalities for the Multimodal Characterization of Red Wine*. IEEE Sensors Journal, 4, nº 3 (2004) 348-354.

⁴⁹ N. Franceschini. *Visual guidance based on optic flow: a biorobotic approach*. Journal of Physiology-Paris, 98 (2004) 281-292.

⁵⁰ J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz. *Surface plasmon resonance sensors: review*. Sensors and Actuators B, 54 (1999) 3-15.

⁵¹ J. Homola, H. Vaisocherová, J. Dostálek, M. Piliarik. *Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing*. Methods, 37 (2005) 26-36.

⁵² M. Manuel, B. Vidal, R. López, S. Alegret, J. Alonso-Chamarro, I. Garces. J. Mateo. *Determination of probable alcohol yield in musts by means of an SPR optical sensor*. Sensors and Actuators B, 11, (1993) 455-459

⁵³ J. Janata, M. Josowicz. *Chemical Sensors*. Anal Chem, 70 (1998) 179-208.

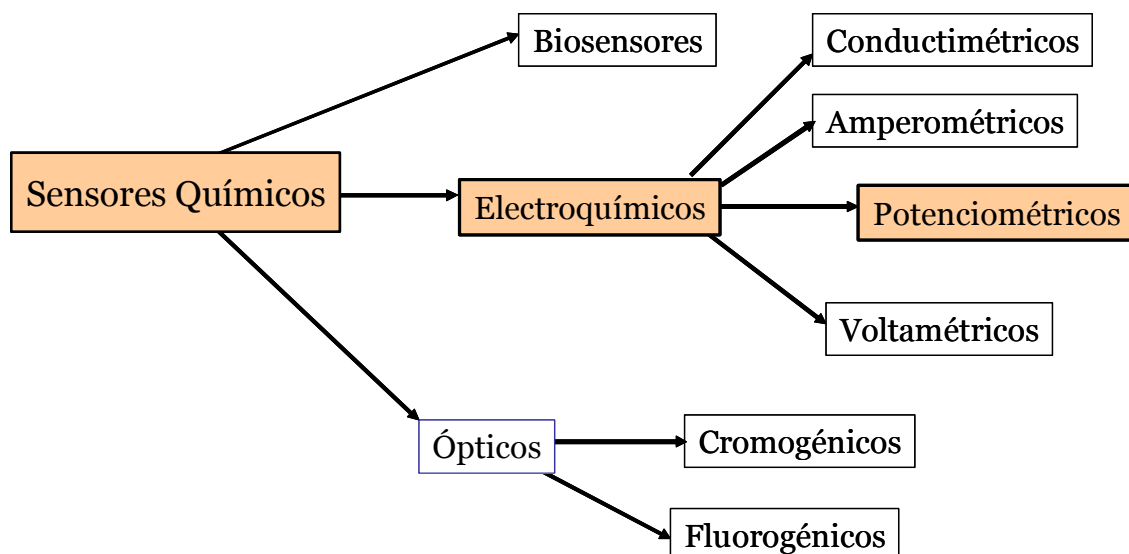


Figura 8. Clasificación de los Sensores Químicos

3.1 SENSORES QUÍMICOS ÓPTICOS

Los sensores ópticos se pueden clasificar en dos grandes grupos, según el método de análisis: los **Cromogénicos** cuyo color cambia al interaccionar con la molécula o ión adecuados⁵⁴ (Ej. La fenolftaleina con los H^+ , el negro de eriocromo con el Ca^{+2}) y los **Fluorogénicos** cuyas propiedades de fluorescencia se modifican con la coordinación. (Ej. Cambio de la fluorescencia en función del pH). Las técnicas basadas en medida de fluorescencia se caracterizan por su elevada sensibilidad, lo que las hace útiles para determinación de trazas⁵⁵.

⁵⁴ J. V. Ros-Lis, R. Martínez-Máñez, A. Benito, J. Soto. *Naphthoquinone derivatives as receptors for the chromogenic sensing of metal cations and anions*. Polyhedron, 25 (2006) 1585-1591.

⁵⁵ F. Sancenón, A. B. Descalzo, J. M. Lloris, R. Martínez-Máñez, T. Pardo, M. J. Seguí, J. Soto. *Open-chain polyazaalkanes functionalised with pyrene groups as sensing fluorogenic receptors for metal ions*. Polyhedron, 21 (2002) 1397-1404.

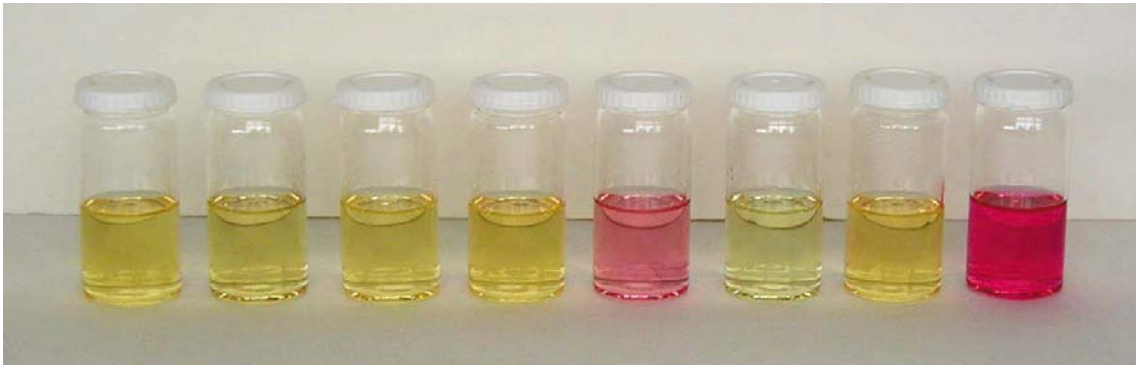


Figura 9. Sensores cromogénicos. Cambio de color de una sustancia (pirilio) tras añadir distintos aniones de disolución acuosa tamponada. De izquierda a derecha: sin anión, bromuro, cloruro, fosfato, GMP, ADP y ATP.

La **fluorescencia** es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Las radiaciones absorbidas (invisibles al ojo humano) son transformadas en luz visible, o sea, de una longitud de onda mayor a la incidente. En este proceso, una molécula absorbe un fotón de alta energía, el cual es emitido como un fotón de baja energía (mayor longitud de onda). La diferencia de energía entre la absorción y la emisión, es disipada como calor (vibraciones moleculares). Todo el proceso es muy corto (millonésimas de segundo) y este tiempo es la principal diferencia con otro conocido fenómeno luminoso, la **fosforescencia**.

3.1.1 Biosensores

La molécula o macromolécula sensora es de naturaleza biológica, sobre la que ocasionalmente se ha operado introduciendo una modificación o varias que posibilita su uso como sensor, como por ejemplo fijándola sobre un substrato, anclándole un centro fluorescente, etc. Ejemplos: enzimas inmovilizadas, anticuerpos, etc. Los biosensores se tienen amplia aplicación en la química analítica, clínica, agricultura, etc. Recientemente también se utiliza como sensor no específico y aplican técnicas de reconocimiento de patrones⁵⁶.

⁵⁶ A. Gutiérrez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle. *Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis* Biosensors and Bioelectronics, (2006) Artículo en Prensa

3.2 SENSORES ELECTROQUÍMICOS

Son sensores que aprovechan los efectos eléctricos de los procesos químicos. Entre los sensores **electroquímicos** se encuentran:

- Potenciométricos.
- Amperométricos.
- Voltamétricos.
- Conductímetros.

Como este tipo de sensores es el más utilizado en las lenguas electrónicas se van a describir con mayor amplitud sus fundamentos y características. La base de partidas de los sensores electroquímicos son las celdas electroquímicas.

4 FUNDAMENTOS DE LOS SENSORES ELECTROQUÍMICOS

Los sensores que se han utilizado en las investigaciones de esta tesis doctoral son de naturaleza electroquímicas, por este motivo se describen, en los siguientes puntos de este capítulo, los fundamentos de este tipo sensores, así como los tipos en que se clasifican.

4.1 CELDAS ELECTROQUÍMICAS

El elemento básico de los métodos electroquímicos es la celda electroquímica, que está formada dos conductores eléctricos llamados **electrodos**, cada uno sumergido en una disolución adecuada de electrolito. El ejemplo de celda más sencilla es la denominada pila *Daniell*, que está formada por un electrodo de cinc sumergido en una disolución de sulfato de cinc (ZnSO_4) y un electrodo de cobre en una disolución de sulfato de cobre (CuSO_4), y que se representa en la **Figura 10**. Las dos disoluciones están unidas por un puente salino que consiste en un tubo relleno con una disolución saturada de cloruro de potasio (KCl). Los dos extremos del tubo están equipados con tapones porosos que permiten el movimiento de iones a su través pero que evita el paso de líquido desde una disolución de electrolito a la otra. La función del puente es aislar los contenidos de las dos mitades de la celda pero manteniendo el contacto eléctrico entre ellas. El aislamiento es necesario para evitar la reacción directa entre los iones cobre y el electrodo de cinc.

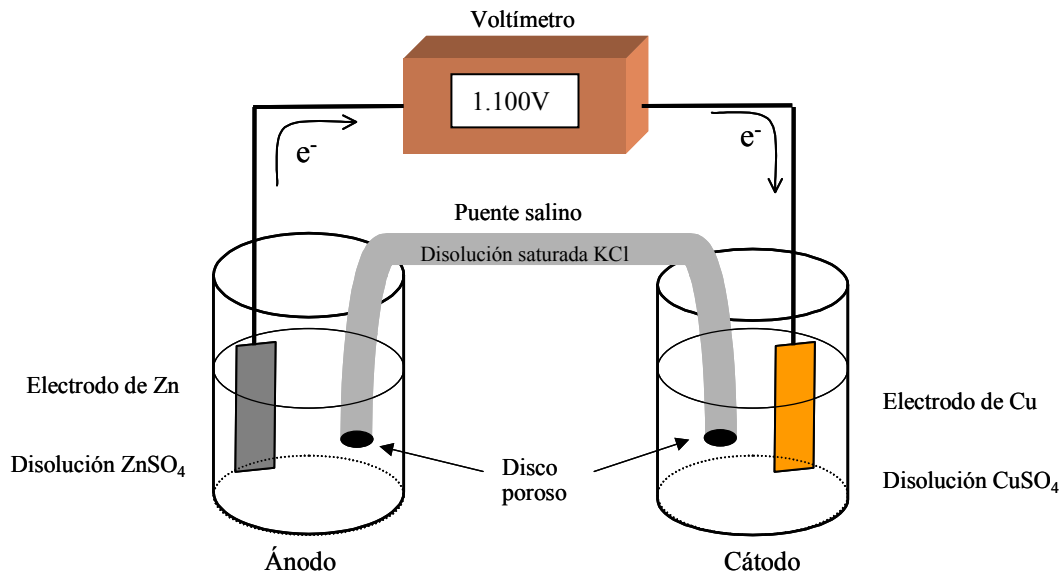


Figura 10. Celda electroquímica con puente salino. Pila Daniell

4.1.1 Conducción en una Celda

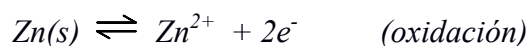
La carga es conducida en una celda electroquímica por tres procesos diferentes en las distintas partes de la celda:

a) En los electrodos de cobre y cinc, así como en el conductor externo, los **electrones** sirven de portadores, moviéndose desde el cinc, a través del conductor hasta el cobre.

b) En las disoluciones el flujo de electricidad implica la migración tanto de **cationes** como de **aniones**. En la semicelda de la izquierda, los iones cinc migran alejándose del electrodo, mientras que los iones sulfatos e hidrógeno sulfato se mueven hacia él; en el otro compartimento, los iones cobre se mueven hacia el electrodo y los aniones se alejan de él.

c) Dentro del puente salino, la electricidad es transportada por migración de los iones potasio hacia la derecha y de los iones cloruro hacia la izquierda. Por tanto todos los iones, en las tres disoluciones, participan en el flujo de electricidad. Este conjunto de proceso de transporte de carga formado por electrones e iones se conoce como **transporte óhmico de corriente**.

En las superficies de los dos electrodos tiene lugar un tercer proceso, un proceso de oxido-reducción (**redox**). En este caso, una reacción de **oxidación** o una de **reducción** proporcionan un mecanismo mediante el cual la conducción iónica de la disolución se acopla con la conducción electrónica del electrodo para proporcionar un circuito completo para el flujo de cargas. Los dos procesos redox se describen mediante las ecuaciones:



4.1.2 Estructura de la Disolución: la Doble Capa

Las medidas electroquímicas se realizan en sistemas heterogéneos donde un electrodo sólo puede dar o aceptar electrones de una especie que esté inmediatamente adyacente al mismo. En la superficie de los metales suele existir un exceso de carga negativa y como consecuencia de ello, cuando se introduce un metal en el seno de una disolución, los iones de la misma se organizan en las proximidades de la superficie, de modo que se forma dos capas, una más interna, en contacto con la superficie del metal, llamada **capa rígida** de Helmholtz, y otra **capa difusa** de Gouy-Chapmann. La capa rígida, a su vez, se divide en dos planos, uno más interno (plano interno de Helmholtz) en contacto íntimo con el electrodo y en donde los iones son quimisorbidos, es decir atraído por fuerzas de naturaleza química) y su segunda plano rígido (plano externo de Helmholtz) donde los iones son fisisorbidos (fuerzas de naturaleza física).

4.1.3 Corrientes Faradaicas y no Faradaicas

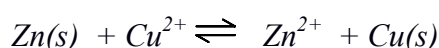
Dos tipos de procesos pueden dar lugar a corrientes eléctricas a través de una interfase electrodo/disolución. Uno de ellos implica una transferencia directa de electrones por medio de una reacción de oxidación en un electrodo y de una reacción de reducción en el otro. A los procesos de este tipo se les llama **procesos faradaicos** porque están gobernados por la ley de Faraday, que establece que la extensión de una reacción química en un electrodo es proporcional a la intensidad de corriente; las corrientes resultantes son llamadas corrientes faradaicas.

En ciertas condiciones las celdas presentan un intervalo de potenciales donde los procesos faradaicos están excluidos en uno o en ambos electrodos por razones termodinámica o cinéticas. En estos casos, todavía puede tener lugar la conducción de corriente alterna. Cada superficie del electrodo se comporta como una placa de un condensador, cuya capacidad puede ser elevada. La corriente capacitada aumenta con la frecuencia y con el área del electrodo; controlando estas variables, es posible establecer condiciones en la que esencialmente toda la corriente alterna en una celda se transporta a través de la interfase de electrodo formando un proceso **no farádico** u óhmico.

Para establecer la diferencia básica entre una corriente faradaica y no faradaica se puede considerar a un electrón viajando a través del circuito externo hacia la superficie del electrodo. Cuando el electrón alcanza la interfase puede hacer sólo una de dos cosas. Puede permanecer en la superficie del electrodo y aumentar la carga de la doble capa, lo que constituye una corriente faradaica, o puede abandonar la superficie del electrodo y transferirse a una especie en la disolución convirtiéndose de este modo en parte de una corriente no faradaica, que requiere la continua transferencia de masa de especies reactivas desde el seno de la disolución hasta la superficie del electrodo.

4.1.4 Celdas Galvánicas y Electrolíticas

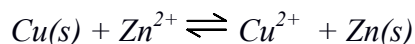
La reacción que tiene lugar en la celda mostrada en la **Figura 10** es la suma de dos reacciones que tienen lugar. La suma es:



El potencial que se desarrolla en esta celda es una medida de la tendencia de esta reacción a evolucionar hacia el equilibrio. Así, como se muestra en la **Figura 10**, cuando las actividades del cobre y del cinc son 0,01 M, se desarrolla un potencial de 1,100 V, que indica que la reacción está lejos del equilibrio. A medida que tiene lugar la reacción, el potencial se hace cada vez más pequeño, alcanzando finalmente 0,000 V cuando el sistema llega al equilibrio.

Las celdas como la descrita, que funcionan de manera que producen energía eléctrica se llaman **celdas galvánicas**. Y por el contrario, las **celdas electrolíticas** consumen energía. Por ejemplo, la celda considerada podría convertirse en electrolítica conectando el terminal negativo de una fuente de alimentación de corriente continua al

electrodo de cinc y el terminal positivo al electrodo de cobre. Si la salida de esta fuente se hace algo mayor de 1,1 V, las dos reacciones de electrodo se invertirán y la reacción y la reacción neta en la celda es:



Una celda en la que invirtiendo la dirección de la corriente se invierten las reacciones en los electrodos se llama **celda químicamente reversible**.

4.2 TERMODINÁMICA QUÍMICA

La termodinámica estudia los cambios o transformaciones de la energía que acompaña a los cambios físicos y químicos de la materia. Aplicada a la química, la termodinámica abre caminos para predecir si un cambio químico puede suceder bajo todo un conjunto de condiciones dadas, es decir, si es **espontánea** o no en esas condiciones.

La totalidad de medio de cualquier sistema puede considerarse como el universo. Rudolf Clausius (1822-1888) resumió la primera y segunda ley de la termodinámica como sigue:

- Primera ley: La energía del universo es constante.
- Segunda ley: La entropía del universo aumenta constantemente.

4.2.1 Energía Libre de Gibbs

La segunda ley de la termodinámica es a menudo difícil de aplicar directamente cuando se intenta determinar si un proceso es espontáneo o no. El problema es que la espontaneidad depende del cambio total de entropía, el del sistema y el de su medio, y no solamente del sistema, y a menudo no es práctico estimar los cambios entrópicos del medio, especialmente si este se identifica con el universo. Sin embargo, hay una manera de enfocar el problema aunque implique una restricción de cambios y es tener en cuenta sólo los que ocurren a temperatura y presión constante.

Mediante la función G , llamada energía libre de Gibbs, que depende solo de la condiciones de trabajo del sistema, es posible resumir las condiciones para la espontaneidad y el equilibrio a temperaturas y presión constantes en términos de ΔG .

- $\Delta G > 0$ La reacción no es espontánea. La reacción es espontánea en la dirección opuesta.
- $\Delta G < 0$ La reacción es espontánea en la dirección directa.
- $\Delta G = 0$ El sistema está en equilibrio. No hay cambio neto.

El cambio de energía libre de una reacción en fase gaseosa viene dado por:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + R \cdot T \ln Q \quad (\text{ec. 2-1})$$

donde ΔG° es la energía libre estándar del gas, R la constante de los gases ideales, T temperatura absoluta y Q es la acción de masas.

4.2.2 Energía Libre y Voltaje de una Pila

Es fácil demostrar que la disminución de la energía libre de un proceso que se desarrolla a temperatura y presión constante es igual a la máxima cantidad de trabajo teórico, diferente de la expansión, que puede realizar el proceso. En el caso de una reacción que se lleve a cabo en una pila galvánica, el máximo trabajo eléctrico $w_{\max, \text{elect}}$ que puede desarrollarse, es igual al voltaje E producido por la pila, multiplicando por la cantidad de carga eléctrica q que pasa por medio del circuito externo hacia el aparato que va a producir el trabajo. En otras palabras:

$$\Delta G = W_{\max \text{elect}} = -E \cdot q = -q \cdot V_{AB} = -q \cdot \Delta E = -n \cdot F \cdot \Delta E \quad (\text{ec. 2-2})$$

donde:

- n es el número de moles de electrones.
- ΔE es la diferencia de potencial en voltios.
- F es la constante de Faraday y corresponde con el número de coulombs por mol de electrones, $9,65 \times 10^4$ culombios.

Esta ecuación es el importante puente entre el cambio de energía libre de la termodinámica y el voltaje de una pila de la electroquímica. Pone de manifiesto el hecho de que cualquiera de las dos cantidades puede usarse para predecir la espontaneidad de una reacción redox. En el caso particular en que los reaccionantes y productos se encuentran en sus estados estándar, la reacción se transforma en:

$$\Delta G^{\circ} = -n \cdot F \cdot E^{\circ} \quad (\text{ec. 2-3})$$

El siguiente cuadro resume las relaciones entre el signo algebraico de ΔG , el de E y la espontaneidad de las reacciones redox

<i>Reacción</i>	ΔG	E
Espontánea	-	+
Equilibrio	0	0
No espontánea	+	-

4.3 ECUACIÓN DE NERNST

La dependencia del voltaje de una pila de la concentración se puede describir cualitativamente. En la ecuación (2-1) se indica que el cambio de energía libre, ΔG , de una reacción y el cambio estándar de la misma, ΔG° , están relacionados por:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + R \cdot T \ln Q$$

Sustituyendo ΔG y ΔG° de las ecuaciones (2-2) y (2-3) respectivamente, para una reacción redox se obtiene:

$$-nFE = -nFE^{\circ} + R \cdot T \ln Q$$

$$E = E^{\circ} - \frac{R \cdot T}{nF} \ln Q$$

Esta ecuación se denominó de Nernst, en honor del científico alemán Walther Nernst, quien la desarrollara en 1889. Se puede simplificar a 25°C sustituyendo

- $R=8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$
- $T=298,15 \text{ K}$
- $F=96,487 \text{ C mol}^{-1}$
- $\ln=2,303\log$

De modo que a 25°C

$$E = E^{\circ} - \frac{0,05916}{n} \lg Q$$

Con la ecuación de Nernst se puede calcular el voltaje producido por cualquier pila, conociendo los valores de E° de sus electrodos y las concentraciones apropiadas.

De la ecuación de Nernst se deduce que efectuando mediciones de potencial respecto a un electrodo de referencia puede conocerse la actividad del ión en cuestión. La aplicación más conocida de las potenciometrías directas es la utilización de lo que se conoce como **Electrodos Selectivos de Iones (ISE)**.

4.3.1 Ecuación de Nicolsky-Eisenman

Las investigaciones del comportamiento del electrodo de membrana en mezclas de cationes monovalentes o cationes de diferente valencia y los estudios realizados con membranas líquidas permitieron formular una ecuación general que describe el potencial de un electrodo de ion-selectivo.

Esta ecuación se conoce con el nombre de Nicolsky⁵⁷-Eisenman⁵⁸ e introduce el factor de coeficiente de selectividad potenciométrica K_{IJ} como un factor que permite cuantificar la contribución de un ion interferente (J) a la fuerza electromotriz del ion primario (I) y estimar el cambio en la sensibilidad por el ion interferente. Son precisamente estos coeficientes de selectividad los que son usados para expresar el grado de selectividad de un electrodo de un ion primario I frente a un determinado interferente J .

⁵⁷ B. P. Nicolsky, *J. Phys. Chem. (USSR)*, 10, (1937) 495.

⁵⁸ G. Eisenman, D.C. Rudin, J.H. Casby, *Science*, 126, (1957) 831.

Cuando existe la presencia simultanea del ion primario y un ion interferente J la ecuación de Nernst se modifica de la siguiente manera:

$$E_{IJ} = E_1^o + \frac{R \cdot T}{n_1 \cdot F} \cdot \ln(a_1 + K_{I,J}^{POT} \cdot a_j^{z_I/z_J})$$

en donde:

- a_I y a_J actividad del ion I y J respectivamente.
- z_I y z_J son las cargas de los iones I y J respectivamente.
- $K_{I,J}^{POT}$ es el coeficiente de selectividad de Nicolsky-Eisenman.

4.4 TIPOS DE MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS

Se han propuesto una amplia variedad de métodos analíticos. Estos métodos se dividen en métodos interfaciales y métodos en el seno de la disolución, siendo los primeros lo que tienen mayor aplicación. Los métodos **interfaciales** se basan en fenómenos que tienen lugar en la interfase entre las superficies de los electrodos y la capa delgada de disolución justamente adyacente a estas superficies. Por el contrario, los métodos del **seno de la disolución** se basan en fenómenos que ocurren en la disolución; haciendo todos los esfuerzos para impedir los efectos interfaciales.

Los métodos interfaciales se pueden dividir en dos grandes categorías, **estáticos** y **dinámicos**, en función de como operan las celdas electroquímicas, en ausencia o en presencia de corriente. Los métodos estáticos, que implican medidas potenciométricas son de particular importancia debido a su rapidez y selectividad.

Los métodos interfaciales dinámicos, en los que las corrientes en las celdas electroquímicas juegan un papel clave, son de diverso tipo. En unos se controla el potencial de la celda mientras se mide otras variables. Generalmente, estos métodos son sensibles y tienen intervalos dinámicos relativamente amplios (normalmente de 10^{-8} a 10^{-9} M). Además, muchos de estos procedimientos pueden llevarse a cabo con volúmenes de muestra de microlitros o incluso nanolitros. En los métodos dinámicos a intensidad constante, la intensidad de corriente en la celda se mantiene constante mientras se recogen los datos.

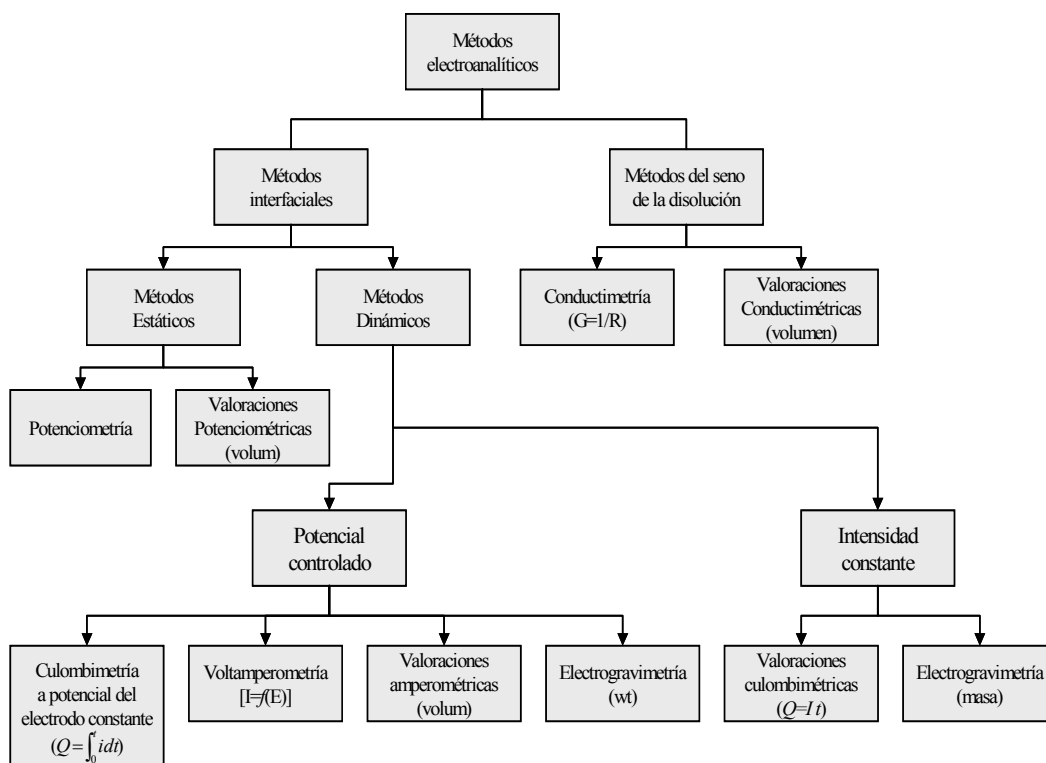


Figura 11. Resumen de los métodos electroanalíticos comunes

5 TÉCNICAS POTENCIOMÉTRICAS

El método potenciométrico de análisis es la medida de un potencial con el fin de conocer la actividad (concentración) de una sustancia en disolución. El objetivo de una medición potenciométrica es obtener información acerca de una composición de una disolución mediante el potencial que aparece entre dos electrodos. La medición del potencial se determina bajo condiciones reversibles termodinámicamente, y esto implica que debe dejar pasar el tiempo suficiente para llegar al equilibrio, extrayendo la mínima cantidad de intensidad eléctrica, para no influir sobre el equilibrio que se establece entre la membrana y la disolución muestra. La relación entre la concentración de una especie química y el potencial generado viene determinada por la ecuación de Nernst.

Desde comienzos del siglo XX las técnicas potenciométricas se han utilizado para la detección de los puntos finales en los métodos volumétricos de análisis. De origen más reciente son los métodos en los que las concentraciones de los iones se obtienen directamente del potencial de un electrodo de membrana selectiva de iones. Tales electrodos están relativamente libres de interferencias y proporcionan un medio rápido y

conveniente para estimaciones cuantitativas de numerosos aniones y cationes importantes⁵⁹.

5.1 TIPOS DE ELECTRODOS

El equipo requerido para los métodos potenciométricos es sencillo y económico e incluye un **electrodo de referencia**, un **electrodo indicador** y un dispositivo para la medida del potencial.

5.1.1 Electrodo de Referencia

Los electrodos de referencia son aquellos que miden el mismo potencial cualquiera que sea la naturaleza de la disolución en que se introduzcan y por tanto dan una referencia del electrodo indicador. Están constituidos por un conductor metálico en contacto con una sal poco soluble de su metal, y una disolución de composición constante y alta concentración llamado electrolito de referencia.

Las características ideales para este tipo de electrodos son:

- Reversibles y obedecen a la ecuación de Nernst.
- Presenta un potencial que es constante con el tiempo.
- Retorna a su potencial original después de haber estado sometido a corrientes pequeñas.
- Presenta poca histéresis con ciclos de temperatura.

Los electrodos de referencia más utilizados son: electrodo de calomelanos y electrodo de Ag/AgCl.

5.1.1.1 Electrodo de Calomelanos

El electrodo de calomelanos se compone de mercurio en contacto con una disolución saturada de cloruro mercurioso (calomelanos) que contiene también una concentración conocida de KCl. El potencial del electrodo saturado es 0,241 V a 25°C respecto al electrodo estándar de hidrógeno.

⁵⁹ E. P. Serjeant. *Potentiometry and Potentiometric Titrations*. New York: Wiley, 1984

La reacción del electrodo es: $\text{Hg}_2\text{Cl}_2(\text{s}) + 2\text{e}^- \rightleftharpoons 2\text{Hg}(\text{l}) + 2\text{Cl}^-$

5.1.1.2 Electrodo de Ag/AgCl

Es un electrodo formado por un hilo de Ag introducido en una disolución de KCl en contacto con un precipitado de AgCl. El potencial del electrodo saturado es 0,197V a 25°C respecto al electrodo estándar de hidrógeno.

La semirreacción del electrodo es: $\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^- \rightleftharpoons \text{Ag}(\text{s}) + \text{Cl}^-$

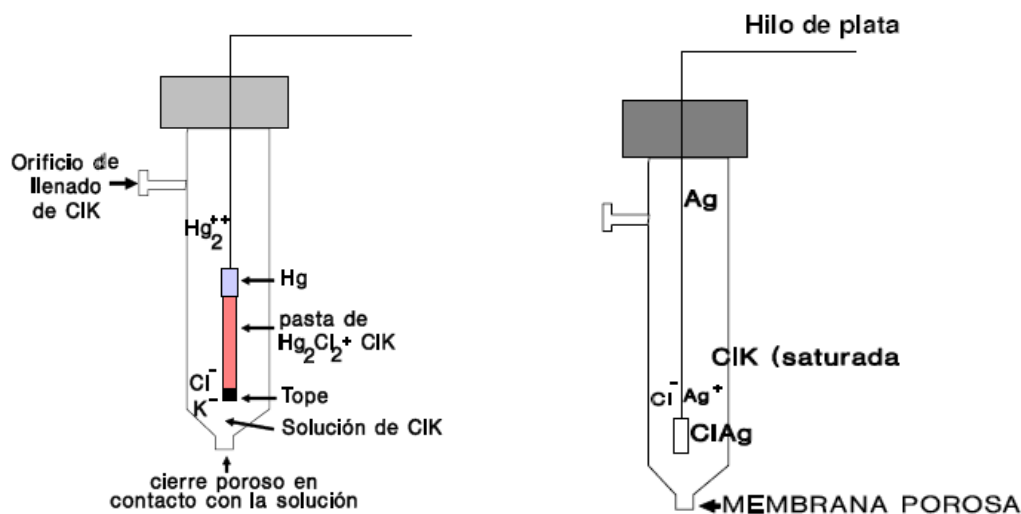


Figura 12. Electrodos de referencia de calomelanos y Ag-ClAg

5.1.2 Electrodo Indicador

Un electrodo indicador (E_{ind}) es aquel que genera un potencial cuyo valor es dependiente de la composición del analito en la disolución. Un electrodo indicador ideal responde de forma rápida y reproducible a los cambios de actividad de ion analito.

Las características principales de los electrodos indicadores son:

- Su potencial debe variar con la concentración de la especie electroactiva de acuerdo con la Ley de Nernst.
- Respuesta rápida y reproducible.
- Fácil de preparar.
- Resistente física y químicamente.
- Variación pequeña del potencial con la temperatura.

Los dos tipos de electrodos indicadores más comunes son **metálicos** y **membrana** selectivo a iones (ISE).

5.2 ELECTRODOS INDICADORES METÁLICOS

Son electrodos formados a partir de metales o aleaciones especiales se dividen en:

5.2.1 Electrodos de Clase 0 o Redox

El electrodo de clase 0 está formado por un metal o conductor químicamente inerte. Estos materiales inertes intercambian electrones reversiblemente con los componentes electrolitos y no están sujetos a procesos de oxidación o corrosión. Los electrodos inertes sirven como indicadores de cambio de potencial de sistema redox, como indicadores potenciométricos en volumetrías redox, etc. Ejemplos de electrodos de clase 0 ó redox son Pt^0 , Au^0 , Ag^0 o C.

El electrodo consiste en un hilo de metal introducido en una disolución que contiene las formas oxidadas y reducidas de otro metal. Por ejemplo: Un electrodo de Pt en una disolución que contiene Fe^{2+} y Fe^{3+} y que responde a la relación de actividades de las formas oxidada y reducida.

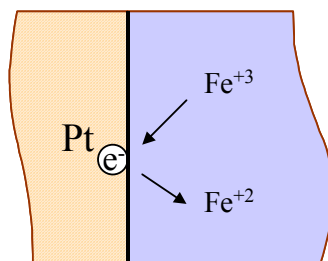
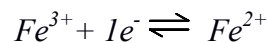


Figura 13. Electrodo redox

El potencial indicador del electrodo viene dado por:

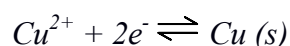
$$E_{ind} = E^o - 0,059 \log \frac{a_{Fe^{3+}}}{a_{Fe^{2+}}}$$

donde E^o es el potencial estándar de electrodo del par Fe^{+2}/Fe^{+3}

5.2.2 Electrodo de 1ª Clase

Es un sistema formado por **metal/ion metálico** basado en el intercambio reversible de electrones procedentes de un metal sumergido con sus propios iones en disolución. El sistema responde a la actividad del ion en disolución.

Por ejemplo, para un electrodo indicador de cobre en una disolución de Cu^{2+} .



El potencial indicador del electrodo viene dado por:

$$E_{ind} = E_{\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}}^o - \frac{0,059}{2} \log \frac{1}{a_{\text{Cu}^{2+}}}$$

Los electrodos de primera clase no son muy utilizados en el análisis potenciométrico por varias razones⁶⁰:

No son muy selectivos y responden no sólo a sus propios cationes sino también a otros cationes más fácilmente reducibles. Por ejemplo, un electrodo de cobre no puede utilizarse para la determinación de iones Cu(II) en presencia de iones Ag(I) porque también se reducen en la superficie del cobre.

Muchos electrodos metálicos, tales como los de cinc y cadmio, sólo pueden utilizarse en disoluciones neutras o básicas porque se disuelven en presencia de ácidos. Algunos metales se oxidan tan fácilmente que su uso queda restringido a disoluciones previamente desaireadas. Ciertos metales duros, tales como el hierro, cromo y cobalto no proporcionan potenciales reproducibles.

Por estas razones, los únicos sistemas electródicos de primera clase que se han utilizado son Ag/Ag^+ y Hg/Hg_2^{2+} en disoluciones neutras, y Cu/Cu^{2+} , Zn/Zn^{2+} , Cd/Cd^{2+} , Bi/Bi^{3+} , Tl/Tl^+ y Pb/Pb^{2+} en disoluciones desaireadas.

⁶⁰ D. Skoog, F. Holler, T. Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*. 5ª ed. Ed. McGraw-Hill

5.2.3 Electroodos de 2ª Clase

Existen dos tipos de electrodos de segunda clase.

5.2.3.1 Metal/Metal Anión soluble (M/MX)

Es un sistema reversible formado por **metal/ion metálico con una sal insoluble del ion metálico y exceso del anión X⁻**. Por ejemplo: Ag en AgCl.

Consiste en un hilo de metal introducido en una disolución de una sal poco soluble del ion metálico. Este sistema responde a la actividad del anión (X⁻).

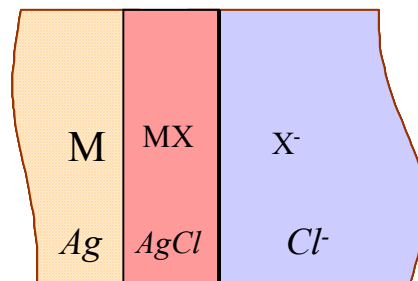


Figura 14. Interfase Metal/Metal-ion

Donde X⁻: Cl⁻, Br⁻, I⁻, SO₄⁼

La reacción del electrodo es:



El potencial indicador del electrodo viene dado por:

$$E_{ind} = 0,222 - 0,059 \log a_{Cl^-}$$

5.2.3.2 Electrodos Metal/Metal Oxido (M/MO)

Son electrodos donde en la superficie en contacto con la disolución se forma una capa de óxido. De esta forma, el anión de la disolución reacciona con el óxido formando una sal más agua. Ejemplos de este tipo de electrodo: Pb/PbO, Zn/ZnO, etc. Este tipo de electrodos son sensibles a la presencia de OH⁻ y de H⁺

En la **Figura 15** representa la interfase en metal (M) y metal-óxido (MO), donde X^- es un anión, por ejemplo: $CO_3^{=}$, CO_3H^- , Cl^- , $SO_4^{=}$

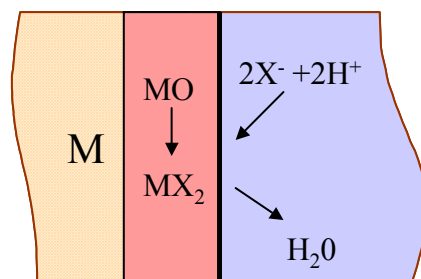


Figura 15. Interfase Metal/Metal Óxido

Forman sales insolubles con óxidos metálicos. Ejemplo:



5.2.4 Electrodo de 3ª Clase

Es un sistema reversible formado por **metal/sal metálica o complejo soluble/sal metálica y exceso del segundo catión**. El electrodo consiste en un hilo de metal introducido en una disolución de dos sales insolubles de un mismo anión. Por ejemplo, Ag en $Ag_2C_2O_4$ y CaC_2O_4 .

5.3 MODELO PARA DESCRIBIR EL POTENCIAL REDOX EN ELECTRODOS INDICADORES DE 1ª, 2ª Y 3ª CLASE

La ecuación de Nicolsky-Eisenman ha tenido una amplia aplicación para los electrodos de membranas, pero no es válida para los electrodos donde se producen corrientes faradaicas, como son los electrodos metálicos y de óxidos metálicos. Para estos últimos casos se desarrolló diversos modelos de comportamiento para cada uno de los tipos de electrodos metálicos. Partiendo de las ecuaciones de Nernst y de Nicolsky-Eisenman se desarrolló las ecuaciones que hemos publicado recientemente⁶¹ y que determinan el potencial generado por el electrodo en función de las constantes: coeficiente de selectividad (K_I^{pot}) y la concentración de la referencia (C_o) y de las

⁶¹ J. Soto, R. H. Labrador, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, C. Coll, E. García-Breijo, L. Gil. *Introduction of a model for describing the redox potential in faradic electrodes*. Journal of Electroanalytical Chemistry, 594 (2006) 96-104.

respectivas concentraciones de las soluciones. En la Tabla 1 se muestran las ecuaciones para un sistemas M/MO/MX₂/H⁺ a 25°C

Ion Primario	Interf.	E(mV)	K _I ^{pot}	E ⁰ (mV)
OH ⁻	X ⁻	$E_1^0 - \frac{59.16}{2} \log \left[(OH^-)^2 + \frac{K_{ps}}{C_0} + K_I^{pot} (X^-)^2 \right]$	K_I^{pot}	E_1^0
H ⁺	X ⁻	$E_2^0 - \frac{59.16}{2} \log \left[\frac{1}{(H^+)^2} + \frac{K_{ps}}{C_0 K_w^2} + K_I^{pot'} (X^-)^2 \right]$	$\frac{K_I^{pot}}{K_w^2}$	$E_1^0 - 59.16 pK_w$
X ⁻	OH ⁻	$E_3^0 - \frac{59.16}{2} \log \left[(X^-)^2 + \frac{K_{ps}}{C_0 K_I^{pot}} + K_I^{pot''} (OH^-) \right]$	$\frac{1}{K_I^{pot}}$	$E_1^0 - \frac{59.16}{n} \log K_I^{pot}$
X ⁻	H ⁺	$\Delta E_4^0 - \frac{59.16}{2} \log \left[(X^-)^2 + \frac{K_{ps}}{C_0 K_I^{pot}} + \frac{K_I^{pot'''}}{(H^+)^2} \right]$	$\frac{K_w^2}{K_I^{pot}}$	$E_1^0 - \frac{59.16}{n} \log K_I^{pot}$
M ⁺²	H ⁺	$E_0^0 - \frac{59.16}{2} \log \left[\frac{1}{C_0} + K_I^{pot} \frac{1}{(H^+)^2} \right]$	$\frac{(1+K_0)K_w}{K_0 K_{ps}}$	$E_{M^{+n}/M}^0$
M ⁺²	X _i ⁻	$E_0^0 - \frac{59.16}{2} \log \left[\frac{1}{C_0} + \sum K_I^{pot} (X^-)_i \right]$	$\frac{1}{K_{ps}^{MX_2}}$	$E_{M^{+n}/M}^0$

Tabla 1. Ecuaciones que describen el potencial estándar de un sistema M/MO/MX₂/H⁺, X⁻ a 25°C

5.4 ELECTRODOS INDICADORES DE MEMBRANA

A menudo, los electrodos de membrana se denominan electrodos selectivos de iones debido a la gran selectividad de la mayor parte de estos dispositivos. Estos electrodos generan un potencial proporcional al menos logaritmo de la concentración de un determinado ion: $-lg[Ion]$. Por este motivo se denominan a estos electrodos como electrodos *pIon*, debido a que su respuesta se registra generalmente como una función p (-lg), por ejemplo: pH, pCa o pNO₃.

5.4.1 Clasificación de las Membranas

Los electrodos de membranas se clasifican por la composición química de la membrana. El mecanismo general por el que se desarrolla en estos dispositivos un potencial selectivo a iones depende de la naturaleza de la membrana y es completamente diferente del origen del potencial en los electrodos indicadores

metálicos. El potencial de un electrodo metálico tiene su origen en la tendencia de una reacción de oxidación–reducción a producirse en la superficie del electrodo. En los electrodos de membrana, por el contrario, el potencial observado es un tipo de potencial de unión que se desarrolla en la membrana que separa la disolución del analito de la disolución de referencia.

Los electrodos de membrana se suele clasificar en membrana cristalina y no cristalina. En el primer caso puede ser un cristal único o un policristal o mezcla de cristales. En el segundo caso tener forma de vidrio o líquido, normalmente inmovilizado en un polímero.

Los electrodos de membranas presentan propiedades comunes que proporcionan la sensibilidad y la selectividad hacia ciertos cationes y aniones. Las propiedades más importantes que deben de cumplir son: mínima solubilidad, conductividad eléctrica y reactividad selectiva con el analito.

El electrodo de membrana más utilizado es el de vidrio para medidas de pH. Los electrodos de membrana tienen como característica comunes:

a) Se basan en el establecimiento de una diferencia de potencial entre las dos caras de la membrana que separa dos disoluciones de concentración diferente de la especie a determinar. Una de estas disoluciones es de concentración conocida, determinándose la de la otra por diferencia de potencial.

b) La diferencia de potencial establecida tiene como principal componente el cambio de energía libre asociada a la transferencia de masa a través de la membrana.

c) Cumplen la Ley de Nernst en la forma de ecuaciones de Nicolsky-Eisenman.

5.5 OTROS DISPOSITIVOS PARA MEDIDAS POTENCIOMÉTRICAS

Además de los dispositivos que se han presentado en los puntos anteriores, hay otros dispositivos que se están desarrollando recientemente con nuevas tecnologías. Entre ellos destacan los ISFET y los electrodos sensibles a moléculas.

5.5.1 Transistores de Efecto de Campo Selectivos de Iones (ISFET)

Los ISFET son electrodos ion selectivo basado en transistores de efecto de campo. Este dispositivo está formado por capas de metal, óxido y semiconductor (MOSFET) en el que el terminal de puerta, en lugar de poseer un contacto metálico, está recubierta con una capa aislante de nitruro de silicio (Si_3N_4). Al poner esta capa en contacto con una disolución, la variación de la concentración de iones de interés proporciona un potencial variable en la puerta que permite controlar la conductividad del canal del dispositivo y como consecuencia su corriente.

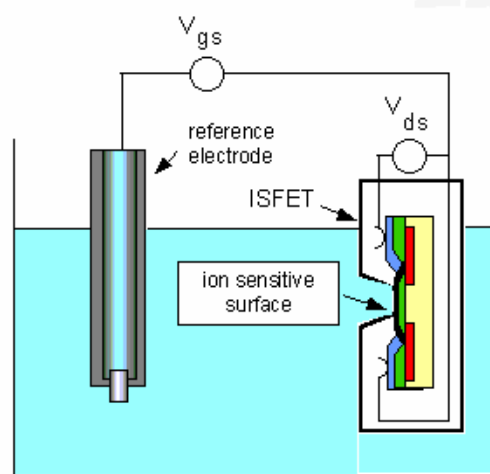


Figura 16. Representación esquemática de un sistema de medida de pH con ISFET

Uno de los problemas de los dispositivos MOS en los circuitos electrónicos ha sido su pronunciada sensibilidad a las impurezas iónicas en su superficie y la industria electrónica ha dedicado una gran cantidad de dinero y esfuerzo para minimizar o eliminar esta sensibilidad con el fin de producir transistores estables. Pero desde 1970, varios científicos intentaron explotar la sensibilidad de los MOSFET a las impurezas iónicas en su superficie para la determinación potenciométrica selectiva de varios iones. Esos estudios condujeron al desarrollo de diferentes tipos de transistores de efecto de campo selectivos de iones ISFET.

La superficie del aislante de la puerta funciona de forma muy parecida a la superficie de un electrodo de vidrio. Los protones procedentes de los iones hidronio de la disolución a ensayo son adsorbidos por posiciones microscópicas en el nitruro de silicio. Cualquier cambio en la concentración de ion hidronio de la disolución provoca un cambio en la concentración de los protones adsorbidos. El cambio en la

concentración de protones adsorbidos da origen a un cambio del potencial electroquímico entre la puerta y la fuente, lo que a su vez varía la conductividad del canal para proporcionar una señal que es proporcional al logaritmo de la actividad de ion hidronio en la disolución. Todo el ISFET excepto el aislante de la puerta está recubierto de un encapsulado polimérico para aislar todas las conexiones eléctricas de la disolución del analito.

La aplicación principal de los ISFET es como medidor de pH, pero puede ser sensible a otras especies recubriendo el aislante de nitruro de silicio de la puerta con un polímero que contenga moléculas que tiendan a formar complejos con especies diferentes⁶².

Los ISFET ofrecen un cierto número de ventajas significativas sobre los electrodos de membrana, incluyendo robustez, pequeño tamaño, inercia frente ambientes agresivos, respuesta rápida y baja impedancia eléctrica⁶³. A diferencia de los electrodos de membrana, los ISFET no requieren la hidratación previa a su utilización y puede almacenarse en seco. A pesar de estas numerosas ventajas, no apareció en el mercado ningún electrodo ISFET específico hasta principio de los noventa⁶⁴. La razón de este retraso es que los fabricantes eran incapaces de desarrollar la tecnología adecuada para encapsular los dispositivos con el fin de crear un producto que no presentase deriva e inestabilidad.

5.5.2 Electrodo Sensible a Moléculas

Se han desarrollado dos tipos de sistema de electrodos de membrana que actúan selectivamente sobre ciertos tipos de moléculas. Uno de estos se utiliza para la determinación de gases disueltos, tales como dióxido de carbono y amoníaco. El otro, cuya base es las membranas biocatalíticas, permite la determinación de una variedad de compuestos orgánicos, tales como glucosa y urea.

⁶² Y. Vlasov, A. Brasov. *Analytical applications of pH-ISFETs*. Sensors and Actuators, B, 10 (1992) 1-6.

⁶³ P. Kenber. *ISFETs: New tools for water quality monitoring*. Water Science and Technology, 13 (1981) 255-261.

⁶⁴ D. M. Wilson, S. Hoyt, J. Janata, K. Booksh, L. Obando. *Chemical sensors for portable, handheld field instruments*. IEEE Sensors Journal, 1, (2001), 256-274.

5.6 INSTRUMENTOS PARA MEDIR LOS POTENCIALES DE CELDA

Una consideración fundamental en el diseño de un instrumento para medir potenciales de celda es que su resistencia debe ser grande con respecto a la celda. Si no lo es, se producirán errores significativos como consecuencia de la caída de tensión en la celda. Por ejemplo un electrodo de vidrio de calomelanos con resistencia interna de 20 M Ω con verdadero potencial de 0,8 V, si se mide con un dispositivo con una resistencia de 100 M Ω , el error relativo que se comete es del 17%. Es importante apreciar que un error en el potencial de esta magnitud tendría un efecto enorme en la exactitud de una medida de concentración basado en este potencial.

En potenciometría se emplean dos tipos de instrumentos, el potenciómetro como instrumento de medida de potencial por medio de una comparación con un voltaje conocido a través de un galvanómetro y el voltímetro electrónico de medida directa.

5.6.1 Medidas Potenciométricas Directas

La determinación de un ion o de una molécula mediante medida potenciométrica directa es rápida y sencilla, requiriendo sólo la comparación del potencial desarrollado por el electrodo indicador en la disolución problema con el potencial obtenido cuando se sumerge en una o más disoluciones patrón del analito. Debido a que la mayoría de los electrodos indicadores son selectivos, normalmente no se requieren etapas de separación previas. Además, las medidas potenciométricas son rápidas y se adaptan fácilmente al control automático y continuo de las actividades de los iones.

6 TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

La voltametría⁶⁵ abarca un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se deduce de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización de un electrodo indicador, o de trabajo.

⁶⁵ Su denominación más precisa es **Voltamperometría** porque existe una variación del potencial y de la corriente eléctrica. Pero se utiliza habitualmente el nombre de voltametría.

La voltametría se basa en la medida de la intensidad de corriente que se desarrolla en una celda electroquímica en condiciones de polarización total de concentración, mientras que las medidas potenciométricas se realizan con valores de intensidad de corriente que se aproximan a cero y cuando la polarización está ausente. Además, en la voltametría tiene lugar un consumo mínimo de analito mientras que en coulombimetría prácticamente todo el analito pasa a otro estado.

La voltametría moderna es una poderosa herramienta utilizada por diferentes químicos interesados en el estudio de procesos de oxidación y reducción, así como los procesos de adsorción. El estudio de estos procesos se ha extendido con el surgimiento de las lenguas electrónicas, donde interesa discriminar diferentes muestras de disoluciones a partir del diferente comportamiento en el proceso de oxidación y reducción⁶⁶.

6.1 SEÑALES E INSTRUMENTACIÓN EN VOLTAMETRÍA

En voltametría, se aplica por medio de un microelectrodo una señal de excitación a una celda electroquímica. Esta señal de excitación provoca una respuesta de intensidad de corriente característica en la que se basa este método.

Para realizar las medidas voltamétricas se utiliza una celda consta de tres electrodos: el *electrodo de trabajo*, cuyo potencial se varía linealmente con el tiempo. El segundo electrodo es un *electrodo de referencia* cuyo potencial permanece constante durante el experimento, el tercer electrodo es un *electrodo auxiliar*, que normalmente es un alambre de platino, que sirve simplemente para conducir la electricidad desde la fuente de la señal a través de la disolución al microelectrodo.

6.2 VOLTAMETRÍA CÍCLICA

En la voltametría cíclica (CV), la variación de la corriente en un electrodo estacionario está provocada por una señal de potencial de forma triangular, que a menudo se repite varias veces. La **Figura 17-a** muestra la variación de corriente cuando

⁶⁶ J. Buffle, M-L. Tercier-Waeber. *Voltammetric environmental trace-metal analysis and speciation: From laboratory to in situ measurements*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 24, SPEC. ISS., (2005) 172-191.

una determinada disolución se somete a la señal de excitación cíclica que se muestra en la **Figura 17-b**. Dependiendo de la composición de la muestra, la dirección del barrido inicial puede ser negativa, tal como se muestra en la figura, o positiva. Generalmente, los tiempos del ciclo oscilan desde 1 ms o menos hasta 100 s o más.

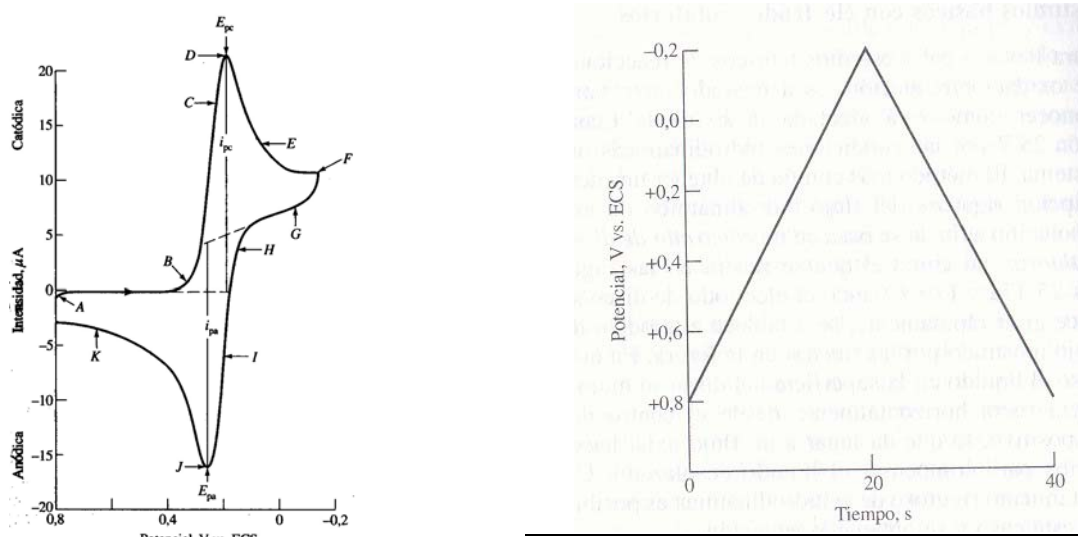


Figura 17. Señales de voltametría cíclica

La CV es una herramienta importante para el estudio de los mecanismos y de las velocidades de los procesos de oxidación/reducción, en particular para sistemas orgánicos y organometálicos. A menudo, los voltogramas cíclicos revelan la presencia de intermedios en las reacciones de oxidación/reducción.

7 OTRAS TÉCNICAS ELECTROQUÍMICAS

7.1 CULOMBIMETRÍA

La coulombimetría es un método electroquímico que se basa en la oxidación o reducción de un analito durante un tiempo suficiente para asegurar su conversión cuantitativa a un nuevo estado de oxidación. Existen tres métodos coulombimétricos:

- Coulombimetría a potencial constante.
- Coulombimetría a intensidad constante.
- Electrogravimetría.

En los métodos electrogravimétricos se pesa el producto el producto de la electrolisis que se deposita sobre uno de los electrodos. Por otra parte, en los

procedimientos coulombimétricos, es la cantidad de electricidad de electricidad necesaria para completar la electrólisis la que sirve como medida de la cantidad de analito presente.

Los tres métodos tienen, en general, una moderada selectividad, sensibilidad y rapidez; en muchos casos, están entre los métodos más exactos y precisos al alcance del químico, siendo frecuentes imprecisiones relativas de unas décimas de ciento. Finalmente, a diferencia de otros métodos, estos tres no requieren calibración frente a patrones⁶⁷, esto es, la relación funcional entre la cantidad medida y el peso del analito se puede deducir de la teoría.

7.2 CONDUCTIMETRÍA

La conducción de una corriente eléctrica a través de una disolución iónica se realiza por medio del movimiento de los iones en la disolución. Una forma de conocer la capacidad conductora de la disolución es poner dos electrodos en una disolución y medir su resistencia. Sin embargo el valor de la resistencia depende no solamente de las propiedades de la disolución, sino también de la geometría y separación de los electrodos. Por tanto la **resistencia** (unidad Ω), o su inversa la **conductancia** (unidad Ω^{-1} ó Siemens - S) no se utiliza para describir las propiedades de las disoluciones iónicas. Las unidades usadas son: la **resistividad** ($\Omega \cdot m$) o la **conductividad** ($\Omega^{-1} \cdot m^{-1}$ ó $S \cdot m^{-1}$).

La conductividad de las disoluciones depende de los tipos de iones presentes y de sus concentraciones. Todos los iones presentes en la disolución participan en el proceso de conducción. Para clasificar estas contribuciones, sirve de ayuda tener en cuenta la conductividad por cada ion equivalente (por cada ión). La conductividad total se compone de las contribuciones de todos los iones presentes.

7.2.1 Medida de la Conductividad

Se puede realizar medidas de la conductancia empleando una batería, un galvanómetro para medir la corriente, y dos electrodos inmersos en la disolución a

⁶⁷ B. Van der Schoot, P. Bergveld. *Coulometric Sensors, the Application of a Sensor-Actuator System for Long-Term Stability in Chemical Sensing*. Sensors and Actuators, 13, (1986) 251-262.

analizar. Sin embargo, utilizando este sistema tan simple, nos encontramos con algunos problemas importantes, especialmente si se necesitan medidas precisas. La dificultad estriba en la influencia del sobrepotencial y de la polarización a causa de procesos electrolíticos por concentración en las corrientes que pasan por la celda cuando se aplica un potencial externo a los electrodos. El potencial real de la disolución será impreciso debido a que las caídas de potencial en las interfases son poco conocidas y, en consecuencia, producen errores en la conductancia de la disolución electrolítica. Los posibles problemas, debidos a la polarización por concentración, desaparecen tomando las medidas tan rápidas para que no de tiempo a que se produzca ninguna polarización por concentración apreciable cerca de las superficies de los electrodos. En la práctica se aplica un potencial variable en forma de onda cuadrada de frecuencia entre 100 Hz y 1 kHz⁶⁸.

La conductividad es un parámetro que se suele incorporar en los análisis de sistemas de lenguas electrónicas. Como un indicador claro y objetivo de la concentración total de iones en la disolución, pero en cambio no ofrece información discriminante de los distintos componentes cuando las disoluciones son complejas.

8 TECNOLOGÍAS DE FABRICACIÓN DE SENSORES QUÍMICOS EN ESTADO SÓLIDO

En la actualidad se está incrementando el uso y desarrollo de sensores químicos de estado sólido. Este hecho obedece a lo simple de su funcionamiento, su pequeño tamaño, resistencia y a lo reducido de su costo, ya que es posible emplear técnicas de fabricación masiva que además significan mayor reproducibilidad en la construcción del dispositivo⁶⁹.

En este contexto, se puede distinguir tres metodologías para construir sensores químicos de estado sólido: **manuales**, de **capa fina** o *thin-film* y de **capa gruesa** o

⁶⁸ R. Martínez-Mañez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez y E. Gadea. *A multisensor in thick-film technology for water quality control*. Sensors and Actuators A, 120 (2005) 589-595.

⁶⁹ M. J. Madou y S.R. Morrison. *Chemical sensing with solid state devices*. Academic Press., San Diego (1990).

thick-film; siendo las dos últimas utilizadas principalmente para producir en masa dispositivos en configuración plana.

Aunque las metodologías manuales de construcción de sensores químicos de estado sólido presentan una baja reproducibilidad y son de difícil adaptación para la producción masiva de dispositivos, son las más versátiles que existen; este hecho, unido a la modesta infraestructura necesaria para su desarrollo, las han convertido en las más utilizadas ya que, en cuanto a los costos de desarrollo de prototipos, son las más económicas. En consecuencia, son recomendables en las primeras etapas del desarrollo de los sensores químicos.

La tecnología de **capa fina** ó *thin-film* se basa en la aplicación de un conjunto de técnicas de deposición y grabado, que junto con la realización de procesos microlitográficos permiten la deposición secuencial de capas de espesores del orden de 1 a 10 micras aproximadamente. El material es depositado sobre un substrato (generalmente silicio) mediante procesos tecnológicos microelectrónicos, tales como *sputtering*, deposición química en fase vapor (CVD), etc.

Indudablemente esta tecnología es muy recomendable en el desarrollo de dispositivos miniaturizados de estado sólido y tienen la ventaja de poseer una gran reproducibilidad; no obstante, la infraestructura que se requiere para su realización es muy costosa, por lo que desarrollar una línea de investigación en esta área es en muchos casos económicamente prohibitivo. Considerando su alto costo de desarrollo, es una tecnología que debe plantearse solamente en los casos que tenga alta probabilidad de alcanzar el éxito, ya que de otra manera significaría una pérdida inútil de recursos⁷⁰.

Como alternativa intermedia entre la tecnología *thin-film* y las metodologías manuales, contamos con la tecnología de **capa gruesa** o *thick-film* que permite construir sensores químicos de forma masiva con una infraestructura mínima y buena reproducibilidad. Esta tecnología ha tenido mucho éxito en los últimos años e incluso ya cuenta con representantes comercialmente disponibles, hecho que nos habla, por si solo, de su gran potencialidad.

⁷⁰ M. Ferroni, V. Guidi, G. Martinelli, P. Nelli, M. Sacerdoti, G. Sberveglieri. *Characterization of a molybdenum oxide sputtered thin film as a gas sensor*. Thin Solid Films, 307 (1997) 148-151.

8.1 TECNOLOGÍA *THICK-FILM* o CAPA GRUESA⁷¹

La tecnología híbrida de capa gruesa o “*thick-film hybrid technology*” se introdujo hace más de 60 años para el desarrollo de circuitos electrónicos utilizando técnicas serigráficas combinadas con la incorporación de componentes semiconductores. Estos circuitos destacan por su robustez y bajo coste, encontrando aplicación en, prácticamente, todos los campos de la electrónica.

La utilización de esta tecnología para el desarrollo de sensores es relativamente nueva, apareciendo las primeras publicaciones a partir de los años 80. El desarrollo de los sensores permite una total integrabilidad con los subsistemas electrónicos de adaptación y medida, ofreciendo componentes finales miniaturizados y robustos. Por otra parte, ofrece la posibilidad de dar soporte a materiales sensores que pueden ser depositados mediante procesos serigráficos.

La tecnología *thick-film* consiste, básicamente, en fijar tintas o pastas sobre sustratos mediante técnicas serigráficas (**Figura 18**, **Figura 19**, **Figura 20**).

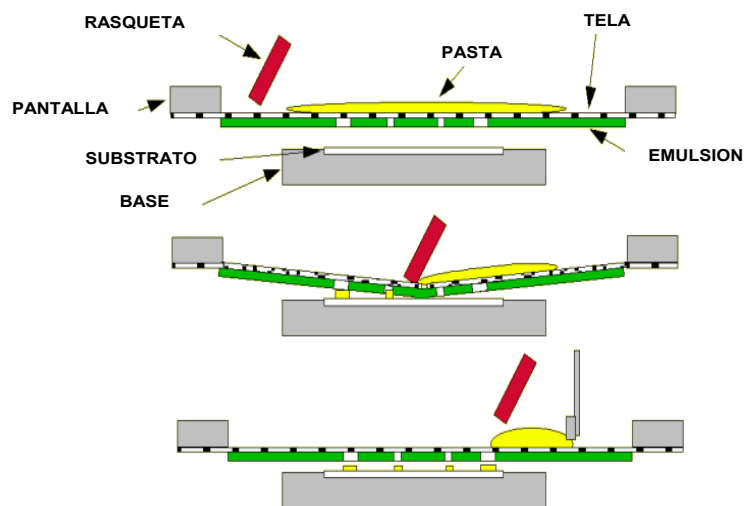


Figura 18. Técnicas serigráficas

⁷¹ M. Prudenziati. *Handbook of sensors and actuators: Thick film Sensors*. Vol.1, Series editor S. MiddelHoek, 1994 (Elsevier).

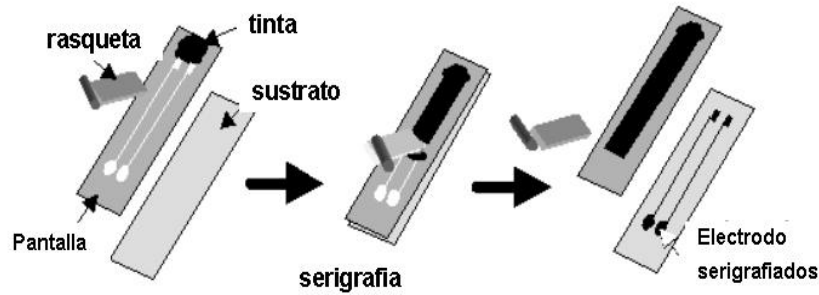


Figura 19. Obtención de un electrodo mediante técnicas serigráficas

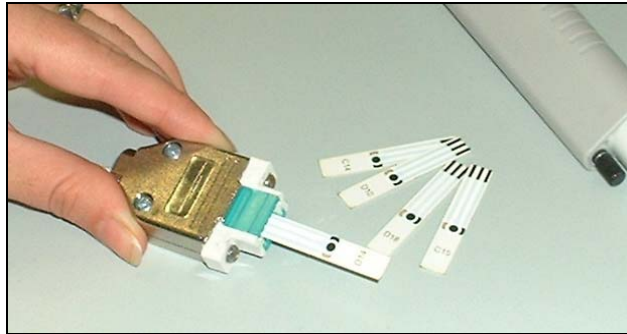


Figura 20. Ejemplos de electrodos en capa gruesa (*Thick-Film*)

Esta tecnología es la utilizada en el presente trabajo y está desarrollada y explicada en el Anexo I de la presente memoria.

8.1.1 Otras Técnicas de Deposición de Materiales

Para depositar materiales en tecnología de capa gruesa se emplean otros métodos distintos de las serigráficas, los más utilizados son: moldeado (*casting*), inmersión (*dipping*), goteo (*dropping*), centrifugado (*spinning*), atomización (*spray-coating*), lecho fluido (*fluidized-bed*), por brocha (*brushing*), rodillo (*roller-coating*) o rotograbado (*gravure printing*) e inyección de tinta (*ink-jet printing*) (Figura 21).

En la técnica de modelado (*casting*), el material se vacía en una zona delimitada por un molde. Normalmente esta metodología es manual, pero puede ser automatizada mediante la incorporación de dosificadores automáticos (Figura 21-a).

En la inmersión (*dipping*), la zona a recubrir es sumergida en el material a depositar y posteriormente retirada. En ésta técnica debe controlarse fundamentalmente la viscosidad del baño de inmersión, su temperatura, el número de inmersiones y el tiempo de cada una de ellas a fin de obtener una buena reproducibilidad en el grosor de la capa depositada. Aunque es un proceso de deposición manual, existen equipos automatizados

que además de mantener constantes las propiedades del baño, integran estufas para el curado (**Figura 21-b**).

Tal vez una de las técnicas más utilizadas en los desarrollos de sensores químicos para aplicar membranas es el goteo (*dropping*), que consiste en gotear la cantidad exacta del material a depositar sobre el dispositivo. Este procedimiento también ha sido automatizado mediante el uso de microdosificadores y bandas transportadoras (**Figura 21-c**).

En la técnica de recubrimiento por centrifugado (*spin-coating*), el material es previamente depositado sobre la parte central del dispositivo que se requiere cubrir; éste a su vez es sujetado mediante vacío a una centrifuga que una vez accionada provoca la dispersión del material desde el centro hacia los extremos del dispositivo. El grosor de la capa es función de la viscosidad de la solución, velocidad y aceleración angular de la centrífuga, así como del tiempo. Esta técnica ha sido aplicada fundamentalmente para recubrir obleas de silicio; sin embargo, también se ha implementado con otras geometrías y materiales (**Figura 21-d**).

El recubrimiento por atomización (*spray-coating*) consiste simplemente en provocar que el material a depositar se divida en pequeñas gotas que son directamente aplicadas a la superficie que se requiera cubrir; el proceso de deposición se logra mediante aire comprimido en la mayoría de los casos, aunque existen algunas variantes (**Figura 21-e**).

En la técnica del lecho fluidizado (*fluidized-bed*) el material que se requiere depositar es suspendido mediante el flujo de algún gas inerte a baja presión; el dispositivo es inmerso en el material suspendido y la adhesión de éste se promueve por medio de calor, cargas electrostáticas o adhesivos previamente depositados (**Figura 21-f**).

Un método de aplicación poco ortodoxo consiste en depositar el material mediante la utilización de una brocha o pincel (*brushing*). Aunque ésta técnica es muy poco utilizada, es particularmente útil en aquellos casos donde la geometría del dispositivo hace difícil el acceso mediante otras técnicas (**Figura 21-g**). Asimismo, el material puede depositarse mediante un rodillo (*roller-coating*); en este caso, la aplicación de

motivos definidos puede hacerse si éstos han sido grabados en el rodillo previamente (*gravure printing*) o bien a través de una máscara (**Figura 21-h**).

Por último, la técnica denominada de inyección de tinta (*ink-jet printing*) se basa en la tecnología desarrollada para impresoras y ofrece una gran resolución; no obstante su alto costo y los problemas de desarrollo de tintas con características idóneas, han limitado su avance. (**Figura 21-i**).

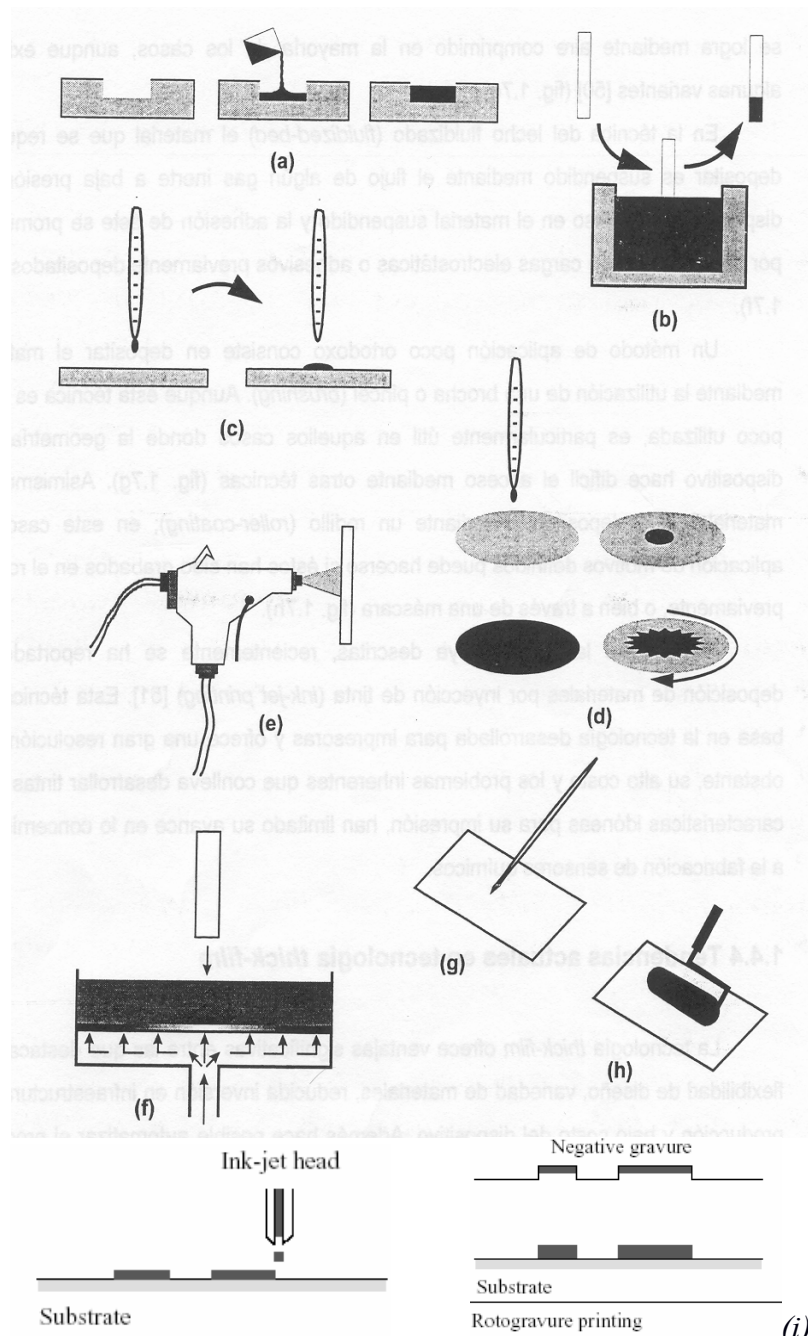


Figura 21. Distintas técnicas de deposición de materiales

8.2 TENDENCIAS ACTUALES EN TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA PARA SENSORES

La tecnología de capa gruesa ofrece ventajas significativas entre las que destacan la flexibilidad de diseño, variedad de materiales, reducida inversión de infraestructuras de producción y bajo coste del dispositivo. Además hace posible automatizar el proceso de producción, miniaturizar dispositivos y facilita la transferencia de tecnología.

Los dispositivos obtenidos por esta tecnología presentan una elevada actividad electroquímica que se deriva de su extraordinaria área superficial debida a su estructura porosa⁷².

Aunque la tecnología descrita es una opción atractiva para la fabricación de sensores químicos, no significa que esté exenta de problemas y limitaciones. Requiere de complicados ciclos de curado a altas temperatura y tiempos prolongados; por otra parte, en ocasiones se obtienen bajas reproducibilidades debido a la evaporación de los disolventes contenidos en las pastas durante la impresión. Además la aplicabilidad de ésta tecnología está limitada por una resolución máxima de 100 micras⁷³ y también por la posibilidad de obtener los materiales adecuados para un dispositivo particular. Sin embargo, algunos inconvenientes pueden ser superados mediante el diseño de dispositivos desechables que permiten la simplificación de algunos aspectos de la realización tecnológica, ya que no se requiere de un prolongado tiempo de vida o buena reproducibilidad de la señal por prolongados intervalos de tiempo. En este caso cabe alcanzarse una buena reproducibilidad en la construcción del dispositivo⁷⁴.

⁷² X. Xing, T.C. Tan, M. Shao y C.C. Liu *Electrochemical oxidation of L-ascorbic acid at the graphite electrode and its monitoring by thick film graphite sensor assembly*. *Electroanalysis*, 4 (1992) 191-197.

⁷³ S. Leppävouri, J. Väänänen, M. Lahti, J. Remes y A. Uusimäki. *A novel thick-film technique, gravure offset printing, for the realization of fine-line structures*, *Sensors and Actuators.A*, 41-42 (1994), 593-597.

⁷⁴ T. Wang, Q. Chen. *Enzyme microelectrode array strips for glucose and lactate*. *Anal. Chem.*, 66 (1994) 1007-1011.

El transductor electroquímico generalmente es el más empleado; siendo el conductimétrico^{75,76}, el potenciométrico^{77,78} y el amperométrico^{79,80} los representantes más comunes.

Los estudios básicos y los desarrollos tecnológicos son dos claras tendencias en tecnología de capa gruesa. La investigación fundamental en el campo aborda, entre otros temas, la simulación de aspectos teóricos que ayuden en la interpretación de los resultados experimentales a fin de contar con elementos que auxilien en la optimización de dispositivos⁸¹, la caracterización del ruido⁸², así como el estudio de los materiales⁸³, inmovilización química⁸⁴ y electroquímica fundamental⁸⁵.

En aquellos casos en que las propiedades fisicoquímicas de las pastas dificultan su deposición por serigrafía, existen nuevas propuestas tecnológicas por ejemplo, el uso de microdosificadores, centrifugado⁸⁶ y otras. La integración de procesos de fabricación de

⁷⁵ U. Bilitewski, W. Drewes y R. D. Schmid, *Thick-film biosensor for urea*. Sensors and Actuators B, 7 (1992) 321-326.

⁷⁶ U. Bilitewski, P. Rüger, W. Drewes, F. Bechtold y R.D. Schmid *Biosensors: fundamentals technologies and applications*, F.Scheller&R.Schmid ed., VCH, Weinheim, 1992.

⁷⁷ R.E. Belford, A.E. Owen y R.G. Kelly *Thick film hybrid pH sensors*, Sensors and Actuators B, 11 (1987), 387-398.

⁷⁸ D.H. Craston, C.P. Jones y D.E. Williams *Microband electrodes fabricated by screen printing processes: application in electroanalysis*, Talanta., 38 (1991) 17-26.

⁷⁹ P. Atanasov, A. Kaisheva, S. Gamburgzev, I. Iiew. *Metallocene-mediated amperometric biosensors for one-shot glucose determination*, Sensors and Actuators B, 8 (1992) 59-64.

⁸⁰ U. Bilitewski, G.C. Chemnitz, P. Rüger, R.D. Schmid *Miniature disposable biosensors*, Sensors and Actuators B, 7 (1992) 351-355.

⁸¹ T. S. Rantala, L. Pirttiaho, V. Lantto. *Simulation studies of non-ohmic conductance behavior in SnO₂ thick-film gas sensors*. Sensors and Actuators B, 15-16 (1993) 323-227.

⁸² J.K. Atkinson, R.P. Sion, E. Sizeland. *The characterization and compensation through sensor array signal processing techniques of drift and low frequency noise in thick-film semiconductor sensors*, Sensors and Actuators A, 41-42 (1994) 607-611.

⁸³ P. Umadevi, C.L. Nagendra, G.K.M. Thutupalli *Structural, electrical and infrared optical properties of vanadium pentoxide (V₂O₅) thick-film thermistors*, Sensors and Actuators A, 39 (1993) 59-69.

⁸⁴ W. Schuhmann, C. Lehn, H-L- Schmidt, B. Grüding *Comparison of native and chemically stabilized enzymes in amperometric enzyme electrodes*", Sensors and Actuators B, 7 (1992), 393-398.

⁸⁵ J.P. Hart, I.C. Hartley. *Voltammetric and amperometric studies of thiocoline at a screen-printed carbon electrode chemically modified with cobalt phthalocynin: studies towards a pesticide sensors*. Analyst, 119 (1994) 259-263.

⁸⁶ T.S. Rantala, L.Pirttiaho, V. Lantto *"Simulation studies of non-ohmic conductance behavior in SnO₂ thick-film gas sensors*. Sensors and Actuators B, 15-16 (1993), 323-22.

capa gruesa con otras tecnologías se está incrementando, por ejemplo en la deposición química en fase vapor, metalización o *sputtering*, *plasma-etching* y *lift-off*.⁸⁷

En el futuro, la convergencia de diferentes tecnologías permitirá la realización de eficientes dispositivos integrados o microsistemas, provocando el incremento de las relaciones interdisciplinar con otros campos del conocimiento.

⁸⁷ S. Nakamoto, N. Ito, T. Kuriyama, J. Kimura. *A lift-off method for patterning enzyme-immobilized membranes in multi-biosensors*. Sensors and Actuators B, 13 (1988) 165-172.

Capítulo 3. Procesado de Datos

Una de las piezas claves de los sistemas de las lenguas electrónicas es el conjunto de técnicas que trabajan con la información que han obtenido los sensores químicos. Esta información constituye un conjunto de parámetros de salida, que determinan las características cualitativas o cuantitativas de la muestra a analizar. A este tratamiento de la información se denomina procesado de datos. En las señales procedentes de las lenguas electrónicas la información posee características multivariante porque proceden de un conjunto de sensores múltiples.

El procesado de datos multivariante tiene su origen en la rama de la química analítica denominada *quimiometría*⁸⁸, que es una aproximación a la ciencia de las medidas químicas basada en la observación indirecta. En ciertas circunstancias, donde se requiera medidas rápidas y económicas, es más aconsejable realizar una medida indirecta que directa. Para ello, se utilizan métodos matemáticos, estadísticos y otros métodos de lógica formal que vienen determinados por las propiedades de las sustancias⁸⁹.

Con el advenimiento de las narices electrónicas se desarrollaron y estandarizaron diversos métodos quimiométricos que han sido utilizados por la mayoría de los investigadores. Estos métodos parten de la naturaleza de los sensores químicos de gas que suelen poseer características de solapamiento de su sensibilidad a diversos tipos de agentes.

⁸⁸ B. Lavine. *Chemometrics*. Anal Chem, 70 (1998) 209-228.

⁸⁹ B. Lavine. *Chemometrics*. Anal Chem, 72 (2000) 91-97.

1 ESQUEMA DE BLOQUES

En el procesado de señal existen una serie de etapas, que se cumplen en la mayoría de los casos en las narices y lenguas electrónicas. Las etapas se pueden agrupar en un sistema de bloques como se refleja en la **Figura 22**⁹⁰.

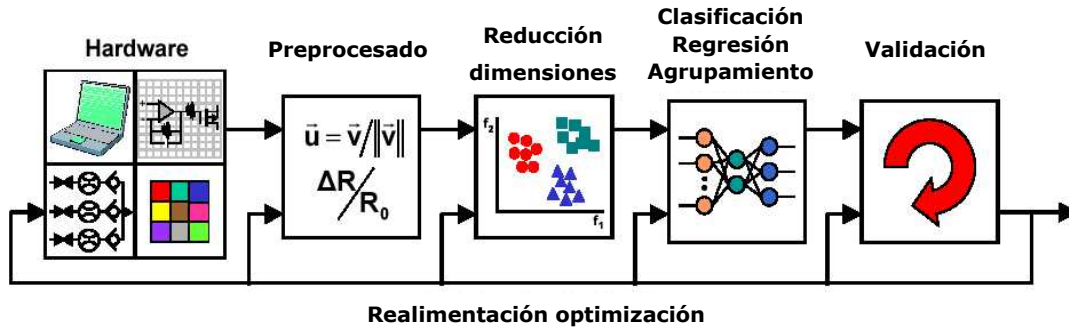


Figura 22. Diagrama de bloques de sistema de procesado de datos una nariz electrónica

El punto de partida del sistema de bloques es el **hardware** del sistema. Bajo este nombre se engloba al conjunto de subbloques que forman: los sensores químicos, los sistemas neumáticos (narices) o hidráulicos (lenguas) que permite el movimiento de las muestras a analizar, los sistemas electrónicos para el tratamiento de la señal procedente de los sensores y el sistema informático para el tratamiento de los datos.

La etapa de **preprocesado**, como su nombre indica, contempla posibles modificaciones previas (p.e. normalizaciones) de los valores de las medidas que posibiliten o faciliten las siguientes etapas de procesado de datos. El preprocesado suele ser necesario porque los sensores tienden a generar informaciones de magnitud muy variada, lo que dificulta su comparación, o las condiciones de las medidas no son constantes debido a derivas de los sensores.

El **procesado** propiamente dicho de los datos suele estar formado por una serie de técnicas que permiten obtener conclusiones de las medidas realizadas. Las tareas básicas de procesado de datos son la **clasificación** y la **regresión**.

⁹⁰ R. Gutierrez-Osuna *Pattern Analysis for Machine Olfaction: A Review*. IEEE Sensors Journal, vol. 2, (2002) 3, 189-202.

Las técnicas de **clasificación** intentan lograr una distribución de los datos según parámetros de interés, mientras que las técnicas de **regresión** cuantifican la relación entre una matriz de entrada y otra de salida a través de unos coeficientes. La finalidad de las técnicas de regresión es realizar una predicción de una cualidad de la muestra a partir de los datos obtenidos en las medidas.

Con los resultados de las diferentes tareas del procesado de datos se puede realizar una **validación** de todo el sistema para determinar si cumple con las especificaciones para las que se había diseñado o no. En caso negativo se modifican algunas de las etapas del sistema mediante un lazo de realimentación que permite el control y la optimización del sistema.

1.1 SELECCION DE DATOS

Cada vez que se realiza una medida se obtiene un dato por cada sensor, la manera de como se obtiene el dato puede variar en función de la naturaleza del sensor o de la muestra. En general se busca un estado estacionario de la medida y de aquí se obtiene el dato final, pero hay ocasiones en que la información útil puede encontrarse durante el transitorio, o incluso en ambos momentos (transitorio y estacionario), de forma que se pueda obtener más de un dato útil por cada medida. Por ejemplo, la **Figura 23** muestra la respuesta de un sensor resistivo de gas, inicialmente el gas no está presente y presenta una resistencia R_0 , con la incorporación súbita del gas la resistencia disminuye rápidamente (R_{min}) y posteriormente aumenta de forma lenta. En este caso el parámetro que más rápidamente se podría seleccionar de la medida es (R_0-R_{min}).

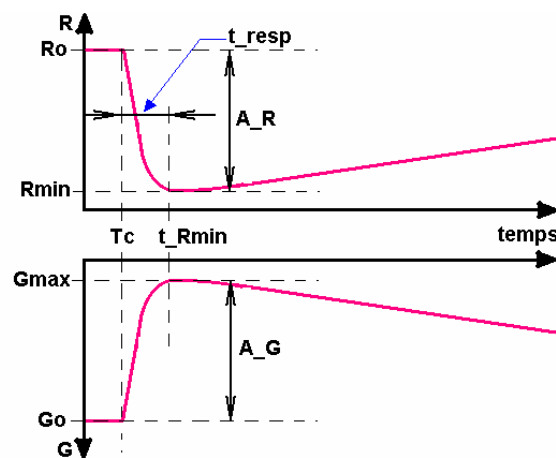


Figura 23. Selección de característica en transitorio

A las técnicas que permiten extraer la información útil de las medidas para así lograr los datos definitivos para realizar el análisis se les denomina técnicas de **Selección de Características**.

1.2 MATRIZ DE DATOS

Para realizar el procesado de datos se parte de una matriz bidimensional de datos, donde existen tantas columnas como sensores o parámetros se hayan establecido para realizar las medidas y tantas filas como medidas se hayan realizado para dichos sensores. Esta forma de trabajar hace que sea muy apropiado la aplicación de técnicas matemáticas matriciales, así como el uso de programas informáticos de cálculo matricial como el *MATLAB*⁹¹.

$$\text{Matriz de Datos} = \begin{bmatrix} R_{11} & R_{12} & \cdots & R_{1p} \\ & \ddots & & \\ & & R_{ij} & \\ & & & \ddots \\ R_{n1} & R_{n2} & \cdots & R_{np} \end{bmatrix} \quad \begin{array}{l} n = \text{número de sensores} \\ p = \text{número de medidas} \end{array}$$

En el lenguaje de procesado de datos denomina **característica** (*Feature*) a cada uno de los valores de matriz, y a cada fila de la matriz se denomina **vector característico**.

2 PREPROCESADO DE DATOS

En la mayoría de las ocasiones, antes de realizar un análisis de los datos con las distintas técnicas de procesado de datos, es necesario realizar una tarea previa de preprocesado de datos para así acondicionar los datos a la técnica de análisis de datos específica. Hay que tener presente que los sistemas de nariz y lengua electrónica suelen contar con sensores de naturaleza diversa, que generan medidas de magnitudes muy distintas, con valores positivos o negativos, por lo que deben sufrir algunas modificaciones para que todos los sensores tengan la influencia adecuada sobre el análisis final.

⁹¹ MATLAB es una marca registrada por *The MathWorks, Inc.*

Las técnicas de preprocesado de datos más utilizadas son: **centrado, estandarización y normalización.**

2.1 CENTRADO RESPECTO AL VALOR MEDIO

Las medidas de cada sensor se centran respecto a su valor medio, es decir se calcula el valor medio de los datos de cada sensor R_j y a cada dato del sensor R_{ij} se le resta ese valor. Esta técnica permite eliminar el valor de *offset* que no suele ser relevante en las medidas

$$\bar{R}_j = \frac{\sum_{i=1}^n R_{ij}}{n} \quad \bar{R}_{ij} = R_{ij} - \bar{R}_j$$

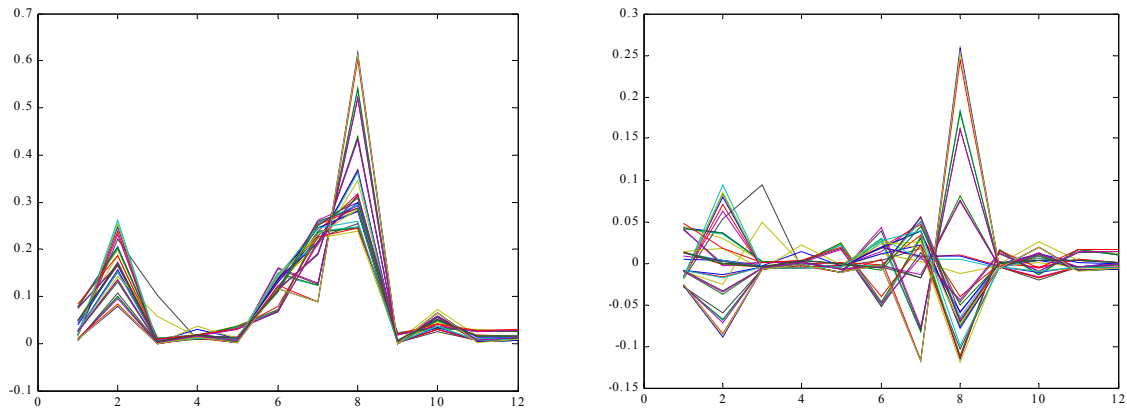


Figura 24. Datos originales y datos centrados respecto al valor medio.

2.2 ESTANDARIZACIÓN

Las medidas de cada sensor son divididas por el valor de la desviación estándar s_j

$$\hat{R}_{ij} = \frac{\bar{R}_{ij}}{s_j} \quad s_j = \left(\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{R}_{ij})^2 \right)^{0.5}$$

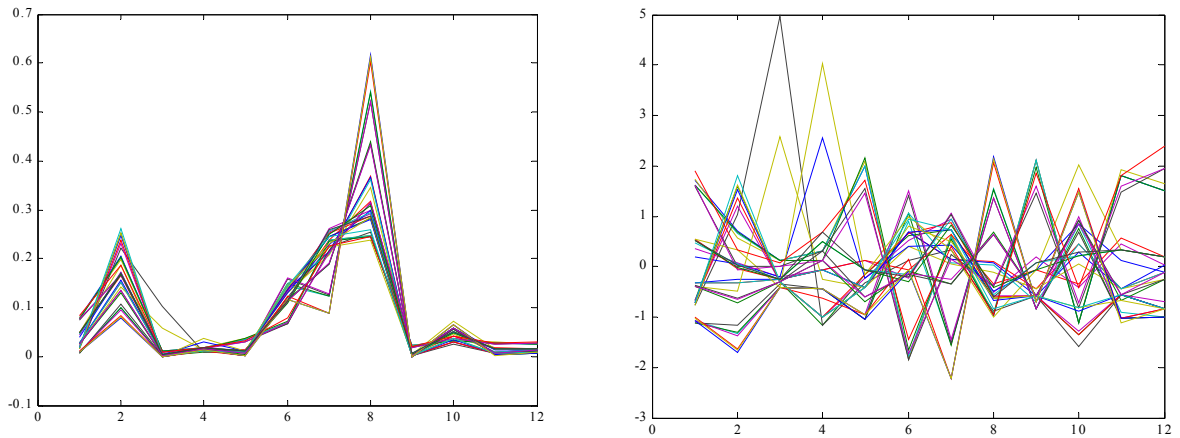


Figura 25. Datos originales y datos estandarizados

La estandarización da la misma importancia a todos los sensores, pero tiene el peligro de que señales que corresponden a ruido también sean incrementadas, con su correspondiente efecto negativo sobre el resultado final. En la **Figura 25** se comprueba que al estandarizar las medidas los sensores 3 y 4 poseen algunas medidas de valores elevados, posiblemente por efecto del ruido.

2.3 NORMALIZACIÓN DEL SENSOR

La normalización del sensor consiste en dividir los datos de cada sensor por su valor máximo. De esta forma el valor máximo de cada sensor será 1. Los efectos son parecidos a la estandarización

$$\bar{R}_{ij} = \frac{R_{ij}}{\max_i(R_{ij})}$$

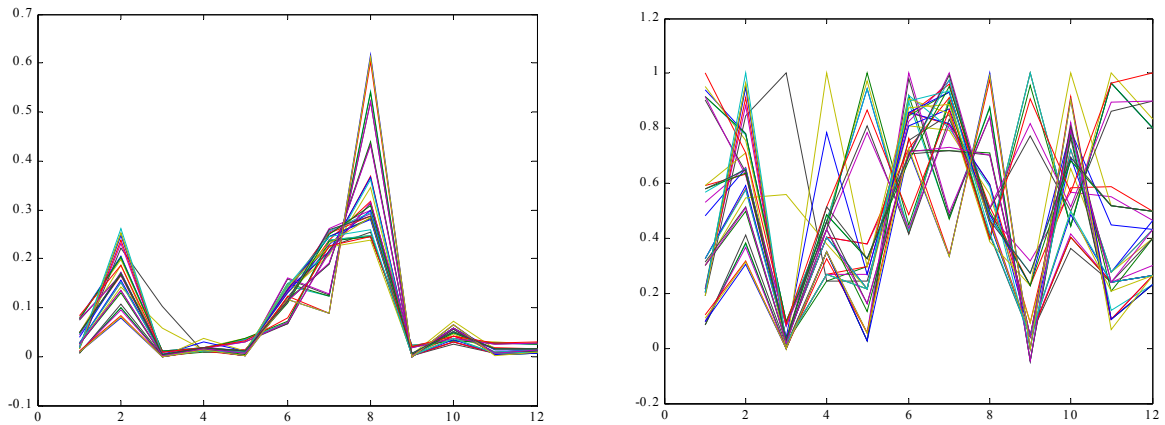


Figura 26. Datos Originales y Datos Normalizados de cada sensor

2.4 NORMALIZACIÓN DE LA MATRIZ

La normalización del sensor consiste en dividir los datos de toda la matriz por el valor máximo de la matriz. De esta forma el valor máximo será 1. Se produce un cambio de escala de la matriz. Las medidas se distribuyen en una hiperesfera de radio unidad.

$$\bar{R}_{ij} = \frac{R_{ij}}{\max(|R_{ij}|)}$$

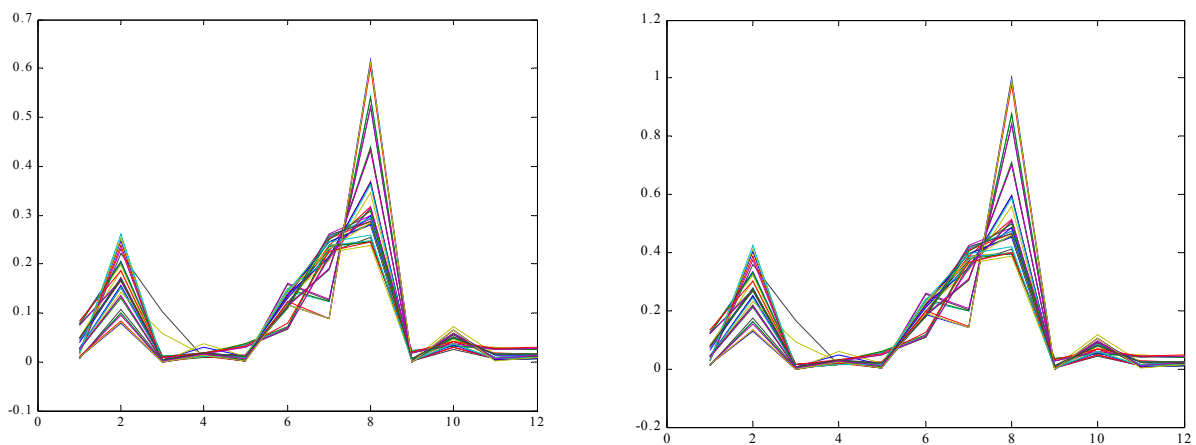


Figura 27. Datos originales y datos normalizados de la matriz

La utilización de una u otra técnica de preprocesado de señal depende de la técnica de procesado que se vaya a utilizar y de las características de los sensores y valores de sus medidas. En general, casi siempre se realiza un centrado respecto a cero y muchas veces una normalización de los sensores.

3 PROCESADO DE DATOS

El procesado de datos es el conjunto de técnicas que permiten obtener conclusiones de interés con los datos analizados. También se conoce como **reconocimiento de patrones** (*Pattern Recognition* - PARC).

3.1 TÉRMINOS UTILIZADOS EN EL ANÁLISIS DE DATOS

A lo largo del presente capítulo se emplean una serie de términos que caracterizan a las técnicas de reconocimiento de patrones, los más importantes son los siguientes:

3.1.1 Métodos paramétricos o no paramétricos,

Algunos métodos suponen que los datos para realizar el análisis tienen una distribución según una función conocida de probabilidad, normalmente distribución Gaussiana. A estos métodos se le denominan paramétricos, en caso contrario son métodos no paramétricos.

3.1.2 Métodos supervisados o no supervisados

En los métodos **supervisados** se fijan previamente los grupos que se desean obtener y se establece una regla para determinar cada medida a que grupo debe asociarse y en que grado se logra el éxito en la clasificación.

En la clasificación de datos **no supervisada** no se establece grupos previos de datos o cuantificación de las salidas, simplemente se comprueba si los datos, por si solos, establecen de forma natural afinidades o discrepancias entre si.

3.1.3 Métodos Lineales y No lineales

En los métodos de reconocimiento de patrones se establecen unos valores de salida que están relacionado con los originales de entrada por medio de unos coeficientes. Esta relación puede ser lineal o no lineal.

3.2 CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PROCESADO DE DATOS.

Las múltiples técnicas que se han desarrollado para realizar procesado de datos se pueden clasificar según los criterios marcados en el punto anterior. Una primera clasificación puede ser de **clasificación** y **regresión**, aunque algunas técnicas pueden servir ambos objetivos. Dentro de la clasificación se suelen distinguir entre métodos supervisados o no supervisados.

El método no supervisado más utilizado es el **Análisis de Componentes Principales** (PCA). Este método simplemente reduce la dimensionalidad de la matriz de información más que quede más compacta y es el usuario el que realiza la clasificación normalmente en función de los resultados gráficos.

Otras técnicas de clasificación no supervisada intentan encontrar similitudes en entre los datos de las muestras, que puede ser difícil de hallar en un ámbito de característica de alta dimensionalidad. Este tipo de técnicas se es suele denominar de agrupación (*Clustering*) El proceso de agrupación incluye tres pasos básicos: (1) definir una medida de la falta de similitud entre datos, al caso más típico es la distancia Euclidea, (2) definir criterios de agrupación para ser optimizado, el más utilizado se basa en una estructura de grupos y (3) definir un algoritmo de búsqueda para encontrar una asignación óptima de los ejemplos a los grupos. Las técnicas de agrupación más utilizadas en lenguas electrónicas son: **Agrupación Jerárquica** (*Hierarchical Clustering*), y **K-means**.

Entre las técnicas de clasificación supervisadas destacan el **Análisis de Función Discriminante** (DFA), las **redes neuronales artificiales** (ANN) en sus distintas modalidades, como **Perceptron Multicapa** (MLP), **Función de Base Radial** (RBF) y las de **Resonancia Adaptativa** (FuzzyART y FuzyARTMAP).

Las técnicas de regresión más utilizadas en estadística son la **Regresión Lineal simple y múltiple (MLR)**, **Regresión de Componentes Principales (PCR)**, también las redes neuronales MLP con las salidas apropiadas, y fundamentalmente la técnica PLS (*Partial Least Square*).

En la **Tabla 2** se muestra un cuadro sinóptico de las principales técnicas de procesamiento de datos:

	Nombre Original	Clasif/Regres	Supervis	Lineal
PCA	Principal Component Analysis	Clasif	No	Si
	Agrupación Jerárquica	Clasif	No	Si
k-NN	Nearst Neighbouring	Clasif	No	Si
k-Means		Clasif	No	Si
DFA	Discriminat Function Analysis	Clasif.	Si	Si
ANN	Artificial Neural Network	Clasif/Regre	Si	no
RBF	Radial Basic Function	Clasif	Si	no
MLR	Multiple Linear Regresion	Regres	Si	si
PCR	Principal Components Regresión	Regres	Si	Si
PLS	Partial Least Square	Regres	Si	Si
CA	Cluster Analysis	Clasif	No	si
FuzzyART	Adaptative Resonant Theory	Clasif	No.	No
FuzzyARTMAP	Adaptative Resonant Theory	Clasif	Si.	No

Tabla 2. Principales técnicas de reconocimiento de patrones

3.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica de análisis multivariante que consiste en encontrar nuevas direcciones ortogonales en el espacio de variables de forma que ofrezcan una información más compactada y cómoda para el usuario de la relación de las medidas entre si. Estas nuevas direcciones se denominan componentes principales (PC).

3.3.1 Objetivo PCA

Se supone que se tiene un objeto de tres dimensiones, por ejemplo el lápiz en la **Figura 28**, y se desea representarlo en dos dimensiones. Es evidente que la **proyección** del objeto sobre el plano H_1 es mucho más informativa que sobre H_2 , nos ofrece más información de la forma tridimensional del objeto, aunque la información que se obtenga no sea completa.

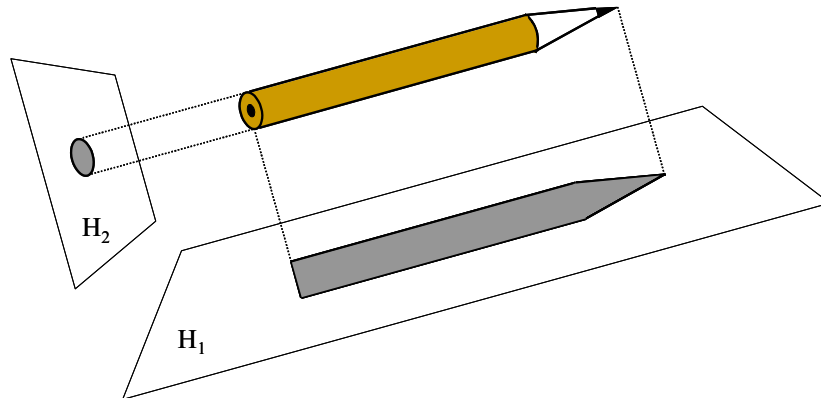


Figura 28. Significado geométrico del Análisis de Componentes Principales (PCA)

Bajo este planteamiento se desarrolló el llamado Análisis de Componentes Principales (*Principal Component Analysis*) PCA en 1981⁹² como respuesta a la creciente cantidad de datos que podían ser obtenidos en cada medida gracias a los nuevos instrumentos de laboratorio. Esta situación crea la saturación de información cuya consecuencia más probable es la incorrecta extracción de la información que es realmente relevante para la descripción del experimento.

La necesidad que surge con el nuevo instrumental de laboratorio es doble: necesidad de comprimir información y necesidad de extraer toda la información relevante del voluminoso conjunto de datos obtenido, ya que en muchas ocasiones la información esencial no depende de variables aisladas sino de la interrelación entre las mismas. El algoritmo PCA aborda estos problemas y por ese motivo es una de las técnicas más utilizadas por los químicos analíticos y por extensión, por todos aquellos investigadores que trabajan con narices y lenguas electrónicas, ya que permite reducir,

⁹² J.E. Jackson. *Principal component and factor analysis: Part 1-Principal components*. J. Qual. Tech (1981) vol. 13-1.

representar y extraer información relevante al mismo tiempo⁹³. En consecuencia, el análisis PCA realiza una reducción de la dimensionalidad de la matriz de datos que permite sacar conclusiones de la relación mediante una representación gráfica.

PCA es un método que asume colinealidad entre las variables que intervienen. Es decir, se trata de un algoritmo lineal que puede funcionar incorrectamente en procesos altamente no lineal como pueden ser las interacciones químicas entre sensores y disoluciones. De todas formas, este análisis funciona suficientemente bien en muchas aplicaciones con lenguas electrónicas en donde el comportamiento de los sensores no es excesivamente alineal.

La compresión de datos y extracción de información relevante se hace más necesaria en aquellas situaciones en las que existe una falta de selectividad en cada uno de los sensores que componen la lengua electrónica. Por este motivo el análisis de componentes principales es un método idóneo para explotar el concepto de sensibilidades que se aplica en la mayoría de las lenguas electrónicas.

3.3.2 Cálculo de PCA

El cálculo de PCA consiste en la transformación de un conjunto de variables $X_1 \dots X_p$ (a menudo fuertemente correlacionadas) en otras variables no correlacionadas entre sí: $Z_1 \dots Z_p$.

Las nuevas componentes $Z_1 \dots Z_p$ son combinaciones lineales de $X_1 \dots X_p$. La primera componente (Z_1) se determina de tal manera, que posea la máxima varianza, es decir que asuma la mayor información posible del conjunto de datos. Con el resto de la información, no asumida por Z_1 , se vuelve a realizar el proceso para lograr una segunda componente (Z_2) también con la mayor varianza residual posible, y este proceso se repite sucesivamente hasta obtener un número de nuevos parámetros igual a los iniciales pero cada vez con menor varianza representada. Cada nuevo parámetro es ortogonal respecto a los anteriores, es decir no están correlacionados. De todas formas la varianza total de los datos de partida se mantiene en los nuevos parámetros:

⁹³ J.W. Gardner. *Detection of vapours and odours from a multisensor array using pattern recognition. Part 1: principal components and cluster analysis*. Sensors and Actuators B, 4 (1991) 106-116.

$$\text{Var}[X_1] + \text{Var}[X_2] + \dots + \text{Var}[X_p] = \text{Var}[Z_1] + \text{Var}[Z_1] + \dots + \text{Var}[Z_p]$$

Como la información que aporta los últimos parámetros de Z es pequeña se puede considerar que a partir de un parámetro k , los últimos $p-k$ valores son tan pequeños que se puede hacer la aproximación:

$$\sum_{i=1}^p X_i = \sum_{i=1}^k Z_i$$

Para lograr un análisis con éxito, k deber ser mucho menor que p . Con este método de aproximación se realiza una proyección de p dimensiones en k dimensiones.

En la **Figura 29** se muestra gráficamente el Análisis PCA, donde se muestra los valores de las tres variables medidas (sensores 1, 2 y 3) como una colección de muestras en forma de puntos. Cuando se dibuja en tres dimensiones, aparenta que las muestras posan sobre un plano. Las muestras pueden incluirse dentro de una elipse. También aparenta que las muestras se extienden más a través de un eje de la elipse que a lo largo del otro. El primer Componente Principal (PC1) describe la dirección de la mayor variación en el conjunto de datos, que es el eje mayor de la elipse. El segundo Componente Principal (PC2) describe la dirección de la segunda mayor variación, que corresponde con el eje menor de la elipse. En este caso, el modelo PCA con dos componentes principales describe adecuadamente todas las variaciones en las medidas.

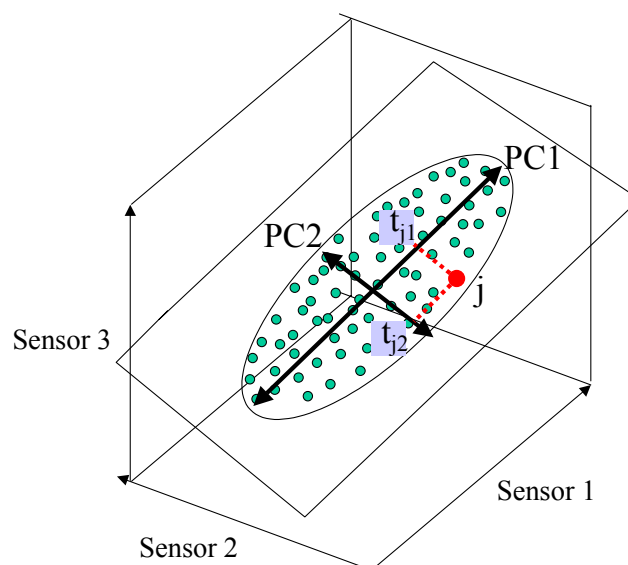


Figura 29. Representación gráfica del Análisis de Parámetros Principales

Los resultados de la PCA se expresan como parámetros de observación (*scores*) y los pesos de las variables (*loads*). Para lograr la interpretación de los resultados se expresan de forma gráfica de dos dimensiones (PC1 y PC2).

En la gráfica de las observaciones, se comprueba las posibles agrupaciones espontáneas de las medidas, de forma que puntos que se encuentran cerca entre si en el plano PC1-PC2 significa que poseen características comunes y si se encuentran alejados que son distintos. Pero la simple representación gráfica también puede llevar a engaños porque hay que tener presente cual es porcentaje de la información total asume cada uno de los parámetros, PC1 es siempre el máximo, luego las variaciones sobre el eje PC1 tendrán más significado que las variaciones sobre el eje PC2 u otro parámetro principal.

La gráfica de los pesos (*loads*), ofrece información sobre la relación del comportamiento de los sensores, de forma que si están cercanos sobre la gráfica significa que existe correlación entre ellos y ofrecen información similar, mientras que si están alejados la información es diferente. Los puntos de los *loads* de cada sensor suelen a tender a situarse alrededor del centro del eje de coordenadas formado por PC1-PC2. La posición de los puntos de dos sensores respecto al centro ofrece información significativa. Si se encuentran formando un ángulo pequeño respecto al centro significa que existe correlación y ofrecen similar información. Si forman un ángulo de unos 180°, significa que ambas variables poseen una correlación negativa, por lo que la información que ofrecen ambos sensores es contraria, es decir, cuando en los casos que uno de los sensores aumenta el otro disminuye viceversa y por último el caso de que los dos sensores formen un ángulo de unos 90° significa que los sensores ofrecen información ortogonal es decir que son independientes entre si, no existe correlación entre ellos. En la **Figura 30** se muestra un ejemplo de cada uno de los casos.

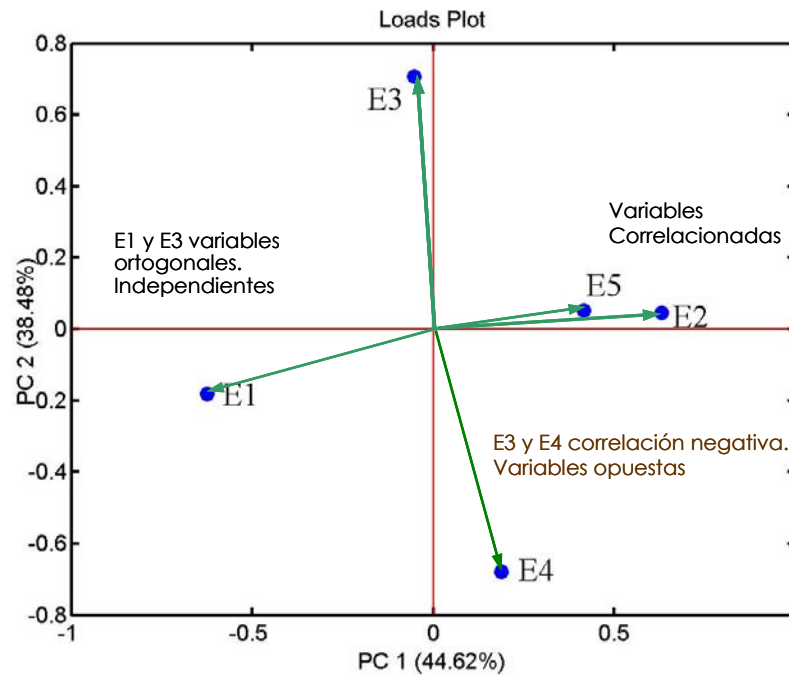


Figura 30. Gráfica de los pesos (*Loads*) de los sensores

Aunque en sentido estricto de proceso de datos el algoritmo PCA es una simple técnica de reducción de dimensiones, en la práctica se utiliza más bien como un método de clasificación de datos, porque en muchas ocasiones los resultados de los sistemas de narices y lengua electrónicas consisten en la representación bidimensionalmente de un conjunto de medidas para ver si se pueden determinar agrupaciones (“cluster”) espontáneas entre las diferentes medidas realizadas previamente.⁹⁴ De esta forma, el algoritmo PCA suele ser definido como un método de clasificación **no supervisado** y **no paramétrico** de reconocimiento de patrones.

3.4 AGRUPACIÓN JERÁRQUICA

Este algoritmo es capaz de generar una agrupación multinivel o taxonomía de ejemplos utilizando una estructura de árbol denominada dendrograma. Los dendogramas pueden construirse de forma ascendente o descendente, dando lugar a dos tipos de algoritmos: **aglomeración** y **división**, respectivamente.

⁹⁴ J. Jackson. *A user's guide to Principal Components*. John Wiley & Sons (1991) N.Y.

Los algoritmos de **aglomeración** construyen el dendrograma comenzando por las “hojas” del árbol, donde cada ejemplo forma un único grupo y procede hacia la raíz mediante la fusión secuencial de dos grupos “más cercanos”. Para realizar esta fusión de los grupos se aplican criterios de similitud de grupos, normalmente distancia mínima o máxima distancia entre ejemplos desde cada grupo. Distancia-mínima (*single-linkage*) favorece agrupaciones alargadas, mientras que máxima distancia (*complete-linkage*) genera grupos compactos⁹⁵.

Los algoritmos de agrupación por **división** proceden en sentido opuesto, construyendo el dendrograma desde la raíz, donde todos los ejemplos pertenecen a un solo grupo y se procede a una iteración donde de forma secuencial se desintegra el grupo inicial desprendiendo el “peor” dato hasta que cada grupo está formado únicamente por un dato. Para determinar el peor dato de una iteración el algoritmo debe intentar el desprendimiento de todos los datos y seleccionar aquel cuyos dos hijos poseen menor similitud. Esta tarea necesita una computación intensiva y por este motivo la agrupación por división ha recibido menor atención por parte de los investigadores, Sin embargo, este método suele producir mejores resultados que los métodos de aglomeración cuando el número de grupos es pequeño⁹⁶.

La aplicación de los dendrogramas es para determinar la similitud o distanciamiento de las distintas medidas según la proximidad en el árbol jerárquico.

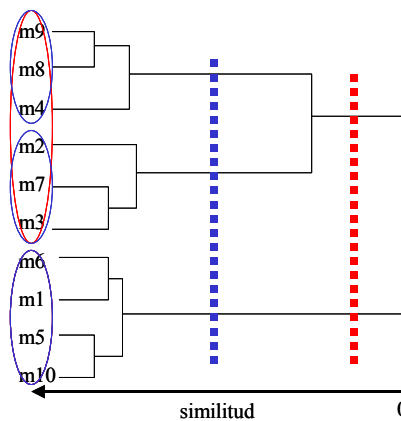


Figura 31. Dendrograma

⁹⁵ R. O. Duda, P.E. Hart, D.G. Stork. *Pattern Classification*, 2ª ed. New York: Wiley, 2000.

⁹⁶ B.D. Ripley, *Pattern Recognition and Neural Networks*. Cambridge U.K: Cambridge Univer. Press, 1996.

3.5 Clasificación Basada en Distancias

Es una clasificación supervisada donde los datos están repartidos en grupos. Para asociar un nuevo dato a un grupo u a otro se tiene en cuenta una relación de cercanía. La relación de cercanía se puede aplicar siguiendo diversos criterios:

3.5.1 K-means.

K-means es un algoritmo que realiza una partición del conjunto de los datos creando agrupaciones. Cada agrupación queda representado por su **valor medio** (*mean*)⁹⁷. Se comienza por una agrupación inicial (ej. una asignación aleatoria de los datos en grupos), y *K-means* computa de forma iterativa el valor medio de los datos de cada grupo y reasigna cada dato al grupo con el valor medio más cercano. Este procedimiento se repite hasta que la asignación de datos a grupos no cambia con nuevas iteraciones. Aunque la base del algoritmo *K-means* requiere de un número preestablecido de grupos, pueden emplearse procedimientos para determinar automáticamente un número apropiado de grupos⁹⁸. El algoritmo K-Means es mucho más eficiente que los métodos jerárquicos (los tiempos de cómputo requeridos son lineales con la cantidad documentos a agrupar⁹⁹, pero es dependiente de la selección inicial de centroides.

3.5.2 Vecino más Próximo (NN).

Actúa de forma similar al K-means pero el nuevo dato se asocia al grupo del dato que está más cercano a él.

3.5.3 k-Vecinos más Próximos (k- NN):

El nuevo dato se asocia al grupo que tiene más datos de entre los k datos más cercanos.

⁹⁷ J. McQueen, *Some methods for classification and analysis of multivariate observations*, 5-th Berkeley Symposium on mathematics, 1, S. (1967). 281-298.

⁹⁸ C.W. Therrien. *Decision, Estimation and Classification: An Introduction to Pattern Recognition and Related Topics*. New York: Wiley 1989.

⁹⁹ J. Han, M. Kamber, A. Tung, *Spatial clustering methods in data mining: A survey*. H. Miller and J. Han, editors, Taylor and Francis. (2001).

En la **Figura 32**. se muestra un ejemplo donde el nuevo dato y se asocia a un grupo distinto A , B ó C en función de la regla de clasificación utilizada. Con el método de la distancia mínima el nuevo elemento se asocia al grupo B , con el método del vecino más cercano al grupo A y con la regla k -NN, en este caso $k=7$ y se comprueba que de los 7 vecinos más próximos la mayoría (3) pertenecen al grupo C .

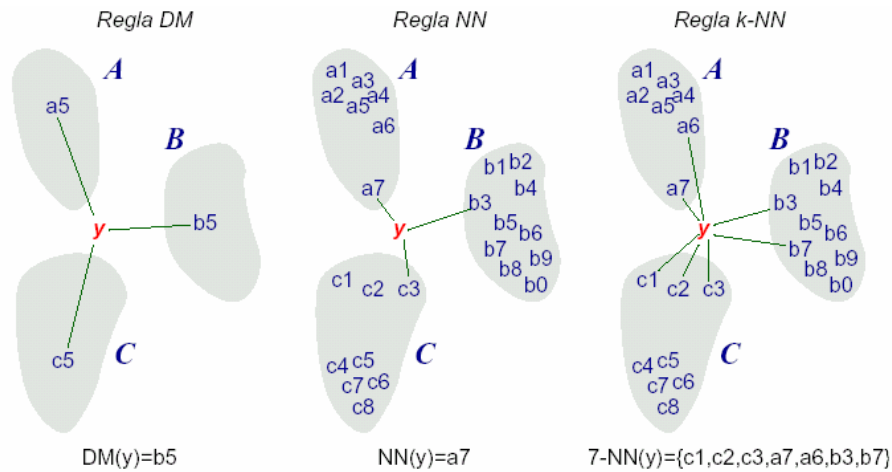


Figura 32. Distintos métodos de clasificación según distancias

3.6 Análisis de Función Discriminante (DFA)

El análisis de función discriminante es una técnica de reconocimiento de patrones que asume que los datos proceden de dos o más orígenes y que están distribuidos de forma multinormal. Se parte de una muestra de N datos en los que se ha medido p variables cuantitativas independientes, que son las que se utilizarán para tomar la decisión en cuanto al grupo en el que se clasifica cada sujeto, mediante el modelo matemático estimado a partir de los datos. DFA es un método lineal y supervisado.

Al igual que PCA, el DFA encuentra nuevos ejes ortogonales como una combinación lineal de las variables de entrada, pero con la diferencia de que computa los factores y minimiza la varianza dentro de cada clase, maximizando la varianza entre clases. El primer factor será la dimensión de mayor alcance, pero los factores posteriores pueden representar dimensiones significantes de diferenciación.

3.7 CLASIFICADORES CON REDES NEURONALES

Un método de clasificación de las medidas, muy utilizado en los sistemas de lenguas electrónicas son las llamadas redes neuronales artificiales. Estas redes comparan el resultado obtenido del análisis con una base de datos, para así decidir si corresponde con alguna de las clases conocidas o no. Las redes neuronales necesitan una etapa previa de entrenamiento, es decir deberán aprender la relación que existe entre las entradas y salidas y relacionarlas por medio de coeficientes o pesos, para intentar que con muestras similares se obtengan resultados similares.

El nombre de redes neuronales procede de la inspiración de los algoritmos en el funcionamiento de las neuronas biológicas y la conexión entre ellas. En efecto, las neuronas biológicas poseen una transmisión de señal desde las dentritas al axón pasando por el núcleo, la transmisión de esta información tiene características no lineales.

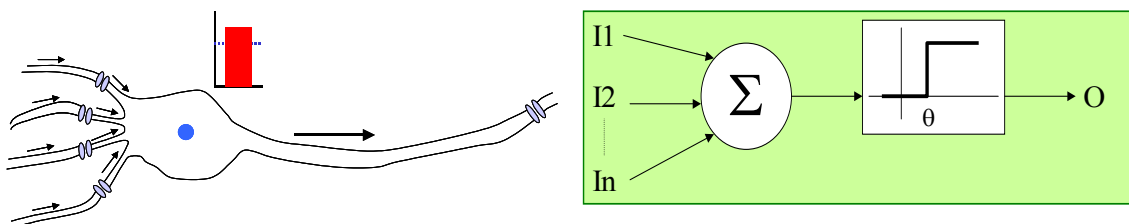


Figura 33. Similitud entre neurona biológica y artificial

Una neurona artificial está formada por una serie de n entradas que actúan de forma ponderada, según un determinado peso (w_i), sobre una función de transferencia. El tipo de neurona artificial más común es el *Perceptron*, donde el núcleo de neurona actúa como un sumatorio de las entradas (I), ponderadas según su peso (W), más una

componente de continua o umbral (θ). Es decir:
$$x = \sum_{i=1}^n W_i \cdot I_i + \theta$$

La salida se relaciona con respecto a x por medio de una función de transferencia. $O = F(x)$.

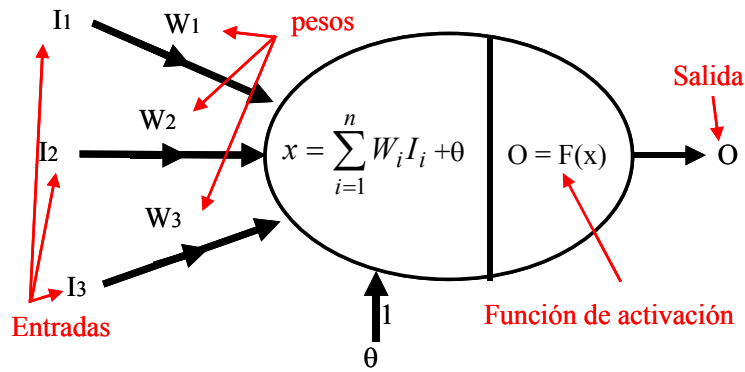


Figura 34. Estructura de Perceptron

La etapa de salida de función de activación de cada neurona determina el tipo de salida, que puede ser lineal (*purelin*), binaria (*hardlin*), sigmoideo de dos tipos (*tansig*) o (*logsig*).

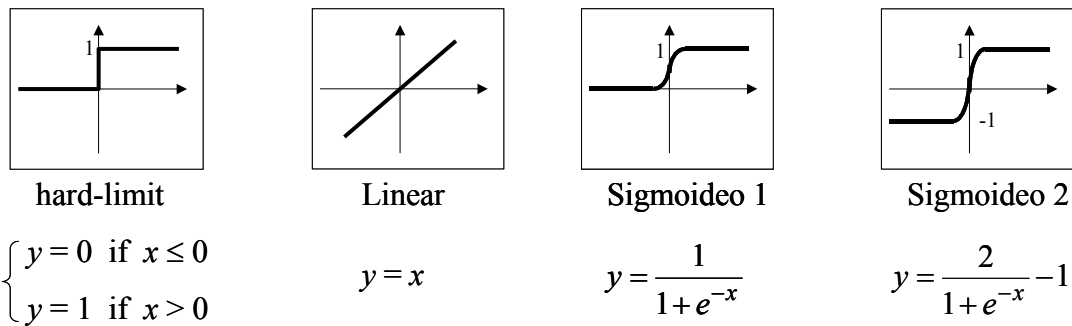


Figura 35. Tipos de funciones de activación de neuronas

El *Perceptron* necesita una etapa de entrenamiento para fijar el valor de los pesos de las entradas. Mediante una neurona aislada se puede solventar problemas de separación lineal (ej, si la función AND pero no la función OR exclusiva o XOR). Para resolver los problemas de separación no lineales es necesario un conjunto de neuronas denominado Perceptron Multicapa.

3.7.1 Perceptron Multicapa

Los *Perceptron* multicapa (*Multilayer Perceptron MLP*) son el tipo más popular de redes neuronales artificiales. Son redes formadas por neuronas que se conectan de forma similar a un circuito biológico neuronal formando capas, normalmente 2 o 3 capas.

Aunque la estructura más sencilla y habitual está formada por una capa de entrada (esta no contiene neuronas), otra capa de neuronas oculta y una capa de neuronas de salida.

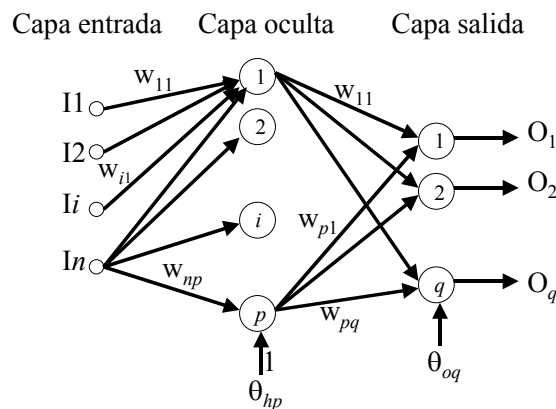


Figura 36. Red Neuronal Artificial

Para el funcionamiento de las redes neuronales es necesario realizar dos etapas, una primera de **entrenamiento**, donde se establece el valor de los pesos de cada entrada sobre las neuronas, y otra segunda de **verificación**, donde se utilizan valores de entradas nuevos y diferentes de los de entrenamiento y se comprueba si el sistema responde de forma similar al entrenamiento.

El algoritmo más utilizado para el entrenamiento de este tipo de redes es el denominado *Backpropagation*, también conocido como gradiente descendente.

Para realizar las tareas de entrenamiento y la verificación se utilizan diversos programas de análisis con redes neuronales, entre los que destaca el MATLAB (*Artificial Neural Network Toolbox*).

Las características generales de las MLP se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Las MLP permiten la construcción de modelos cualitativos y cuantitativos a partir de estructuras de datos de entrada-salida.
- El modelo es opaco por naturaleza. Es decir, durante la fase de entrenamiento, la información es codificada en forma distribuida por los pesos y umbrales de las neuronas que integran la red. Esto implica que es prácticamente imposible determinar el rol de una neurona de la capa oculta en la clasificación.

- El algoritmo de entrenamiento necesita una computación intensiva.
- Se requiere un alto número de iteraciones (epochs).
- El entrenamiento es complicado si el número de muestras por cada categoría es desigual.
- En general una red de dos capas es suficiente para resolver la mayoría de los problemas de olfato/ lengua electrónicos.
- No hay reglas para establecer el número de neuronas que deben constituir la capa oculta.
- Es propensa a un sobreentrenamiento de los datos.

3.7.2 Función de Base Radial (RBF),

Debido a las limitaciones de las redes MLP se han extendido el uso de otro tipo de redes neuronales como son las denominadas **Función de Base Radial** (RBF), que poseen una estructura similar a las redes MLP porque están formadas por una estructura conectivista, consistente en una capa oculta de *kernels* ó radiales y una capa de salida de neuronas lineales, pero se diferencian en que el mapa de entradas-salidas, y los algoritmos son claramente diferentes¹⁰⁰. En general, la arquitectura de las MLP es más complicada que las de RBF.

4 REGRESIÓN

Los problemas de regresión constituyen el mayor reto en el ámbito de los instrumentos de narices y lenguas electrónicas. El objetivo de la regresión es el establecimiento de un modelo predictivo a partir de un conjunto de variables independientes (respuestas de los sensores) a otro conjunto de variables dependientes continuas. Según sea la relación entre ambos conjuntos de variables existen diversos tipos de regresión.

¹⁰⁰ C. M. Bishop, *Neural Networks for Pattern Recognition*. New York: Oxford Univ. Press, 1995.

4.1 MEDIDAS DE DEPENDENCIA LINEAL

4.1.1 Diagramas de Dispersión

La representación gráfica más útil de dos variables continuas sin agrupar es el diagrama de dispersión, que se obtiene representando cada observación bidimensional (x_i, y_i) como un punto en el plano cartesiano. Este diagrama es especialmente útil para indicar si existe o no relación entre las variables.

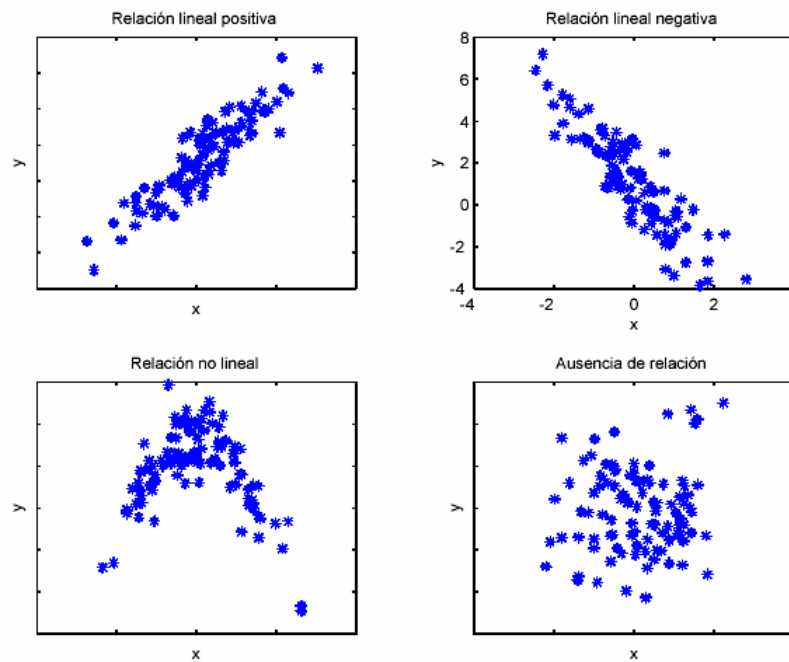


Figura 37. Distintos tipos de relación de variables

4.1.2 Covarianza

En el estudio conjunto de variables continuas interesa disponer de una medida descriptiva de la relación lineal entre cada par de variables. La medida más utilizada es la covarianza, definida por:

$$Cov(x, y) = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n}$$

donde el sumatorio está extendido a n parejas de valores (x, y) . Con valores medios de cada una de las variables x e y Una expresión equivalente de la covarianza es \bar{x} e \bar{y}

$$\text{Cov}(x, y) = \frac{\sum x_i y_i}{n} - \bar{x}\bar{y}$$

4.1.3 Correlación

El inconveniente de la covarianza como medida de asociación es su dependencia de las unidades de medida de las variables. Para construir una medida adimensional de la relación lineal entre dos variables hay que dividir la covarianza por el término que tenga sus mismas dimensiones. Galton¹⁰¹ propuso definir el coeficiente de correlación entre dos variables por:

$$r = \frac{\text{Cov}(x, y)}{s_x s_y}$$

donde s_x y s_y son las desviaciones típicas de x y de y .

El coeficiente de correlación es una medida resumen de la estructura de un diagrama de dispersión y que, en consecuencia, siempre conviene dibujar este diagrama que contiene toda la información.

4.1.4 Recta de Regresión

Cuando dos variables están relacionadas de forma lineal, los puntos tienden a agruparse en el diagrama de dispersión alrededor de una recta. Un procedimiento natural de expresar esta relación es mediante la recta que describe su evolución conjunta, denominada *recta de regresión*. Esta recta minimiza los errores de la variable y cuando se conoce la variable x .

$$h(x) = a + bx$$

donde a es la ordenada en el origen y b la pendiente, es decir el incremento de $h(x)$ si x aumenta una unidad. Los coeficientes a y b se determinan minimizando las

¹⁰¹ Francis Galton (1822-1911). Científico y explorador británico. Inventor de la regresión.

distancias verticales entre los puntos observados y_i , y las ordenadas previstas por la recta para dichos puntos, $a+bx$. El criterio es minimizar

$$\sum (y_i - a - bx_i)^2$$

resultando b: $b = \frac{Cov(x,y)}{s_x^2}$ Expresión que indica que la pendiente de la recta es

la covarianza estandarizada para que tenga unidades de y/x como corresponde a la pendiente.

4.1.5 Regresión Lineal Múltiple

En los casos de los puntos anteriores se ha considerado la relación entre dos variables, pero es muy común la necesidad mayor número de variables. En el caso general, el modelo de regresión lineal múltiple con p variables responde a la ecuación:

$$y_i = b_0 + b_1 \cdot x_{i1} + b_2 \cdot x_{i2} + \dots + b_p \cdot x_{ip} \text{ siendo } i = 1 \dots n$$

de modo que los coeficientes b_i se estiman siguiendo el criterio de mínimos cuadrados:

$$\min \sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 \cdot x_{i1} - b_2 \cdot x_{i2} - \dots - b_p \cdot x_{ip})^2$$

La obtención aquí de las expresiones de los estimadores mínimo cuadráticos de dichos coeficientes exigen reescribir la expresión (1) utilizando notación matricial. Así, (1) quedaría:

$$Y = X \cdot B + E$$

donde

$$Y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \dots \\ y_n \end{bmatrix} \quad X = \begin{bmatrix} 1 & X_{11} & X_{12} & \dots & X_{1p} \\ 1 & X_{21} & X_{22} & \dots & X_{2p} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 1 & X_{n1} & X_{n2} & \dots & X_{np} \end{bmatrix} \quad E = \begin{bmatrix} E_1 \\ E_2 \\ \dots \\ E_n \end{bmatrix}$$

De donde los estimadores mínimos cuadráticos se obtienen a partir de la ecuación

$$B = (X^T \cdot X)^{-1} \cdot X^T \cdot Y$$

y mantienen una interpretación análoga al caso de la regresión lineal simple

4.2 Regresión de Componentes Principales (PCR)

El método de Regresión de Componentes Principales (*Principal Components Regression*- PCR) consta de dos etapas. En la primera realiza una reducción de variables mediante un análisis de parámetros principales (PCA) y en la segunda se realiza la regresión inversa de estos parámetros principales (*scores*), en lugar de realizarla sobre los datos originales, de esta forma se evita problemas en la inversión de la matriz, $(X^T X)^{-1}$

4.3 REGRESIÓN PLS (Partial Least Square)

La regresión PLS es una técnica que generaliza y combina las características del análisis PCA y la regresión múltiple. El objetivo de PLS es predecir o analizar un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto de variables independientes u observables. La predicción se alcanza extrayendo de las variables observadas un conjunto de factores ortogonales denominados **variables latentes** que tienen el mejor poder predictivo de las variables dependientes.

La regresión PLS es particularmente útil cuando se necesita predecir un conjunto de variables dependientes a partir de un conjunto grande de variables independientes (predictores). Este algoritmo fue desarrollado por Herman Wold en 1966. En su origen se aplicó a las ciencias sociales fundamentalmente a la economía¹⁰², pero logró gran

¹⁰² H. Wold. *Estimation of principal components and related models by iterative least squares*. In P.R. Krishnaiah (Ed.). *Multivariate Analysis*. (1966) pp. 391-420. New York: Academic Press.

popularidad en la quimiometría debido en parte al hijo de Herman¹⁰³ y en la evaluación sensorial¹⁰⁴. Este algoritmo fue rápidamente acogido en el entorno estadístico^{105, 106}.

La principal diferencia con respecto a PCR es que procura que los componentes principales contengan la mayor información para la matriz de predicción \mathbf{Y} . Para ello, durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza la información contenida en la matriz de la propiedad a determinar (\mathbf{Y}), obteniéndose variables latentes que actúan como coeficientes¹⁰⁷. Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices \mathbf{X} e \mathbf{Y} se centran o autoescalan como en el caso de PCA. Cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de factores. La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los *scores* de los bloques \mathbf{X} e \mathbf{Y} .

4.3.1 Modelo Básico

Las I observaciones descritas por K variables dependientes se almacenan en una matriz denominada \mathbf{Y} ($I \times K$), los valores de los J predictores recogidos en esas I observaciones se recogen en la matriz \mathbf{X} ($I \times J$).

4.3.2 Objetivo de la Regresión PLS: Predecir \mathbf{Y} a Partir de \mathbf{X}

El objetivo de la regresión PLS es predecir \mathbf{Y} a partir de \mathbf{X} y describir la estructura común de ambas matrices. Cuando \mathbf{Y} es un vector y \mathbf{X} es un rango completo, este objetivo podría lograrse utilizando la técnica básica de estadística: **Regresión Múltiple Ordinaria**. Pero cuando el número de predictores es grande comparado con el número de observaciones, \mathbf{X} puede ser singular y el uso de regresión no puede ser factible debido a la multicolinealidad. Se han desarrollado diversas técnicas para resolver este problema. Una primera aproximación consiste en eliminar algunos de los predictores,

¹⁰³ S. Wold. *Personal memories of the early PLS development*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 58, (2001) 83–84.

¹⁰⁴ H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*. (1989). London: Wiley.

¹⁰⁵ A. Phatak, S. de Jong. (1997). *The geometry of partial least squares*. Journal of Chemometrics, 11, 311–338.

¹⁰⁶ M. Tenenhaus. (1998). *La régression PLS*. Paris: Technip.

¹⁰⁷ M. Porcel. Tesis Doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona. 2001.

otra aproximación es utilizar la **Regresión de Componentes Principales** (PCR) La ortogonalidad de los componentes principales elimina los problemas de multicolinealidad pero permanece el problema de elegir el subconjunto *óptimo* de predictores. Una posible estrategia es mantener solo unos pocos componentes, pero estos se eligen para expresar **X** más que para explicar **Y**, y por ello no garantiza que los componentes principales que explican **X** sean relevantes para **Y**.

En contraste, la regresión PLS encuentra los componentes de **X** que también son relevantes para **Y**. Concretamente, PLS busca un conjunto de componentes (**variables latentes**) que logren una descomposición simultánea de **X** e **Y** con la condición de que esos componentes expliquen tanto como sea posible la covarianza entre **X** e **Y**. Este paso generaliza el análisis PCA, porque es seguido por un paso de regresión donde la descomposición de **X** es utilizada para predecir **Y**.

4.3.3 Proceso de Cálculo de PLS

Antes de realizar la descomposición en factores, las matrices **X** e **Y** se centran o autoescalan como en el caso del PCA. Cada una de las matrices se descompone simultáneamente en una suma de *a* factores de forma que:

$$X = TP^T + E = \sum_{i=1}^a t_i p_i^T + E$$

$$Y = UQ^T + F = \sum_{i=1}^a u_i q_i^T + F$$

donde **T** es la matriz de *scores*, **P** la de *loadings* y **E** la matriz de residuales para la matriz de datos (matriz **X**); **U** es la matriz de *scores*, **Q** la matriz de *loadings* y **F** la matriz de residuales para la matriz de la propiedad a determinar (matriz **Y**). Si tenemos *m* muestras, *a* factores, *k* variables y *p* analitos, la dimensionalidad de la matriz es la siguiente: **T** y **U** (*m* x *a*), **P**^T (*a* x *k*) y **Q**^T (*a* x *p*). En este caso, los *loadings* no coinciden exactamente con la dirección de máxima variabilidad de las muestras como en el caso de PCA, ya que están corregidas para obtener la máxima capacidad para la matriz **Y**.

La descomposición de ambas matrices no es independiente, sino que se realiza de forma simultánea, estableciéndose una relación interna entre los *scores* de los bloques **X** e **Y** de forma que para cada componente *a*, se cumple que

$$\hat{\mathbf{u}}_a = \mathbf{b}_a \mathbf{t}_a$$

donde el símbolo $\hat{}$ indica que es un valor calculado (estimado) y \mathbf{b}_a es el coeficiente de regresión para cada uno de los componentes. A partir de aquí se calcula el valor de \mathbf{Y} utilizando la relación interna $\hat{\mathbf{u}}_a$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{T} \mathbf{B} \mathbf{Q}^T + \mathbf{F}$$

Donde \mathbf{B} es la matriz de los regresores b_a , de dimensiones $(a \times a)$, y \mathbf{F} la matriz de los residuos de \mathbf{Y} .

En el caso de calcular una sola propiedad de la matriz \mathbf{Y} el algoritmo recibe el nombre de PLS1 y se determina simultáneamente varias propiedades recibe el nombre de PLS2.

Una vez establecido el modelo de calibración se puede realizar la predicción de la propiedad modelada en un nuevo conjunto de muestras según la expresión:

$$y_i^T = \hat{b}_o^T + x_i^T \bar{B}$$

Siendo \mathbf{x}_i el vector que define la señal analítica de la muestra, \mathbf{y}_i el vector de concentraciones o propiedades a determinar, y \mathbf{b}_o^T un vector que permite realizar la predicción de una muestra sin necesidad de descomponerla en matrices *scores* y *loadings*.

5 VALIDACIÓN

En las secciones anteriores de este capítulo se ha realizado un repaso de algunas de las técnicas de reconocimiento de patrones que se suelen utilizar en las lenguas electrónicas. En el último punto de la cadena de procesos de datos, se plantean los criterios para la selección del modelo y la estimación del resultado.

Cuando se realiza una nueva aplicación se deben determinar, no solo cuál es el modelo apropiado entre una amplia variedad de algoritmos de proceso de datos, sino también establecer el modelo que logre el resultado óptimo. La validación de modelo se basa en su capacidad para predecir nuevos resultados. El modelo de predicción debe

tener la cualidad de aprovechar la fase de entrenamiento para extraer de los datos sólo su estructura fundamental y no fijarse en aspectos accidentales (por ejemplo el ruido) que den lugar a posteriores predicciones erróneas. Este hecho ocurre cuando el modelo es “sobre-entrenado” con los datos disponibles, con un número irrazonablemente grande de parámetros del modelo o por un exceso de iteraciones de entrenamiento. Encontrar un modelo de predicción que aproveche los datos de entrenamiento pero sin llegar a excederse es el objetivo de la validación.

Para evitar el sobreentrenamiento existen diversos métodos: el más inmediato es repartir los datos disponibles en datos para el entrenamiento y en datos para la validación. El conjunto de datos de entrenamiento se utiliza para enseñar a varios modelos con diferentes estructuras. El modelo de entrenamiento que logra la mejor validación de los datos es el seleccionado como modelo final. Esta técnica de validación sencilla es conocida como el método *holdout*. Aunque la técnica *holdout* funciona bien en muchas situaciones, posee dos inconvenientes. Primero, en problemas con número limitado de datos no es conveniente permitirse el lujo de desprenderse de un conjunto de datos para la validación. Segundo, siendo la técnica *holdout* un simple experimento de entrenamiento y validación, la estimación del resultado puede ser errónea si se realiza un desafortunado reparto de datos. Los defectos de este método pueden solucionarse a expensas de una adicional computación, por medio de múltiples particiones del conjunto de datos.

La validación cruzada *K-fold* es una técnica que realiza K particiones de los datos de forma que cada ejemplo es utilizado tanto para el entrenamiento como para la validación. En cada de los K repartos se utilizan N/K ejemplos para la validación y el resto $N(K-1)/K$ se utilizan para el entrenamiento, donde N es el número total de ejemplos. Por ejemplo, si se posee un total de 60 ejemplos ($N=60$) y se realizan 5 particiones ($K=5$) cada partición posee 12 elementos, el entrenamiento se realiza con los ejemplos de 4 particiones (48 ejemplos) y la validación con la partición restante (12 restantes). Posteriormente, se toma otra partición para la validación y las 4 restantes como entrenamiento y así sucesivamente hasta que todas las particiones hayan realizado la función de validación. En este caso se ha tenido una validación cruzada de orden 5. Cuando el número de grupos es igual al número de ejemplos ($K=N$), el método es conocido como validación cruzada de orden 1 (***Leave-one-out - LOO***).

La validación final de la red consiste en determinar primeramente la tasa de éxito de cada partición de validación respecto a sus correspondientes particiones de entrenamiento y posteriormente realizar un promedio de todas las tasas de éxito, para así obtener una tasa de éxito promedia.

El parámetro importante a determinar es el número óptimo de particiones (K). En general para un conjunto de datos grande, un valor pequeño de K ($\cong 3$) será suficiente. Para conjuntos de datos escasos, es preferible el uso de la validación cruzada de orden uno (LOO) para así obtener el mayor número de ejemplos posibles. Los contrastes de los recursos computacionales también pueden tenerse en consideración ya que el número de ejecuciones del programa se incrementará de forma considerable con el aumento de K.

6 PERSPECTIVAS DEL PROCESADO DE DATOS

Aunque las técnicas más apropiadas dependen de los tipos de sensores y de las aplicaciones, en general se pueden resumir las técnicas expuestas en este capítulo. Otras técnicas que no han sido expuestas en los puntos anteriores pero que presentan un futuro prometedor en los sistemas de narices y lenguas electrónicas son: **lógica difusa**, **técnicas adaptativas** y paradigmas cibernéticos biológicos.

La lógica difusa (*Fuzzy*) suele ser particularmente relevante en la imitación de la percepción organoléptica de los olores y sabores por parte de los seres humanos, se puede decir que es el objetivo último de una máquina de olfato o de gusto¹⁰⁸. La utilización de las técnicas *Fuzzy* han sido publicadas en la literatura de las narices electrónicas^{109,110}, incluyendo aproximaciones híbridas como *fuzzy C-means/RBFs*¹¹¹ y *fuzzy MLPs*^{112,113}. Las técnicas **adaptativas** han sido exploradas para el aprendizaje en

¹⁰⁸ L. A. Zadeh. *Fuzzy sets*. Inform. Contr, 8 (1965) 338-353.

¹⁰⁹ P. Wide, F. Winqvist, D. Driankov. *An air-quality sensor system with fuzzy classification*. Meas. Sci. Technol, 8 (1997) 138-146.

¹¹⁰ G. Bargagna, B. Lazzerini, A.C. Partridge. *Fuzzy logic classification of olive oils*. Electronic Noses and Olfaction 2000, J. Gardner, Eds. Bristol U.K: IOP, 2000.

¹¹¹ F. Marcelloni. *Recognition of olfactory signals based on supervised fuzzy C-means and k-NN algorithms*. Pattern Recognition. Lett. 22 (2001) 1007-1019.

¹¹² D. Vlachos, J. Avaritsiotis. *Fuzzy neural networks for gas sensing*. Sensors and Actuators A, 33 (1996) 77-82.

línea en entornos no estacionarios. La teoría de la resonancia adaptativa (ART) proporciona un mecanismo que resuelve la inhabilidad de la mayoría de los sistemas de aprendizaje para adaptarse a los cambios del entorno sin previo compromiso con los conocimientos adquiridos, es decir resolver el dilema estabilidad - plasticidad. Por esta razón, la familia de los algoritmos ART ha sido propuesta como un buen mecanismo para las narices electrónicas¹¹⁴. Como este tipo de análisis se ha utilizado en diversas experiencias a lo largo de la tesis doctoral, se expondrá con más detalle sus características en los puntos siguientes del presente capítulo.

Finalmente, es de destacar el estudio de los mecanismos de procesamiento de señal en los sistemas de olfato biológico constituye una prometedora dirección de futuros trabajos¹¹⁵. La riqueza de los modelos computacionales del sistema olfativo desarrollado por la cibernética biológica y la neurociencia computacional puede servir como punto de partida para imitar el proceso biológico del olfato y el gusto¹¹⁶.

7 REDES FUZZY ARTMAP

Las redes de tipo ARTMAP son una clase de redes neuronales que implementan un aprendizaje supervisado y una posterior clasificación de vectores multidimensionales de entrada en una serie de categorías de salida.

7.1 LIMITACIONES DE LAS REDES NEURONALES PERCEPTRON

Los sistemas de redes neuronales tradicionales (tipo *perceptron*) se han utilizado en múltiples ocasiones en los sistemas narices y lenguas electrónicas. Pero también se han constatado que tienen ciertas limitaciones, entre la que destaca la siguiente:

¹¹³ B. Yea, T. Osaki, K. Sugarhara, K. Rysuke. *The discrimination and concentration-estimation of inflammable gases with tree structured neurofuzzy algorithm*. In Proc. Int. Joint Conf. Neural Networks, (1998), 663-668.

¹¹⁴ E. Llobet, E.L. Hines, J.W. Gardner, P. Bartlett, T.T. Mottram. *Fuzzy ARTMAP based electronic nose data analysis*. Sensors and Actuators B, 6 (1999) 183-190.

¹¹⁵ T.C. Pearce. *Computational parallels between the biological olfactory pathway and its analogue The electronic nose: Part I. Biological olfaction*. Biosystems 4 (1997) 43-67.

¹¹⁶ Z. Li, J. Hertz. *Odor recognition and segmentation by model olfactory bulb and cortex*. Network: Comput. Neural Syst. 11 (2000) 83-102.

Cuando se entrena una red neuronal *perceptron* con unos determinados vectores de entrada que representan ciertas características del entorno y posteriormente este entorno va evolucionado con el tiempo, la red irá perdiendo precisión porque los pesos ya están fijados, es decir esta red no tiene **plasticidad**. Una posible solución es reentrenar la red para que aprenda con los nuevos vectores, pero la consecuencia directa es la pérdida de la información de los vectores antiguos, es decir la red no tiene **estabilidad**. Por lo tanto, existe un dilema de la estabilidad de una red frente a su plasticidad. Para solucionar el dilema hay que diseñar un sistema de aprendizaje que sea plástico o adaptativo en la respuesta a los sucesos significativos y que siga siendo estable frente a los sucesos irrelevantes. Es decir, preservar los conocimientos previos de interés mientras se continua aprendiendo conocimientos nuevos.

En respuesta al dilema expuesto se desarrolló la Teoría de la Resonancia Adaptativa (ART), que fue introducida por S. Grossberg¹¹⁷ como una teoría que intentaba emular la manera de procesar la información por el cerebro humano. Desde entonces, y con la colaboración de G. Carpenter, esta teoría ha evolucionado hacia una serie de algoritmos neuronales para el aprendizaje **no supervisado**. Estos algoritmos son capaces de crear clases estables ante la presentación de secuencias de entrada arbitrarias con un ritmo de aprendizaje rápido o lento. Dentro de estos algoritmos se puede destacar el ART1¹¹⁸ para **entradas binarias**.

7.2 Teoría de la Resonancia Adaptativa (ART)

La teoría de la resonancia adaptativa (ART) fue introducida como una teoría que intenta emular la manera de procesar la información por el cerebro humano.

Esta teoría ha evolucionado hacia una serie de algoritmos neuronales para el aprendizaje no supervisado. Estos algoritmos son capaces de crear clases estables ante la presentación de secuencias de entradas arbitrarias con un ritmo de aprendizaje rápido o lento. Dentro de estos algoritmos se puede destacar el ART1 y ART2.

¹¹⁷ S. Grossberg. *How does a brain build a cognitive code?* Psychological Review, 1 (1980) 1-51

¹¹⁸ G. A. Carpenter, S. Grossberg. *A massively parallel architecture for a self-organizing neural pattern recognition machine*, Computer vision, graphics, and image processing, 37 (1987) 54-115

ART1 es un algoritmo que solo trabaja con patrones de entrada binarios. ART2 es un algoritmo que trabaja con patrones de entrada analógicos.¹¹⁹ También se establecieron otros algoritmos como ART3¹²⁰.

7.2.1 Arquitectura de la Red ART

La red ART está formada básicamente por dos subsistemas, denominados de **atención** y **orientador**. El primero posee un aprendizaje competitivo que se encarga de reaccionar ante nuevas entradas y de aprenderlas en caso necesario. El subsistema orientador se encarga de distinguir entre entradas relevantes e irrelevantes, avisa al sistema de atención de cuando hay que aprender. Además existe un término de control que consiste en un sistema que lleva el control de los módulos que deben actuar y gobierna las señales entre los distintos módulos.

La arquitectura básica de la red ART1 se muestra en la **Figura 38**

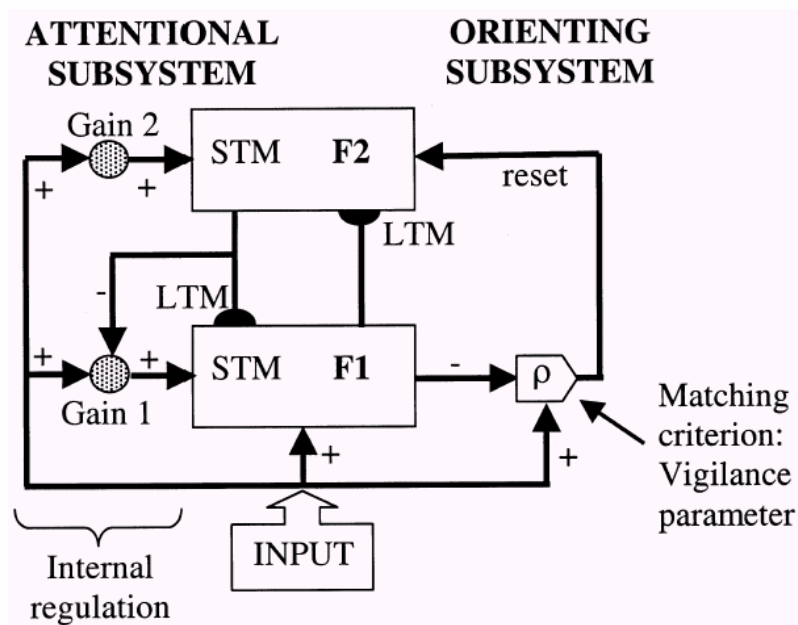


Figura 38. Arquitectura de una red ART

¹¹⁹ G.A. Carpenter, S. Gossberg. ART2: *Stable self-organization of pattern recognition codes for analog input patterns*. Applied Optics 26 (1987) 4919-4930.

¹²⁰ G.A. Carpenter, S. Gossberg. *ART3 hierarchical search: Chemical transmitters in self-organizing pattern recognition architectures*. International joint conference on neural networks. Washington DC. Eribaun Associates.

El sistema de **atención** está formado por dos capas de neuronas F1 y F2, formadas cada una de ellas por elementos de memoria de corto plazo (STM – *Short Term Memory*), que contiene los valores de activación de las neuronas. Entre ambas capas existen conexiones en un sentido (ascendente) como en otro (descendente). Estas conexiones se denominan filtros adaptativos y contienen las denominadas memorias de largo plazo (LTM – *Long Term Memory*), que determinan los pesos de las conexiones y estos suelen permanecer durante un largo tiempo. El subsistema de **orientación** genera una señal de reset a F2 cuando existe una diferencia grande entre los patrones ascendentes y descendentes en F1.

7.2.2 FUZZY ART

Fuzzy Art es una evolución del algoritmo ART1 en el que se utiliza la teoría de lógica difusa¹²¹. Para ello, se generaliza la función a vectores de entrada con valores analógicos comprendidas en el rango entre 0 y 1. Este cambio, con la ayuda de la codificación complementaria (“complement coding”), que preserva la información de amplitud a la vez que normaliza los vectores de entrada, permite implementar un algoritmo de clasificación no supervisada de gran rapidez de aprendizaje.

Su modo de funcionamiento es simple: cada vez que la red recibe un nuevo vector de entrada reacciona activando uno y solo uno de los nodos de salida. Cada uno de estos nodos representa una de las diferentes clases que se han creado con las entradas anteriores. En caso de que la medida no se parezca lo suficiente a ninguno de los nodos ya asignados se crea un nuevo nodo que representa una nueva clase cuyo primer miembro será este vector. El parámetro que determina si una nueva medida pertenece a una clase ya existente o hay que crear una clase nueva es el **parámetro de vigilancia** (ρ). El valor de este parámetro determina lo riguroso que debe ser el algoritmo a la hora de agrupar medidas. Un parámetro de vigilancia muy cercano a la unidad implica una clasificación muy exigente, de manera que dos medidas deben ser muy parecidas para ser agrupadas en una misma clase. Por el contrario, un parámetro cercano a cero permite la agrupación de medidas poco parecidas, lo que, como resultado, genera una

¹²¹ G.A. Carpenter, S. Gossberg, D. Rosen. *Fuzzy ART: Fast stable learning and categorization of analog patterns by an adaptive resonance system*. *Neural Networks*, 4 (1991) 759-771.

red con pocos nodos de salida, ya que el número de clases diferentes es reducido. Por su parte, el ritmo de aprendizaje queda controlado por el parámetro β , siendo su valor igual a la unidad para un aprendizaje rápido e igual a cero en caso de que no se deba aprender más.

7.2.3 ARTMAP

Las redes de tipo ARTMAP son una clase de redes neuronales formadas por estructuras de tipo ART que implementan un aprendizaje supervisado y una posterior clasificación de vectores multidimensionales de entrada en una serie de categorías de salida¹²².

7.2.4 FUZZY ARTMAP

La red Fuzzy Artmap¹²³ procede de la red Artmap con las mismas transformaciones que permiten definir la red Fuzzy Art a partir de la red ART1. Es decir, la red Fuzzy Artmap es una generalización a vectores analógicos (con componentes comprendidas entre cero y uno) de la red binaria Artmap.

La red Fuzzy Artmap presenta múltiples ventajas que la hacen muy interesante para las aplicaciones con narices electrónicas¹²⁴. De entre todas ellas cabe destacar las siguientes:

- **Aprendizaje rápido.** Las medidas que se presentan en entrenamiento necesitan muy poca carga computacional lo que permite programar el algoritmo en dispositivos programables de bajo coste y aplicar validaciones cruzadas de orden 1 y probar con diferentes combinaciones de parámetros.

- **Aprendizaje con un conjunto reducido de medidas de entrenamiento.** La red presenta una habilidad particular para aprender rápidamente eventos singulares, que

¹²² G.A. Carpenter, S. Gossberg, J. Reynolds. *Artmap: Supervised realtime learning and classification of nonstationary data by a self-organizing neural network*. Neural Networks, 4 (1991) 565-588

¹²³ G.A. Carpenter, S. Gossberg, N. Markuzon, J. Reynolds, D. Rosen. *Fuzzy Artmap: A Neural Network architecture for incremental supervised learning of analog multidimensional maps*. IEEE Transactions on neural networks. 3 (1992) 698-713

¹²⁴ E. Llobet, E. Hines J.W. Gardner, S. Franco. *Non-destructive banana ripeness determination using a neural network-based electronic nose*. Meas. Sci. Technol. 10 (1999) 538-548

aparecen muy pocas veces en el conjunto de entrenamiento. Por lo tanto, en dicho conjunto no es necesario que haya el mismo número de medidas de cada clase para que la red funcione correctamente.

- **Aprendizaje continuo** de nuevas características sin olvidar lo aprendido con anterioridad, algo muy útil para adaptarse a posibles derivas producidas por sensores.

En comparación con otros tipos de redes neuronales, la red Fuzzy Artmap determina automáticamente las neuronas de su capa oculta. Además, maximiza el poder de generalización aprendiendo al 100% el conjunto de entrenamiento.

Una vez entrenada, es posible extraer reglas de clasificación a partir de los pesos obtenidos tras el periodo de entrenamiento, lo que puede dar luz sobre los procesos internos y como influyen en la categorización de resultados.

Sin embargo, la implementación práctica de la red Fuzzy Artmap presenta un problema que debe ser tratado con sumo cuidado. Tal y como se ha comentado con anterioridad, la red aprende el 100% de las medidas del conjunto de entrenamiento sacrificando lo mínimo posible la generalización. Sin embargo, la presencia de medidas erróneas o “outlier” en el conjunto de medidas para el entrenamiento puede requerir un incremento del valor de vigilancia excesivo, lo cual perjudicará seriamente la capacidad de generalizar de la red.

Resumiendo, la red *Fuzzy Artmap* es una red de clasificación con aprendizaje supervisado. En una fase de entrenamiento la red necesita que se le suministre un conjunto de medidas. Cada medida debe contener un vector de entrada, que detalla los parámetros medidos en cada experiencia, y un vector de salida que codifica la categoría que se le debe asignar. Posteriormente, en la fase de evaluación sólo se suministra el vector de entrada y la red clasifica dicha medida siguiendo los criterios que ha aprendido en la fase de entrenamiento.

7.2.4.1 Algoritmo

Básicamente, una red *Fuzzy Artmap* está formada por dos redes *Fuzzy Art* conectadas entre sí (*Art A* y *Art B*) por una memoria asociativa “*mapfield*”. En la fase de entrenamiento, a la red **Art B** le llega los vectores que codifican la categoría correcta de

cada medida del conjunto de entrenamiento (C), por lo tanto la red *ArtB* tendrá tantos nodos de salida como grupos se desea realizar. A la red *Art A* le llegan los vectores de entrada a clasificar (V), por lo tanto esta red tendrá tantos nodos de salida como agrupaciones se hayan realizado. La **Figura 39** esquematiza este concepto.

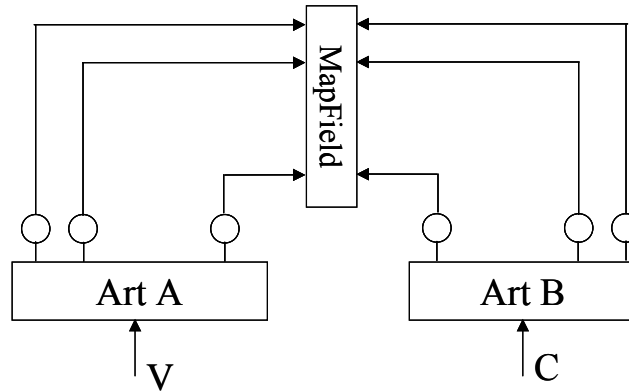


Figura 39. Esquema general de una red Fuzzy Artmap

Inicialmente, se suele dar a la red *ArtB* un vector de vigilancia igual a la unidad ($\rho=1$), que determina criterios de clasificación muy exigente, ya que medidas que deban ser clasificadas conjuntamente enviarán a la red B codificaciones idénticas. Además, cualquier vector de codificación diferente, por parecido que sea el resto, debe ser detectado y debe activar en la red *ArtB* una neurona de salida diferente a la del grupo anterior. En la red *ArtA* el vector de vigilancia es cero, permitiendo agrupaciones de medidas poco o nada parecidas.

Cada vez que se suministra una medida de entrenamiento, la red *ArtA* activa uno de sus nodos y la red *ArtB* activa otro de los suyos. El mapa que las une aprende a relacionar nodos activados. De esta forma, a cada nuevo nodo que se activa en la red *ArtA* se le asocia un nodo en *ArtB*. Cabe destacar que los nodos *ArtB* normalmente serán imagen de varios nodos *ArtA* (cada categoría contiene varias medidas), mientras que cada una de las categorías creadas en A solo tendrán una imagen en B (cada medida solo puede pertenecer a una categoría).

Cuando una nueva medida activa un nodo en *ArtA* ya existente, se comprueba si la imagen de ese nodo asignada por el “*mapfield*” coincide con el nodo que se ha activado en *ArtB* paralelamente. En el caso de que no coincidan, se incrementa el valor del

parámetro de vigilancia hasta que la neurona que se active en *ArtA* tenga por imagen la neurona activada en *ArtB*. Si no se encuentra ninguna se creará una nueva y el mapa le asignará como imagen el nodo *ArtB* activado.

En definitiva, el valor de vigilancia en *ArtA* solamente se incrementa lo estrictamente necesario para que la red *ArtA* separe en nodos diferentes las medidas que deben estar clasificadas en diferentes categorías. Suponiendo un parámetro de aprendizaje igual a la unidad para ambas redes se puede demostrar que este algoritmo aprende a clasificar correctamente el 100% de los vectores de entrenamiento. Además, ese aprendizaje es rápido y estable.

7.2.5 Implementación

El paquete informático MATLAB no posee un toolbox específico dedicado a las redes Fuzzy Art y Fuzzy Artmap. Pero como MATLAB trabaja en código abierto es posible crear macros, que partiendo de funciones básicas, y enlazándolas entre si en una función con bucle principal se obtengan funciones más complejas que ejecuten las funciones deseadas.

El grupo de investigación MINOS del Departament d'Enginyeria Electrònica, Elèctrica i Automàtica de la Universitat Rovira i Virgili de Tarragona ha desarrollado una serie de funciones, a modo de un nuevo *toolbox* de MATLAB, que implementan las redes Fuzzy Art y Fuzzy Artmap¹²⁵. Como la red Fuzzy Artamp está formada por dos redes Fuzzy Art, sus funciones principales incluyen llamadas a la función Fuzzy Art que se ha implementado con anterioridad. Estas funciones han sido aprovechadas para los cálculos de la presente tesis doctoral.

En la programación del algoritmo Fuzzy Artmap se ha distinguido entre la función de entrenamiento (en la que a partir de unas medidas de entrada y sus salidas correspondientes se calculan los pesos) y una evaluación (en la que a partir de una medidas de entrada y los pesos se devuelven las clases a las que pertenecen según la red entrenada previamente).

¹²⁵ J. Brezmes, P. Margalef, E. Llobet, X. Vilanova, X. Correig. *Evaluation of there modified Fuzzy ARTmap algorithms to be used by an electronic nose*. 9th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose ISOEN'02 Roma.

Para inmunizar a la red ante la presencia de *outliers* en el conjunto de entrenamiento se han implementado diferentes versiones que modifican ligeramente el algoritmo original. La modificación que ha dado mejores resultados prácticos consiste en modificar el algoritmo original sólo en la etapa de evaluación. En dicha fase el algoritmo modificado ignora el factor de vigilancia alcanzado en la fase de entrenamiento y busca, de forma iterativa, el valor más elevado que permita clasificar la nueva medida en alguna de las categorías existentes.

Capítulo 4. Desarrollo de las Lenguas Electrónicas

Las lenguas electrónicas se han desarrollado gracias al empuje y al trabajo de diversos grupos de investigación, asociados fundamentalmente a universidades, pero también a algunas empresas que han participado en su desarrollo. Cada grupo suele utilizar, de forma preferente, algún método de adquisición de señal para la mayoría de sus experiencias y aplican diversos métodos de análisis multivariante a sus resultados para obtener conclusiones.

A lo largo de este capítulo se presenta el desarrollo histórico de las lenguas electrónicas, presentadas según el método de adquisición de la señal y por el grupo de investigación que más la utiliza. Dado la novedad del tema, se ha intentado realizar este capítulo con suficiente extensión y detalle.

Los métodos de captación de los sensores más utilizados en lenguas electrónicas son la potenciometría y la voltametría, por este motivo este motivo se inicia el capítulo según este criterio.

1 LENGUAS ELECTRÓNICAS UTILIZANDO TÉCNICAS POTENCIOMÉTRICAS

La técnica potenciométrica es la forma más inmediata y sencilla de realizar medidas con muestras de naturaleza líquida. Las investigaciones en este campo se encaminan fundamentalmente en la búsqueda de elementos transductores para los electrodos que cumplan los requisitos de precisión y resolución¹²⁶. Los elementos más utilizados en los electrodos potenciométricos son: membranas de polímeros, vidrios, metales, etc. En los

¹²⁶ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov. *Electronic Tongues: Sensors, Systems, Applications*. Sensors Update, 10 (2002) 143-188.

siguientes puntos se presentan las investigaciones más relevantes de estos elementos transductores en sistemas de las lenguas electrónicas.

1.1 LENGUAS ELECTRÓNICAS CON SENSORES DE POLÍMERO-LÍPIDO

El origen de las lenguas electrónicas se puede considerar como una extensión de los denominados **sensores de sabor**. Estos sensores están formados por electrodos compuestos por diversos tipos de membranas que son capaces de transformar la información bioquímica de las sustancias alimenticias en señales. La salida de los sensores responde a diferentes patrones según las sustancias químicas responsables de los distintos sabores, tal como salado o amargo, mientras que muestra un patrón similar para sustancias químicas con sabores similares.

Las primeras investigaciones trataron de buscar un auténtico sensor de sabor, es decir un sistema que permita la clasificación las sensaciones de los diferentes sabores y los resultados compararlos con los de paneles humanos de análisis organolépticos de alimentos, En cambio, la lengua electrónica clasifica las muestras según una cualidad de los alimentos y de otros medios líquidos, tanto potables como no potables (ej. Aguas residuales). Los resultados de la clasificación no son necesariamente comparables con sensaciones humanas, pero sí con otras propiedades de calidad de la muestra.¹²⁷

Los sensores sabor fueron desarrollados fundamentalmente por Kiyoshi Toko y colaboradores del Departamento de Ingeniería de Dispositivos Electrónicos de la Universidad Kyushu, Fukuaka (Japón). Este grupo fue pionero en este tipo de investigación, utilizando electrodos potenciométricos que simularan al sentido del gusto humano.

De forma similar a la naturaleza del color, donde se parte de tres colores básicos: rojo, verde y azul y el resto de los colores es una combinación de los tres en distintas

¹²⁷ F. Winqvist, C. Krantz-Rülker, I. Lunström I. *Electronic Tongues and Combinations of Artificial Senses*. Sensors Update, 11 (2002) 279-306 Ed. Wiley.

proporciones; el sabor se considera que está formado por la combinación de cinco sabores básicos¹²⁸ y el resto de los sabores es una combinación de los sabores básicos.

- El primero sabor básico es el **ácido** producido por iones de hidrógeno de HCl, ácido acético, ácido cítrico, etc.
- El segundo es el **salado** producido principalmente por NaCl.
- El tercero es **amargo** producido por la quinina, cafeína, MgCl₂, etc
- El cuarto es el **dulce** debido a la sacarosa, glucosa, aspartame, etc.

El último es el **umami**, que es el término japonés para definir la “*exquisitez*”. Este sabor aparece en el glutamato monosódico (MSG) que es el contenido principalmente de las algas, el inosinato bisódico (IMP) en la carne y pescado y guanilato bisódico (GMP) en las setas.

En los receptores biológicos de sabor, las sustancias son recogidas por la membrana biológica de las papilas gustativas que emergen de la lengua. La información del sabor es transmitida por medio del sistema nervioso al cerebro, donde el sabor es percibido y puede que reconocido.

1.1.1 Sistema de Medida

Diversos estudios previos¹²⁹ demostraron que las membranas de lípidos tienen la capacidad de detectar el sabor respondiendo a sustancias generadoras de sabor, es decir las membranas de lípidos son materiales útiles para transformar el sabor en una señal eléctrica.

Los primeros resultados sobre sensores de sabor se publicaron en 1990 cuando se construyó un sensor de sabor multicanal cuyos transductores estaban compuestos por membranas de lípidos ion sensible¹³⁰ que se desarrolló para responder a los sabores básicos de la lengua humana.

¹²⁸ K. Toko. *Taste sensor with global selectivity*. Materials Science and Engineering C, 4 (1996) 69-82.

¹²⁹ K. Toko. *Growth and electric current loops in plats*. Biophysical Chemistry, 33 (1989) 161-176.

¹³⁰ K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko, S. Yamanfuji. *Multichanel taste sensor using lipid membranes*. Sensors and Actuators, B2 (1990) 205-213.

El sistema de medida básico está formado por ocho electrodos, cada uno de ellos con una membrana de un lípido ion-sensitivo. Cinco de los sensores actúan sobre los sabores básicos mientras que los otros tres sobre una combinación de ellos. Las membranas están compuestas por una película de un espesor de 200 micras y se inmovilizan con polímeros. Cada electrodo contiene un hilo de Ag/AgCl incluido dentro de una disolución de KCl 100 mM con la membrana de cara a la solución a analizar. Un esquema del sistema de electrodo multicanal se muestra en la **Figura 40**, donde también se indican los tipos de lípidos utilizados en la construcción de las ocho membranas. El fundamento de este sistema de medida es que los cationes incrementan el potencial de las membranas cargadas negativamente, mientras que los aniones decremantan las membranas cargadas positivamente.

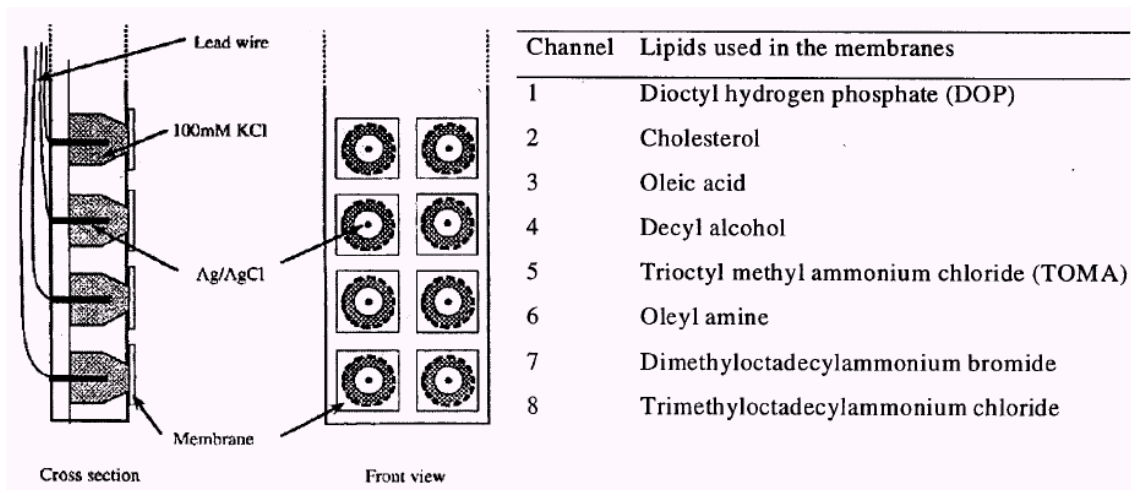


Figura 40. Multielectrodo con ocho membranas lípido/polimeros

Las medidas se realizaron entre un electrodo y el electrodo de referencia de Ag/ClAg. El conjunto de electrodos se conectó a un escáner formado por amplificadores de alta impedancia de entrada. En la **Figura 41** se muestra un esquema del sistema de medida.

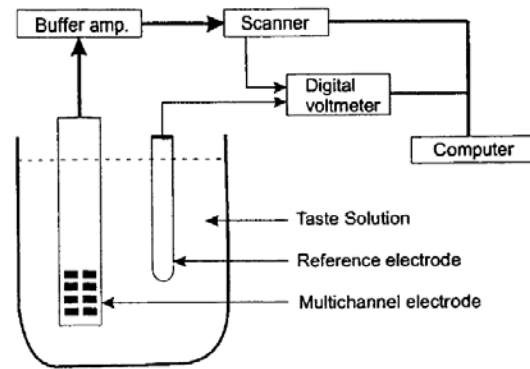


Figura 41. Sistema de medida para multielectrodo de ocho canales

Este sistema multicanal se está comercializando¹³¹ por la empresa *Anritsu Corp.* El elemento sensor está formado por el multisensor de ocho canales, colocado en un brazo de robot y controlado por un ordenador. Las muestras a analizar se colocan en soporte junto a una disolución de limpieza además de la disolución de referencia. Las medidas se realizan en orden especial: primero se limpia el multisensor sumergiendo en la disolución de limpieza, después se introduce en la disolución muestra a analizar, repitiendo el ciclo. Cada cierto intervalo, el multisensor se coloca en la disolución de referencia para realizar una calibración. En la **Figura 42** se muestra el sistema de medida SA402 de *Anritsu Corp.*

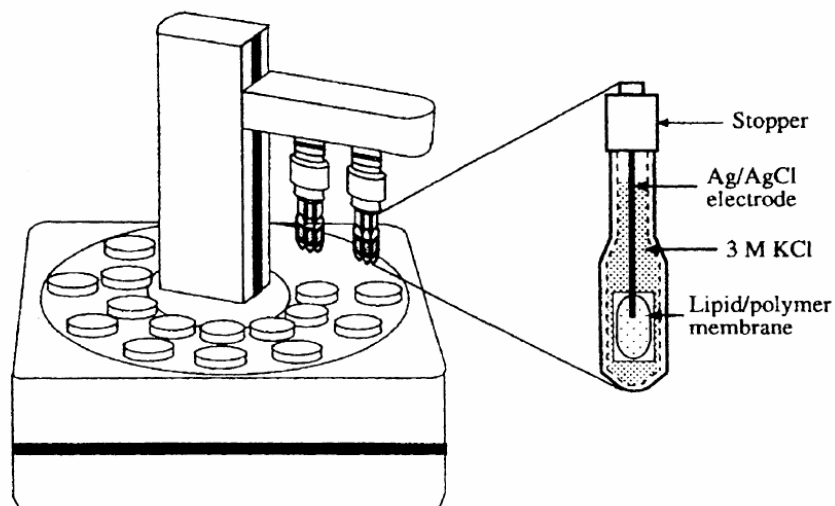


Figura 42. Sistema de media SA402 de Anritsu Corp

¹³¹ Taste Sensing System SA401, Anritsu Corp., Japón

En un sistema de medida más miniaturizado, que se encuentra en fase de experimentación, utiliza transistores FET a los que se aplican una membrana de lípido en la puerta. La medida consiste en la tensión fuente-puerta, manteniendo la corriente de drenador-fuente constante¹³².

1.1.2 Experiencias

Este sensor de sabor ha sido utilizado para estudiar la respuesta de los cinco sabores básicos típicos, HCl (ácido), NaCl (salado), quinina (amargo), sacarosa (dulce), y glutamato monosódico (umami). La mejor respuesta se obtuvo para los componentes amargos y ácidos, después para umami y salados, y para la sacarosa casi no hubo respuesta. Para otras sustancias de sabor dulce, tal como los aminoácidos glicina y alanina, se obtuvo una respuesta mayor. Se demostró que con sustancias de características similares, en el caso de sustancias ácidas: HCl, ácido acético, ácido cítrico, o en sustancias saladas como NaCl, KCl y KBr mostraban patrones de respuesta similar a los patrones. En cambio el sistema no respondía bien a sustancias no electrolíticas, ya que tienen poco efecto en el potencial de la membrana¹³³.

La sensibilidad del sensor a las sustancias ácidas y saladas es de unos 50-60 mV/pX. Estos valores corresponden a los valores típicos para los electrodos ion-selectivo ISE y se puede explicar por la sensibilidad al pH, cationes alcalinos y aniones halógenos. La sensibilidad del glutamato se comprobó que era de 13 mV/pX.

Se ha investigado la sensibilidad del dispositivo a sustancias astringentes y picantes¹³⁴ concluyendo que no se encontró sensibilidad a las sustancias picantes y sin embargo, el sensor de sabor muestra una respuesta a las sustancias astringentes. El área de la astringencia se localizó entre amargo y ácido en la figura del primer parámetro principal del sabor de las sustancias.

Este sistema sensor de sabor se ha utilizado en otras aplicaciones diferentes. Las experiencias tratan de discriminar y estimar el sabor de diferentes bebidas. En una de las

¹³² K. Toko. *Taste sensor*. Sensors and Actuators B, 64 (2000) 205-215.

¹³³ K. Toko. *Biomimetic Sensor Technology*. Cambridge University Press (2000).

¹³⁴ S. Iiyama, K. Toko, T. Matsuno, K. Yamafuji. *Study of astringency and pungency with multichannel taste sensor made of lipid membranes*, Sensors and Actuators B, 24 (1995) 75-79.

experiencias más conocidas se estudiaron 33 tipos diferentes de cervezas¹³⁵. Las muestras se analizaron por el sistema de sensores y por un grupo de panelistas sensoriales. Los panelistas expresaron el sabor de las diferentes cervezas en los parámetros áspero frente suave y fuerte frente a ligero. El patrón de salida del sensor de sabor se analizó utilizando Análisis de Componentes Principales (PCA). Una interesante observación fue que el primer componente principal (PC1) correspondía bien al parámetro fuerte frente a ligero, y el segundo componente principal (PC2) correspondía bien con el parámetro áspero frente suave del sabor.



Figura 43. Análisis PCA con una clasificación de 33 tipos de cervezas

Las experiencias siguieron con el estudio de aguas minerales. Una buena correlación de la respuesta del sensor a la dureza del agua se podía observar en las gráficas de PCA, y también el sensor podía discriminar entre diferentes tipo de aguas. Otras aplicaciones del sistema fueron la monitorización del proceso de fermentación de la pasta de soja¹³⁶, la estimación del sabor de la leche¹³⁷, café¹³⁸, tomates, vino¹³⁹ y en el

¹³⁵ K. Toko. *Electronic tongue*. Biosensors and Bioelectronics, 13 (1998) 701-709.

¹³⁶ T. Imamura, K. Toko, S. Yanagisawa, T. Kume, *Monitoring of fermentation process of miso (soybean paste) using multichanel taste sensor*. Sensors and Actuators B, 37 (1996) 179-185

desarrollo de un sistema de monitorización para determinar la calidad del agua de ríos^{140,141}. En todos estos trabajos, la presentación de los resultados se realiza directamente con la respuesta de los electrodos a lo largo del tiempo o limitándose con análisis multivariante de PCA, no desarrollando análisis complejos ni redes neuronales.

En trabajos más recientes se han desarrollado sistemas para detectar y discriminar los sabores picante y amargo, que son los más difíciles de detectar cuando se utiliza los métodos electroquímicos aplicados con anterioridad, debido a que poseen un fuerte grupo hidrofóbico. Para ello, se ha incorporado un sensor controlado por polaridad de superficie¹⁴² que es un método de espectroscopia de impedancias donde el sabor de las sustancias afecta a la impedancia electroquímica por la absorción en la superficie del electrodo. Dependiendo de la impedancia del electrodo se obtienen diferentes patrones para las cinco sustancias de sabor básico con diferentes cualidades de sabor.

A partir del electrodo original con membranas de lípidos, otros grupos de investigación han desarrollado diversas modificaciones, entre ellas destaca la presentación de un equipo formado por un multielectrodo con sensores no específicos de lípidos que se imprimen sobre un substrato cerámico¹⁴³ y un sistema con microcontrolador que desarrolla redes neuronales artificiales, creando un sistema portátil de cómoda utilización (**Figura 44**). El sistema se ha ensayado en la identificación de distintas infusiones de hierbas.

¹³⁷ H. Yamada, Y. Mizota, K. Toko, T. Doi. *Highly sensitive discrimination of taste of milk with homogenization treatment using a taste sensor*. Materials and Science and Engineering, 5 (1997) 41-45.

¹³⁸ T. Fukunaga, K. Toko, S. Mori, S. Nakabayashi, M. Kanda. *Quantification of taste of coffee using sensor with global selectivity*. Sensors and Materials, 8 (1996) 47-48.

¹³⁹ K. Toko. *Electronic Tongue*. Biosensors & Bioelectronics 13 (1998) 701-709.

¹⁴⁰ A. Taniguchi, Y. Naito, N. Meada, Y. Sato, Ikezaki. *Development of a monitoring system for water quality using taste sensor*. Sensors and Materials, 11 (1999) 437-446.

¹⁴¹ H. Sakai, S. Liyama, K. Toko. *Evaluation of water quality and pollution using multichannel sensors..* Sensors and Actuators B, 66 (2000) 251-255.

¹⁴² M-J Ju, K. Hayama, K. Hayashi, K. Toko. *Discrimination of pungent-tasting substances using surface-polarity controlled sensor with indirect in situ modification*. Sensors and Actuators B, 89 (2003) 150-157.

¹⁴³ 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 Eurycome longifolia*. Sensors and Actuators B, 101 (2004) 191-198.

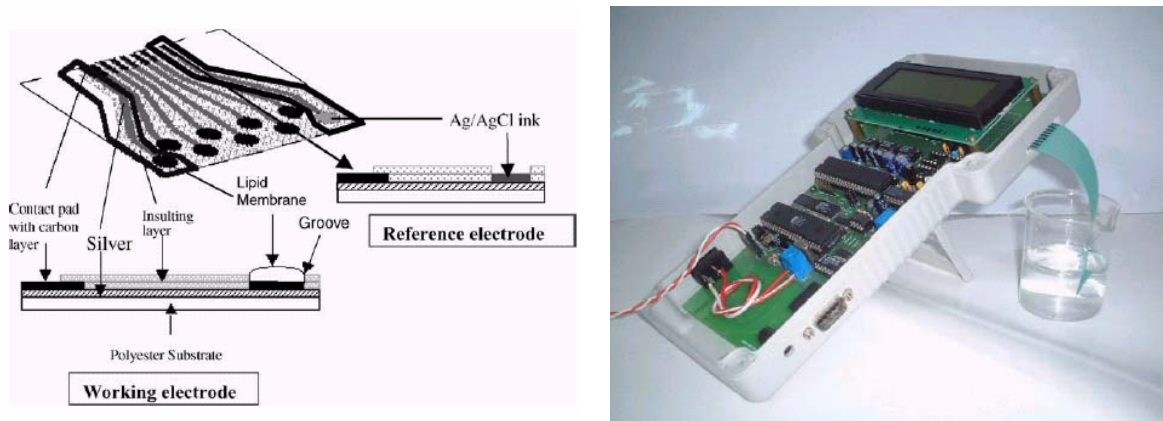


Figura 44. Sensor con membranas de lípidos y controlado por microprocesador

1.2 LENGUAS ELECTRÓNICAS CON SENSORES DE VIDRIO DE CALCOGENURO

Uno de los grupos de investigación que más ha destacado en el desarrollo de lenguas electrónicas con electrodos potenciométricos es el constituido por el Grupo de Sensores Químicos de la Universidad de San Petersburgo (Rusia), que ha presentado gran cantidad de publicaciones desde hace más de 15 años, y fueron los que acuñaron el término de “**lengua electrónica**”¹⁴⁴.

En casi todos los experimentos, las medidas las realizan con electrodos potenciométricos de membranas formadas por diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, pero donde el componente principal es el vidrio de **calcogenuro**, es decir formado por elementos de la columna VI de la tabla periódica (S, Se, Te, etc) que tienen un comportamiento eléctrico de semiconductor¹⁴⁵.

En las primeras investigaciones, este grupo desarrolló películas delgadas dopadas con As_2S_3 y $AsSe$ y mezcladas con conductores para ser utilizadas en la construcción de membranas para sensores. Comprobaron su respuesta iónica, respuesta redox y

¹⁴⁴ <http://www.electronic tongue.com>.

¹⁴⁵ C. Marchand. *Characterization of Chalcogenide Glasses*. Application Note. Horiba Group.

conductividad, y obtuvieron los mejores resultados con AsSe¹⁴⁶. Los sensores se aplicaron para determinar iones de metales pesados en disolución¹⁴⁷.

En lugar de un estudio individual de cada electrodo, se propuso el estudio conjunto de varios electrodos, formados por diferentes materiales de comportamiento distinto, unos de vidrio de calcogenuro y otros convencionales, formando todos ellos una matriz multisensora. Estos electrodos se entrenaron en disoluciones de composición compleja, conteniendo Cu²⁺, Pb²⁺, Cd²⁺, Zn²⁺, Cl⁻, F⁻ y SO₄²⁻ en concentraciones típicas de las aguas residuales industriales, y se comprobó que era posible identificar estas especies a pesar de la insuficiente selectividad de algunos sensores¹⁴⁸. A partir de ese momento ya se considera que se está ante una lengua electrónica¹⁴⁹, posteriormente aumentan el número de componentes de los vidrios y mejoran las técnicas de sensibilidad cruzada, con ello se logra un método que permite evaluar cualquier tipo de sensores potenciométricos.

El análisis de contaminantes inorgánicos del agua fue una de las principales aplicaciones de este tipo de electrodos. Al principio, por medio de sensores con membranas de PVC y electrodos sólidos detectan metales pesados en aguas que simulan a las subterráneas¹⁵⁰. Las experiencias dejaron de realizarse de manera estática para realizar un sistema dinámico de inyección de flujo para determinar la presencia de metales pesados en agua Pb(II), Cr(VI), Cu(II), Cd(II) utilizando los sensores de vidrio de calcogenuro. De esta forma se puede conseguir sistemas aplicables a la automatización de las medidas *on-line* de emisiones industriales de metales pesados¹⁵¹.

¹⁴⁶ A. Legin, E. Bychkov, Y. Vlasov. *Thin-layer chemical sensors based on chemically deposited and modified chalcogenide glasses*. Sensors and Actuators B, 15-16 (1993) 184-187.

¹⁴⁷ A. Legin, E. Bychkov, Y. Vlasov *Chalcogenide glass chemical sensors: research and analytical applications*. Y. Vlasov, E. Bychkov, A. Legin. Talanta, 41 (1994) 1059-1093.

¹⁴⁸ A. Legin, Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, E. Bychkov. *Cross-sensitivity of chalcogenide glass sensors in solutions of heavy metal ions*. Sensors and Actuators B, 34 (1996) 456-461.

¹⁴⁹ Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya. *Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions*. Sensors and Actuators B, 44 (1997) 532.

¹⁵⁰ A.M. Rudnitskaya, A. Ehlert, A. Legin, Y. Vlasov, S. Büttgenbach. *Multisensor system on the basis of an array of non-specific chemical sensors and artificial neural networks for determination of inorganic pollutants in a model groundwater*. Talanta, 55 (2001) 425-431.

¹⁵¹ J. Mortensen, A. Legin, A. Ipatov, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, K. Hjuler. *A flow injection system based on chalcogenide glass sensors for the determination of heavy metals*. Anal Chim Acta, 403 (2000) 273-277.

1.2.1 “ELECTRONIC TONGUE”

El grupo de sensores químicos de la Universidad de San Petersburgo ha colaborado con el grupo de investigación de Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universidad “Tor Vergata” de Roma, liderado por los investigadores C. Di Natale y A. D’Amico, que destacan en el desarrollo de sistemas de narices electrónicas, creando el sistema conocido como LibraNose¹⁵². Las experiencias con los electrodos de calcogenuro se completan con análisis multivariante de regresión lineal, PLS y redes neuronales¹⁵³. Fueron estos grupos los que acuñaron el término de lengua electrónica (“electronic tongue”) en la X conferencia de Eurosensors en 1996¹⁵⁴, donde presentaron un sistema de 20 sensores de diferente tipo: vidrio, cristalino, PVC plastificado y electrodos metálicos para la clasificación de todo tipo de bebidas mediante análisis PCA¹⁵⁵. El sistema de medida ha sido bautizado por *Electronic tongue* y se representa en la **Figura 45**.



Figura 45. Versión de Laboratorio de “Electronic tongue”

¹⁵² C. Di Natale, A. Macagnamo, E. Martinelli, E. Proietti, R. Paolesse, L. Castellari, S. Campani, A. D’Amico. *Electronic nose based investigation of the sensorial properties of peaches and nectarines*. Sensors and Actuators B, 77 (2001) 561-566.

¹⁵³ C. Di Natale, F. Davide, J. Brunink, A. D’Amico, Y. Vlasov, A. Legin, A. Rudnitskaya. *Multicomponent analysis of heavy metal cations and inorganic anions in liquids by non-selective chalcogenide glass sensor array*. Sensors and Actuators B, 34 (1996) 539-542.

¹⁵⁴ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, F. Davide, A. D’Amico. Tech. Dig. Eurosensors X (Leuven, Bélgica, 1996).

¹⁵⁵ Y. Vlasov, A. Legin, A.M. Rudnitskaya, A. D’Amico, C. Di Natale. *“Electronic tongue” – new analytical tool for liquid analysis on the basis of non-specific sensors and methods of pattern recognition* Sensors and Actuators B, 65 (2000) 235-236.

Con este sistema de medida se han realizados análisis de vino con distintos tipos de vinos italianos de Barbera d'Asti y Gutturmo, clasificándolos con el método de SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*) y logrando discriminación por áreas geográficas y añadas, cuantificando parámetros de aroma y sabor en términos similares a los que realizan los catadores humanos¹⁵⁶.

Las experiencias con el prototipo de "Electronic Tongue" han continuado con el reconocimiento de cafés¹⁵⁷, discriminación de zumos de frutas y detección del deterioro de los zumos por medio de PCA y redes neuronales¹⁵⁸, análisis de aguas minerales y vinos italianos¹⁵⁹, donde se realizó un análisis cualitativo para determinar las especies iónicas y conductividad del agua mediante PLS y las sustancias orgánicas del vino (ácidos tartáricos, etil-alcohol) mediante PLS y ANN¹⁶⁰. De forma similar se determinó la concentración de contaminantes en aguas subterráneas¹⁶¹.

Como conclusión final de estas experiencias, se ha realizado una comparación de las características del análisis de un conjunto de sensores no específicos en comparación con sensores químicos discretos,¹⁶² y se comprueba experimentalmente que con sensores apropiados con sensibilidad cruzada se permite mejorar el límite de detección y la selectividad que con sensores químicos discretos.

¹⁵⁶ A. Legin, A.M. Rudnitskaya, L Lvova, Y. Vlasov, C. Di Natale, A. D'Amico. *Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception*. *Analytica Chimica Acta*, 484 (2003) 33-44.

¹⁵⁷ A. Legin, A. Rudnitskaya, B Seleznev, Y. Vlasov (2002) *Food Sci Technol* 37 (2002) 375-385.

¹⁵⁸ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, F. Davide, A. D'Amico. *Tasting of beverages using an electronic tongue*. *Sensors and Actuators B*, 44 (1997) 291-296.

¹⁵⁹ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, E. Mazzone, A. D'Amico. *Application of electronic tongue for qualitative and quantitative analysis of complex liquid media*. *Sensors and Actuators B*, 65 (2000) 232-234.

¹⁶⁰ A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, E. Mazzone, A. D'Amico. *Application of Electronic Tongue for Quantitative Analysis of Mineral Water and Wine*. *Electroanalysis*, 11 (1999) 814-820.

¹⁶¹ A. Rudnitskaya, A. Ehlert, A. Legin, Y. Vlasov, S. Büttgenbach. *Multisensor system on the basis of an array of non-specific chemical sensors and artificial neural networks for determination of inorganic pollutants in a model groundwater*. *Talanta* 55 (2001) 425-431.

¹⁶² A. Legin, A.M. Rudnitskaya, Y. Vlasov, C. Di Natale, A. D'Amico. *The features of the electronic tongue in comparison with the characteristics of the discrete ion-selective sensors*. *Sensors and Actuators B*, 58 (1999) 464-468.

1.2.2 Nuevos Microsensores

Con el vidrio de calcogenuro este grupo de investigación ha desarrollado un nuevo tipo de microsensor de película delgada por medio de la tecnología planar de silicio y la técnica de deposición por pulsos de láser (PLD). El grosor de las películas delgadas varía entre 300 nm a 1500 nm. El nuevo ISE basado en películas delgadas posee una respuesta casi-Nernstiana.¹⁶³

Estos trabajos se realizaron junto al Instituto de Películas Delgadas e Interfases del Centro de Investigación Jülich GmbH (Alemania)¹⁶⁴. La estructura de un sensor de calcogenuro se muestra en la **Figura 46**, formada por un substrato de silicio, al que se incorpora un contacto metálico de Ti-Pt-Au, y sobre el se aplica la capa delgada de vidrio de calcogenuro.

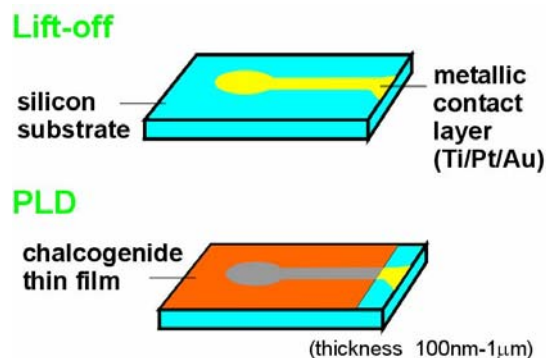


Figura 46. Sensor con película delgada de calcogenuro

1.2.3 Aplicaciones Recientes

Las aplicaciones de este tipo de lengua electrónica se han ido extendiendo a nuevos campos de aplicación, como la microbiología y la farmacología, así se han desarrollado

¹⁶³ Y, Mourzina, J. Schubert, W. Zander, A. Legin, Y. Vlasov, H. Lüth, M. Schöning. *Development of multisensor systems based on chalcogenide thin film chemical sensors for the simultaneous multicomponent analysis of metal ions complex solutions*. *Electrochimica Acta*, 47 (2001) 251-248.

¹⁶⁴ J. Klook, Y. Mourzina, J. Schubert, M. Schöning. *A first step towards a microfabricated thin-film sensor array on the basis of chalcogenide glass materials*. *Sensors*, 2 (2002) 356-365.

sistemas para la monitorización de diversos procesos de fermentación de levaduras (*Escherichia coli*) donde se compara con la variación de ácido acético y biomasa¹⁶⁵; el desarrollo de *Aspergillus niger*¹⁶⁶ determinando simultáneamente los contenidos de amonio, oxalato y citrato en fermentaciones simuladas; y el control del inicio de la fermentación del queso fresco¹⁶⁷, donde se demuestra la capacidad de la lengua electrónica para cuantificar la concentración de iones de importantes ácidos orgánicos (citrato, lactato y orotato).

En farmacología es interesante para cuantificar el amargor que presentan algunos productos, por ello han realizado algunos experimentos para analizar estos efectos.¹⁶⁸, así como los productos, a base de edulcorantes, que se añaden a los medicamentos para enmascarar su sabor amargo.

Otras aplicaciones presentadas consisten en el reconocimiento de diversas bebidas con fuerte contenido alcohólico, detectando la presencia de contaminantes,¹⁶⁹ evaluación de la calidad de corcho,¹⁷⁰ sistema de medida automático para realizar análisis clínicos para detectar leche infectada¹⁷¹.

Un estudio de interés de la matriz de sensores con amplificadores de muy alta impedancia es la posibilidad de trabajar sin electrodo de referencia. Para ello se mide el

¹⁶⁵ C. Turner, A. Rudnitskaya, A. Legin. *Monitoring batch fermentations with an electronic tongue*. Journal of Biotechnology, 103 (2003) 87-91.

¹⁶⁶ A. Legin, D. Kirsanov, A. Rudnitskaya, J. Iversen, B. Seleznev, K. Esbensen, J. Mortensen, L. Houmoller. *Multicomponent analysis of fermentation growth media using the electronic tongue (ET)*. Talanta, 64 (2004) 766-772.

¹⁶⁷ K. Esbensen, D. Kirsanov, A. Legin, A. Rudnitskaya, J. Mortensen, J. Pedersen, L. Vogensen, S. Makarychev, Y. Vlosov. *Fermentation monitoring using multisensor systems: feasibility study of the electronic tongue*. Anal. Bioanal. Chem, 378 (2004) 391-395.

¹⁶⁸ A. Legin, A. Rudnitskaya, D. Clapham, b. Selenev, K. Lord, Y. Vlasov. *Electronic tongue for pharmaceutical analytics: quantification of tastes and masking effects*. Anal. Bioanal. Chem, 380 (2004) 36-45

¹⁶⁹ A. Legin, A. Rudnitskaya, B. Selenev, Y.T. Vlasov. *Electronic for quality asserment of ethanol, vodka and eau-de-vie*. Analytica Chimica Acta, 534 (2005) 129-135.

¹⁷⁰ A. Rudnitskaya, I. Delgadillo, S. Rocha, A. Costa, A. Legin. *Quality evaluation of cork from Quercus suber L. by the electronic tongue*. Analytica Chimica Acta, 563 (2005) 315-318.

¹⁷¹ 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 (2006) Artículo en Prensa.

potencial entre todos los pares de electrodos¹⁷² y posteriormente se eliminan los valores redundantes. Después de realizar diversos experimentos, se llegó a la conclusión de que, al menos en algunas aplicaciones, el poder de discriminación de la lengua electrónica no depende de si la medida se realizó con o sin electrodo de referencia, alcanzando una aceptable discriminación en ambas circunstancias.

1.2.4 Fusión de Distintos Métodos de Medida

Una de las inquietudes de los grupos de investigación es la integración o comparación distintos tipos de medida, ya sea nariz y lengua electrónica, o lenguas electrónicas de diversos tipos. El grupo de investigación de San Petersburgo han presentado diversas experiencias de aplicaciones conjuntas, por ejemplo:

Una nariz electrónica basada en sensores QMB y lengua electrónica con metaloporfirina como sustancia activa para realizar análisis de muestras clínicas y de alimentos. Se analiza la relación entre el comportamiento de los electrodos, concluyendo que se obtiene mejor resultados cuando las cargas de los electrodos de la lengua electrónica son claramente distintas de la nariz electrónica¹⁷³. Este mismo sistema combinado de lengua y nariz electrónica, y con las mismas características de la experiencia anterior se ha utilizado para el análisis de vino tinto para medir la presencia de determinados componentes¹⁷⁴, aunque la respuesta de los sensores está relacionada con el contenido químico, la complejidad del patrón químico de la muestra es tal que el coeficiente de correlación no excede del 50%, con la excepción de la lengua electrónica con el valor del pH.

Comparación de diversos métodos de análisis: espectroscopia de reflexión total atenuada ATR-FTIR, Lengua Electrónica (ET) y métodos convencionales de análisis de

¹⁷² A. Legin, A. Rudnitskaya, Y. Vlasov. (2002) *Sensors update* 10. Wiley-VCH, Weinheim, 143-205.

¹⁷³ C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, A. Legin, L. Lvova, A.M. 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.

¹⁷⁴ C. Di Natale, R. Paolesse, A. Macagnano, A. Mantini, A. D'Amico, M. Ubigli, A. Legin, L. Lvova, A.M. 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.

frutas para evaluar¹⁷⁵ diferentes variedades de manzanas. Aunque no tuvieron grandes diferencias entre los resultados de ambos métodos porque FTIR y ET ofrecen información química similar.

La conjunción de los métodos de la lengua electrónica y ATR-FTIR ha servido como método rápido para la detección de azúcares y ácidos en tomates¹⁷⁶.

En una de las aplicaciones de la lengua electrónica en el campo de la microbiología se realizó una comparación de los resultados realizados con dos técnicas de medida por un lado la lengua electrónica potenciométrica con vidrio de calcogenuro y por otro lado otro sistema con técnicas voltamétricas que han desarrollado el grupo de investigación de Linköping (Suecia) para la discriminación de diferentes especies de levaduras y mohos.¹⁷⁷ Las conclusiones finales son que realizando un análisis con la mezcla de los datos de ambos sistemas se obtienen mejores resultados que con cada uno de los sistemas por separado.

1.2.5 Otros Grupos de Investigación sobre Sensores de Calcogenuro

Los electrodos de películas de calcogenuro también han sido utilizados por otros grupos de investigación, creando lenguas electrónicas que combinan sensores potenciométricos y dos grupos de electrodos voltamétricos¹⁷⁸. Esta fusión se ha aplicado en el análisis de detección de metales, concluyendo que los sensores potenciométricos detectan los iones Fe(III) y Cr(VI) y los voltamétricos detectan metales pesados. Este

¹⁷⁵ A. Rudnitskaya, D. Kirsanov, A. Legin, K. Beullens, J. Lammertyn, B. Nicolaï, J. Irundayaraj. Analysis of apples varieties – comparison of electronic tongue with different analytical techniques. *Sensors and Actuators B*, 116 (2006) 23-28.

¹⁷⁶ K. Beullens, D. Kirsanov, J. Irundayaraj, A. Rudnitskaya, A. Legin, B. Nicolaï, J. Lammertyn. *The electronic tongue and ATR-FTIR for rapid detection of sugars and acids in tomatoes*. *Sensors and Actuators B*, 116 (2006) 107-115.

¹⁷⁷ C. Söderstrom, A. Rudnitskaya, A. Legin, C. Krantz-Rülker, *Differentiation of four Aspergillus species and one Zygosaccharomyces with two electronic tongues based on different measurement techniques*. *Journal of Biotechnology*, 119 (2005) 300-308.

¹⁷⁸ H. Men, S. Zou, Y. Li, Y. Wang, X. Ye, P. Wang. *A novel electronic tongue combines MPLAPS with stripping voltammetry for environmental detection*. *Sensors and Actuators B*, 110 (2005) 350-357.

mismo grupo también ha realizado una fusión de nariz y lengua electrónica, pero utilizando membranas de lípidos, para el análisis de vinos y licores¹⁷⁹.

1.3 LENGUA ELECTRÓNICA CON ELECTRODOS ION-SELECTIVOS

Las membranas poliméricas se han utilizado tradicionalmente en la química analítica para la construcción de electrodos ion-selectivos (ISE). Las membranas de estos electrodos se construyen con capacidad de reconocer a un analito de una disolución, estableciendo una preferencia del analitos de interés respecto a otros interferentes en la muestra. Esta preferencia no es absoluta, es decir los elementos interferentes también influyen en el valor del potencial.

Dos grupos de investigación de importancia han desarrollado lenguas electrónicas con electrodos ion-selectivo de membranas poliméricas.

Partiendo de electrodos ISE y aprovechando la sensibilidad cruzada de los elementos interferentes, el *Departamento de Química Analítica* de la *Universidad Tecnológica de Varsovia* (Polonia) ha desarrollado una lengua electrónica,¹⁸⁰ formada por diversos electrodos para realizar un análisis cualitativo de varias bebidas, como zumo de naranja, leche y tónica. Con los resultados obtenidos realizan análisis PCA y clasificaciones con redes neuronales, obteniendo una alta proporción de precisión en la clasificación de los distintos tipos de bebidas. Además describen un método de reducción del número de sensores¹⁸¹ y comprueban los efectos de la reducción de electrodos con redes neuronales y aplicadas a la discriminación de diferentes tipos de agua mineral y zumos de manzana.

Las investigaciones continúan con la búsqueda de nuevas estrategias de análisis de datos. Presentan una lengua electrónica formada por dos tipos de sensores, unos con especial selectividad hacia las especies iónicas presentes en la muestra, y otros con

¹⁷⁹ R. Li, P. Wang, W. Hu. *A novel method for wine analysis based on sensor fusion technique*. *Sensors and Actuators B*, 66 (2000) 246-250.

¹⁸⁰ P. Ciosek, E. Augustyniak, W. Wróblewski. *Polymeric membrane ion-selective and cross-sensitive electrode-based electronic tongue for qualitative analysis of beverages*. *Analyst*, 129 (2004) 639-644.

¹⁸¹ P. Ciosek, Z. Brzózka, W. Wróblewski. *Classification of beverages using a reduced sensor array*. *Sensors and Actuators B*, 103 (2004) 76-83.

sensibilidad cruzada. La experiencia consiste en la mejora de la clasificación de zumos de naranja de diferentes marcas. Para comprobarlo, comparan métodos de proceso directo (ANN), proceso de datos por PLS y proceso en dos etapas (salidas de PCA y PLS procesadas por ANN) y comprueban la mejora de la capacidad de clasificación de los métodos supervisados presentados por los autores¹⁸².

Existe bastante literatura de comparación de los métodos de reconocimiento de patrones aplicados a narices electrónicas, pero este grupo de investigación es el primero que realiza esta comparación aplicado exclusivamente a lenguas electrónicas. Utilizando en muestras de leches de diversos suministradores, realizan una comparación de diversos métodos de reconocimiento de patrones:¹⁸³ PLS (*Partial Least Square*), PCA+BPNN (*Back Propagation Neural Network*), KNN (*K-nearest neighbors*), SIMCA y LVQ (*Learning Vector Quantization*), llegando a la conclusión que el método LVQ posee el mayor porcentaje de clasificación. Otros trabajos realizados con electrodos ISE son la clasificación de diversas bebidas (leche, zumo de naranja y tónica) de distintos fabricantes utilizando diversos métodos de clasificación (kNN, BPNN y PNN) comprobando el mejor resultado del método PNN (*Probabilistic Neural Network*)¹⁸⁴, el reconocimiento y clasificación de varios subtipos de plantas de cereales para reconocer su metabolismo y algunos factores de crecimiento con análisis PLs y análisis discriminante (PLS-DA)¹⁸⁵.

En trabajos más recientes la lengua electrónica queda modificada con la introducción de un sistema de flujo sobre electrodos miniaturizados basados en circuitos impresos con contactos de oro y plata¹⁸⁶. El sistema se ha probado para el

¹⁸² P. Ciosek, Z. Brzózka, W. Wróblewski, E. Martineli, C. Di Natale, A. D'Amico. *Direct and two-stage analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue –Effect of supervised feature extracción*. *Talanta*, 67 (2005) 590-596.

¹⁸³ P. Ciosek, W. Wróblewski. *The analysis of sensor array data with various pattern recognition techniques*. *Sensors and Actuators B*, 114 (2006) 85-93.

¹⁸⁴ P. Ciosek, T. Sobanski, E. Augustyniak1, W. Wróblewski, *ISE-based sensor array system for classification of foodstuffs*. *Meas. Sci. Technol.* 17 (2006) 6–11.

¹⁸⁵ P. Ciosek, B. Pokorska, E. Romanowska, W. Wróblewski. *The Recognition of Growth Conditions and Metabolic Type of Plants by a Potentiometric Electronic Tongue*. *Electroanalysis* 18, (2006) 1266 – 1272.

¹⁸⁶ R. Toczylowska, R. Pokrop, A. Dybko, W. Wróbleswski. *Planar potentiometric sensors based on Au and Ag microelectrodes and conducting polymers for flow-cell analysis*. *Anal. Chim. Acta*, 485 (2003) 103-109.

reconocimiento de un tipo de cerveza¹⁸⁷. Los resultados obtenidos demuestran que la combinación de microelectrodos ion-selectivos y parcialmente selectivos y con la combinación de técnicas PLS/ANN permite un reconocimiento del 85%¹⁸⁸. Con similar tipo de electrodos han realizado experiencias de clasificación de distintos tipos de leche según su contenido en grasa, realizando la clasificación con redes neuronales SVM (*Support Vector Machine*)¹⁸⁹.

1.3.1 Electroodos Ion-Selectivos (ISE) de Membranas de Polímeros de PVC.

El grupo de investigación de *Sensors i Biosensors* del *Departament de Química* de la *Universitat Autònoma de Barcelona* ha desarrollado lenguas electrónicas potenciométricas con electrodos ion-selectivos (ISE) de diferentes membranas de polímeros de PVC. Las membranas que utilizan poseen diferentes componentes electroactivos, plastificantes y con distinta proporción de PVC.

La aplicación inicial fue la cuantificación simultánea de dos iones (NH_4^+ , K^+) en muestras sintéticas de agua¹⁹⁰, para ello se utilizaron sensores con membranas con diversos ionóforos, logrando predicciones con precisión del 1% gracias a una optimización del tipo de red neuronal aplicado con regulación Bayesiana

Realizando ligeras variaciones a las membranas de los sensores para conseguir mayor respuesta cruzada a iones alcalinos y con una red neuronal apropiada logran la cuantificación simultánea de tres iones alcalinos (NH_4^+ , K^+ y Na^+) en muestras

¹⁸⁷ P. Ciosek, W. Wróblewski. *The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes*. *Talanta*, 69 (2006) 1156-1161.

¹⁸⁸ P. Ciosek, Z. Brzózka, W. Wróblewski. *Electronic tongue for flow-through analysis of beverages*. *Sensors and Actuators B*, 118 (2006) 454-460.

¹⁸⁹ P. Ciosek, K. Brudzewski, W. Wróblewski. *Milk classification by means of an electronic tongue and Support Vector Machine neural network*. *Meas. Sci. Technol.* 17 (2006) 1379-1384.

¹⁹⁰ J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, M. De-Román, L. Leija, P.R. Hernández, M. del Valle. *An electronic tongue using potentiometric all-solid-state PVC-membrane sensors for the simultaneous quantification of ammonium and potassium ions in water*. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 248-256.

sintéticas y naturales de agua con varios tipos de fertilizantes sin necesidad de eliminar estos interferentes¹⁹¹.

Una forma más actual de realizar las medidas es por medio del análisis por inyección automática FIA (*Flow-Injection Analysis*) que permite realizar las medidas de forma automática. El ejemplo que ha estudiado este grupo de investigación es determinar la presencia del ion nitrato en muestras que también contienen clorito, que es uno de sus aniones interferentes típicos¹⁹². El análisis de los datos se realizó con ANN basadas en regularización Bayesiana, que permite la cuantificación de iones nitrato entre 0,1 y 100 mg l⁻¹ NO₃⁻ sin necesidad de eliminar el interferente de clorito.

El sistema de medida automático FIA se ha mejorado utilizando un sistema de análisis por inyección secuencial (SIA) que es un sistema complejo que permite una mejor automatización del proceso. Permite trabajar con diferentes métodos de detección ya que es un sistema muy versátil, entre ellos un sistema voltamétrico para determinar componentes oxidables,¹⁹³ un sistema potenciométrico para la determinación iones alcalinos¹⁹⁴ y un sistema voltamétrico para determinar componentes fenólicos¹⁹⁵. Estos equipos se desarrollaron con una instrumentación virtual en el entorno LabView6,1¹⁹⁶, con los cuales se ha estudiado la respuesta transitoria de los electrodos¹⁹⁷.

¹⁹¹ J. Gallardo, S. Alegret, R. Muñoz, L. Leija, P. Hernández, M. del Valle. *Use of an Electronic Tongue Based on All-Solid-State Potentiometric Sensors for the Quantification of alkaline Ions*. *Electroanalysis*, 17 (2005) 348-355

¹⁹² 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

¹⁹³ A. Gutiérrez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle. *Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals Part 1. Voltammetric e-tongue for the determination of oxidable compounds*. *Talanta*, 66 (2005) 1187-1196

¹⁹⁴ M. Cortina, A. Gutiérrez, S. Alegret, M. del Valle. *Sequential injection system with higher dimensional electrochemical sensor signals. Part 2. Potentiometric e-tongue for the determination of alkaline ions*. *Talanta*, 66 (2005) 1197-1206.

¹⁹⁵ A. Gutiérrez, A. Ibáñez, F. Céspedes, S. Alegret, M. del Valle. *Simultaneous determination of phenolic compounds by means of an automated voltammetric "electronic tongue"*. *Anal. Bional. Chem*, 382 (2005) 471-476.

¹⁹⁶ A. Durán, M. Cortina, L. Velasco, J. A. Rodríguez, S. Alegret, M. del Valle. *Virtual Instrument for an Automated Potentiometric e-Tongue Employing the SIA Technique*. *Sensors* 6 (2006) 19-29.

¹⁹⁷ D. Calvo, A. Durán, M. del Valle. *Use of sequential injection analysis to construct an electronic-tongue Application to multidetermination employing the transient response of a potentiometric sensor array*. *Analytica Chimica Acta* (2007) Artículo en prensa.

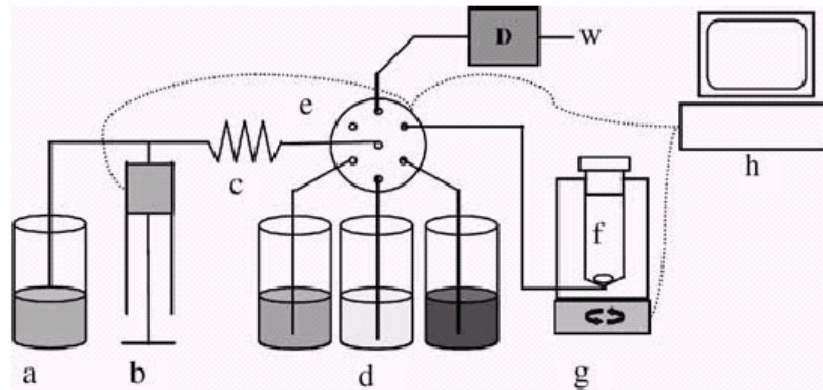


Figura 47. Esquema de sistema SIA (a) disolución, (b) microbureta, (c) bobina calefactora, (d) disoluciones almacenadas (e) válvula de selección (f) celda de mezclas, (g) agitador magnético (h) PC, F, detector, W, residuos

Además del análisis de disoluciones químicamente controladas, la lengua electrónica también se ha utilizado para la clasificación de alimentos, tales aguas comerciales, zumos de naranja y té,¹⁹⁸ logrando una correlación entre el contenido de zumo natural y su primera componente principal PC1.

Otra línea de investigación reciente es la aplicación de la transformada wavelet en combinación con las redes neuronales, comprobando que logran una mejor cuantificación de los resultados de la lengua electrónica voltamétrica¹⁹⁹ fundamentalmente cuando existe un solapamiento de las señales voltamétricas²⁰⁰.

1.3.2 Otros Grupos de Investigación con Electrodo Ion-Selectivos

Los electrodos ion-selectivos han sido utilizados por otros grupos de investigación. El grupo de la Universidad de San Petersburgo, además de los electrodos de vidrio de calcogenuro, también utilizaba ISE. Por ejemplo para realizar un análisis cuantitativo de sustancias típicas de líquidos biológicos, como sangre humana, plasma, disolución

¹⁹⁸ J. Gallardo, S. Alegret, M del Valle. *Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis*. Talanta, 66 (2005) 1303-1309.

¹⁹⁹ L. Moreno-Barón, R. Cartas, A. Merkoci, S. Alegret, M. del Valle, L. Leija, P. Hernández, R. Muñoz. *Application of the wavelet transform coupled with artificial neural networks for quantification purposes in voltammetric electronic tongue*. Sensors and Actuators B, 113 (2006) 487-499.

²⁰⁰ A. Gutiérrez, 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.

para diálisis de riñón artificial, utilizaron membranas PVC con diferentes ionóforos, logrando detectar Ca_2^+ , Mg^{2+} , H_2PO_4^- , HCO_3^- con una precisión de 2–4%, que son precisiones aceptables para análisis clínicos.²⁰¹

Los sensores basados en PVC y dopados con varias polifirinas se han utilizado para realizar sensores de gas y de líquidos, aplicados para el análisis de vinos tintos.²⁰² En el caso del sensor de gas, la metaloporfirina se utiliza para obtener microbalanzas piezoeléctricas y en lengua electrónica los sensores se constituyeron a base de electropolimerización con metaloporfirina, Este tipo de material también se ha utilizado para construir un sistema para detectar el grado de alcohol en las bebidas²⁰³.

1.4 ELECTRODOS METÁLICOS Y ELEMENTOS SIMPLES

La forma más simple y normalmente más económica de obtener un electrodo potenciométrico es por medio de electrodos simples, formados por varillas de diversos metales. De esta forma, se obtienen electrodos indicadores de tipo de primera, segunda, tercera clase o de tipo redox, tal como se indicó en el capítulo de Introducción dedicado a los tipos de electrodos. Además de metales puros, pueden utilizarse otros componentes sencillos, como por ejemplo el carbón en forma de grafito. El carbono puede absorber la materia orgánica y por tanto puede generar un potencial proporcional a la cantidad de materia orgánica presente en la muestra.

El grupo de investigación de la Universidad de San Petersburgo junto con otros grupos ha presentado sensores potenciométricos utilizando sensores sólidos con pasta de carbón impresa²⁰⁴. Comprueban que incorporando un 10% de Azul Prusia en una pasta comercial de carbón y con preanodizado electroquímico de la pasta en solución de KCl proporciona electrodos de estado sólido de tecnología planar con significativa

²⁰¹ A. Legin, A. Smirnova, A.M. Rudnitskaya, L Lvova, E. Suglobova, Y. Vlasov. *Chemical sensor array for multicomponent analysis of biological liquids*. *Analytica Chimica Acta*, 385 (1999), 131-135.

²⁰² C. Di Natale, R. Paolesse, M. Burgio, E. Martinelli, G. Pennazza, A. D'Amico. *Application of metalloporphyrins-based and liquid sensor arrays to the analysis of red wine*. *Analytica Chimica Acta*, 513 (2004) 49-56

²⁰³ L Lvova, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico. *Detection of alcohols in beverages: An application of porphyrin-based Electronic tongue*. *Sensors and Actuators B*, 118 (2006) 439-447

²⁰⁴ L Lvova, S. Shin Kim, A. Legin, Y. Vlasov, J. Soo Yang, G. Sig Cha, H. Nam *All-solid-state electronic tongue and its application for beverage analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 48 (2002) 303-314.

estabilidad potenciométrica. De esta forma obtienen una lengua electrónica de producción en masa, reproducible y de bajo coste. Este sistema se ha aplicado para análisis de té coreano²⁰⁵.

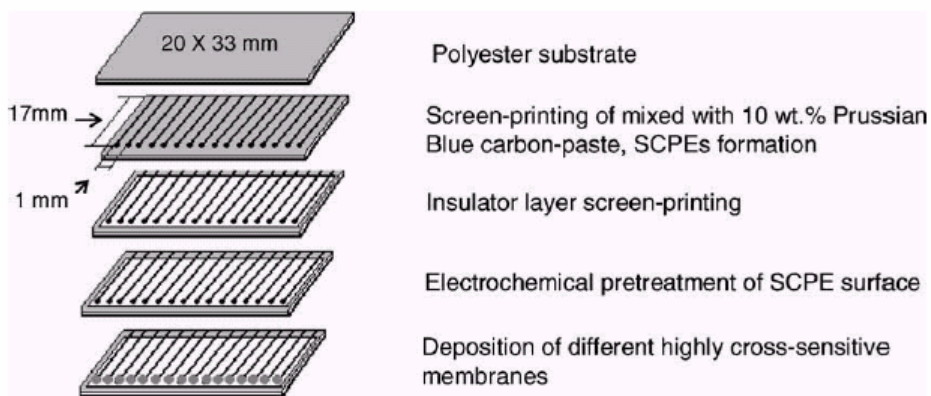


Figura 48. Proceso de fabricación sensor con pasta de carbón

Este grupo también ha presentado una lengua electrónica basada en electrodos potenciométricos metálicos, formando por varillas de Cu, Sn, Fe, Al, latón y acero inoxidable, incluyendo además un electrodo de pH de vidrio²⁰⁶. Aplican este sistema para la discriminación de diversos tipos ácidos orgánicos como vinagres, zumos de frutas y néctares; estudiando los posibles mecanismos de sensibilidad de diversos metales ante la presencia de compuestos ácidos²⁰⁷.

El grupo del *Centro de Investigación en Química Molecular Aplicada* de la *Universidad Politécnica de Valencia*, ha presentado una lengua electrónica con electrodos metálicos contruidos en tecnología de capa gruesa y por varillas

²⁰⁵ L. Lvova, A. Legin, Y. Vlasov, G. Sig Cha, H. Nam *Multicomponent analysis of Korean green tea by means of disposable all-solid-state potentiometric electronic tongue microsystem..* Sensors and Actuators B, 95 (2003) 391-399.

²⁰⁶ L. Lvova, G. De Angelis, C. Montieri, T. Primadei, E. Martinelli, E. Mazzone, A. Pede, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico. *An 'Electronic Tongue' system based on an array of metallic potentiometric sensors.* IEEE (2004).

²⁰⁷ L. Lvova, E. Martinelli, E. Mazzone, A. Pede, R. Paolesse, C. Di Natale, A. D'Amico. *Electronic tongue based on an array of metallic potentiometric sensors.* Talanta, 70 (2006) 833-839.

metálicas.²⁰⁸ Como este tipo de sistemas es la base de la presente tesis doctoral se desarrollará su diseño y resultados en los capítulos de experimentación.

2 LENGUAS ELECTRÓNICAS CON TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

El segundo tipo de lenguas electrónicas más utilizadas son aquellas que aplican técnicas voltamétricas. Tal como se indicó en el capítulo de Introducción, la voltametría es una técnica de análisis electroquímico que consiste, básicamente, en aplicar una tensión variable entre uno o varios electrodos de trabajo y otro auxiliar, de forma que circule una corriente eléctrica a través de la muestra. La medida de la intensidad de esa corriente eléctrica y su variación en el tiempo puede ofrecer información de las características de la disolución muestra. En voltametría se aplica una señal no continua, para así evitar procesos de electrolisis. La señal de corriente difiere según el material de cada electrodo. Los valores de cada señal son procesados por un programa de reconocimiento de patrones para así realizar la discriminación de las muestras.

La ventaja principal de esta técnica es que los resultados suelen ser bastante exactos y reproducibles, pero a cambio es preciso un instrumental más elaborado que en la técnicas potenciométricas.

2.1 VOLTAMETRÍA CON ELECTRODOS METÁLICOS

La voltametría es una de las técnicas más utilizada en la investigación de lenguas electrónicas. Los grupos de investigación que más lo han utilizado son los de *Swedish Sensor Center* y *Division of Applied Physics* de la Universidad de Linköping (Suecia), han publicado desde hace varios años numerosos artículos y congresos.

El sistema de lengua electrónica que han desarrollado estos grupos está constituido por diversas varillas de distintos metales nobles, que varían de una experiencia a otra pero que en general son: oro, iridio, paladio, platino, renio y rodio. Sobre estos electrodos se aplica una señal cuadrada de amplitud descendiente. El conjunto de

²⁰⁸ R. Martínez-Mañez, J. Soto, E. Garcia-Breijo, L. Gil, J. Ibañez, E. Llobet. *An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters*. *Sensors and Actuators B*, 104 (2005) 302-307.

medida se completa con un electrodo de referencia de Ag/AgCl y un electrodo auxiliar de acero inoxidable, todos ellos conectados a un potenciostato. Los datos son adquiridos y procesados por un computador. El sistema de voltametría funciona tanto con pulsos de gran amplitud (LAPV) como pulsos de pequeña amplitud (SAPV).

El primer equipo voltamétrico que presentaron como lengua electrónica estaba formado por un cable de platino y otro de oro, de longitud de 5 mm y diámetro 1 mm. Se midieron las corrientes y las respuestas transitorias de corriente por medio de un potenciostato conectado a un PC²⁰⁹. Este tipo de sistema fue posteriormente modificado y mejorado hasta alcanzar la configuración que muestra la **Figura 49**.

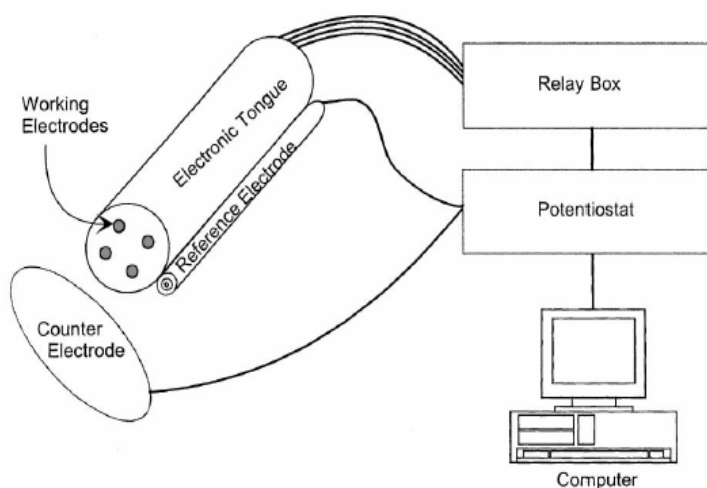


Figura 49. Sistema de medida voltamétrica

El sistema consiste en cinco electrodos de trabajo (oro, iridio, paladio, platino y rodio), un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar de acero inoxidable. Estos electrodos se incrustan en una resina epoxy y se colocan alrededor de un electrodo de referencia, de tal manera que solo están expuestos al exterior los extremos de los electrodos, en el extremo opuesto de los electrodos se conectan cables eléctricos. El conjunto está inserto en un tubo de plástico terminado con un tubo de acero inoxidable como electrodo auxiliar. Los cables de los electrodos de trabajo se conectan a una caja de relés, permitiendo que cada electrodo de trabajo se conectara separadamente. Se

²⁰⁹ F. Winqvist, P. Wide, I. Lundström. *An electronic tongue based on potentiometric sensor array* Analytica Chimica Acta, 357 (1997) 21-31

aplican diferentes pulsos voltamétricos: LAPV, SAPV y forma de escalera. En la Figura 50 se muestra pulsos típicos y correspondiente respuesta.

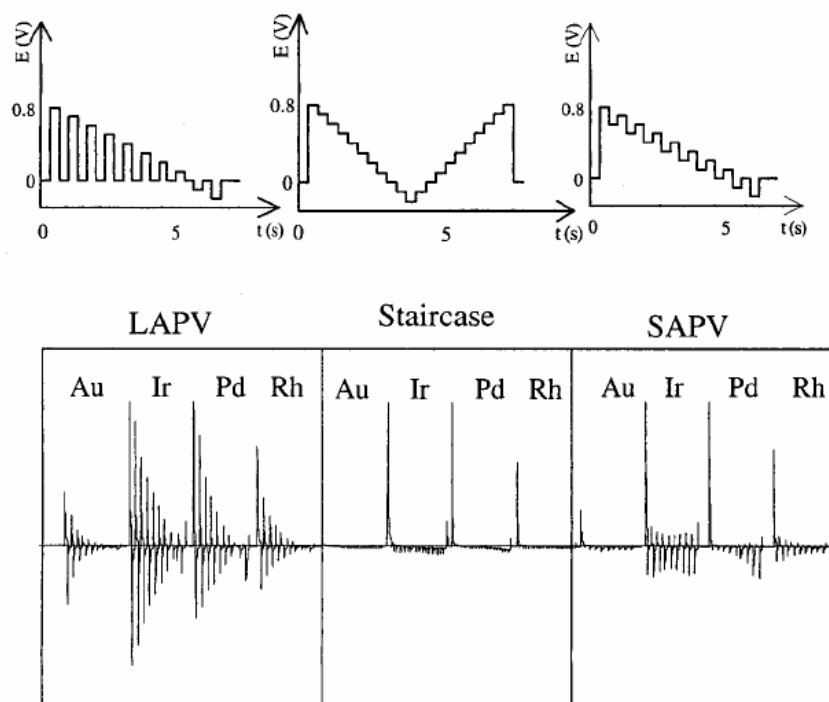


Figura 50. Señales voltamétricas

Este sistema de lengua electrónica ha sido utilizado para diversos experimentos: por ejemplo, el seguimiento del deterioro de la leche debido al crecimiento microbiano cuando se almacena a temperatura ambiente.²¹⁰ El sistema de lengua electrónica voltamétrica también se ha combinado con medidas potenciométricas y de conductividad, desarrollando lenguas electrónicas híbridas²¹¹. Este sistema se ha utilizado para la clasificación de seis tipos de leches.

Las experiencias siguientes consistieron en variar el tipo de muestras a analizar y en mejorar las técnicas de análisis y proceso de datos, por ejemplo:

²¹⁰ F. Winqvist, C. Krantz-Rúlker, P. Wide, I. Lundström *Monitoring of milk freshness by an electronic tongue based on voltametry* Measurement Science and Technology, 9 (1998) 1937-1946

²¹¹ F. Winqvist, S. Holmin, C. Krantz-Rulker, I. Lundstrom. *A hybrid electronic tongue* Analytica Chimica Acta, 406 (2000) 147-157

Discriminación de distintos tipos de té aplicando tres formas ondas voltámtricas y realizando una comparación de los resultados con cada una de ellas²¹². Presentación de un método de compresión de las variables de medida (de 8000 a 16) por medio de transformadas Wavelet y PCA jerárquico (HPCA), así como un método para extraer información de interés de los transitorios de corriente de las señales voltamétricas, aplicado a medidas de zumos de manzana, naranja y piña.²¹³ Para reducir los datos crearon un método propio para electrodos con respuesta con dos funciones exponenciales. De cada señal se extraen cinco parámetros que substituyen a las señales originales en los algoritmos multivariante²¹⁴. Realizan otro modelo de compresión de datos por medio de transformadas Wavelet²¹⁵.

Las aplicaciones de la lengua electrónica se llevaron a situaciones más reales y complejas, como la monitorización en tiempo real del proceso de potabilización del agua desde un río hasta el grifo siguiendo cada una de las etapas^{216,217}.

Otro tipo de aplicaciones fue en el campo de la biología, como el reconocimiento de seis diferentes microorganismos: una levadura, dos bacterias y tres mohos, en distintas fases de crecimiento²¹⁸ y el desarrollo de mohos en mohos líquidos²¹⁹.

El sistema básico de medida, ha sido modificado en diversas ocasiones, por ejemplo aplicando técnicas de inyección de flujo (FIA), donde una disolución de referencia es

²¹² P. Ivaesson, S. Holmin, N. Hojer, C Krantz-Rulker, F. Winquist. *Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms*. Sensors and Actuators B, 76 (2001) 449-454.

²¹³ S. Holmin, P. Spangeus, C. Krantz-Rulker, F. Winquist. *Compression of electronic tongue data based on voltammetry – a comparative study*. Sensors and Actuators B, 76 (2001) 455-464.

²¹⁴ T. Artursson, P. Spangeus, M. Holmeberg. *Variable reduction on electronic tongue data*. Analytica Chimica Acta, 452 (2002) 255-264.

²¹⁵ T. Artursson, M. Holmeberg. *Wavelet transform of electronic tongue data*. Sensors and Actuators B, 87 (2002) 379-391.

²¹⁶ M. Lindquist, P. Wide. *Virtual water quality test with an electronic tongue*. IEEE Instrumentation and Measurement Technology Conference. Budapest, May 2001.

²¹⁷ C. Krantz-Rulker, M. Stenberg, F. Winquist, I. Lundström. *Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review*. Analytica Chimica Acta, 426 (2001) 217-226.

²¹⁸ C. Söderstrom, F. Winquist, C. Krantz-Rulker. *Recognition of six microbial species with an electronic tongue*. Sensors and Actuators B, 89 (2003) 248-255.

²¹⁹ C. Söderstrom, H. Borén, F. Winquist, C. Krantz-Rulker. *Use of an electronic tongue to analyze mold growth in liquid media*. International Journal of Food Microbiology. 83 (2003) 253-261.

continuamente bombeada a través de una celda y las muestras a analizar se inyectan en forma de vapor. Se ha comprobado que se logra una menor deriva de los electrodos. Fue analizado para la discriminación de diversos zumos de manzana²²⁰. Con este sistema de medida (FIA) se han realizado experiencias para caracterizar las aguas residuales de la industria papelera y correlacionando con parámetros de interés (COD, conductividad y pH)²²¹. En la Figura 51 se muestra en esquema del sistema de medida FIA.

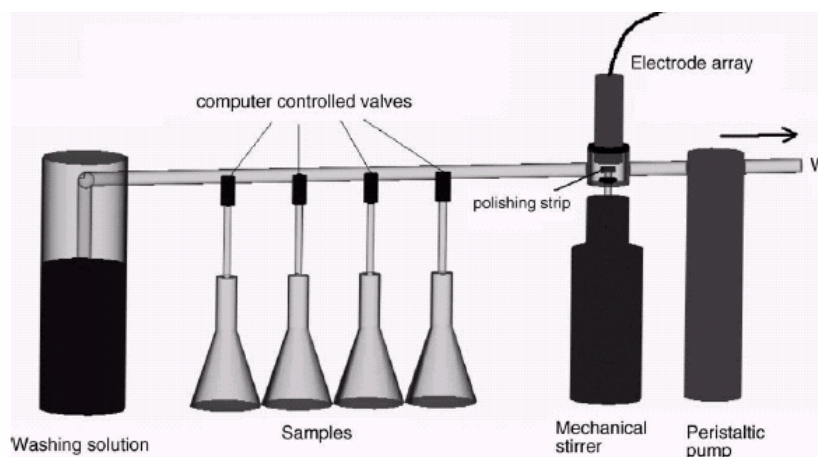


Figura 51. Esquema del sistema de medida FIA

En aplicaciones de la industria láctea está prohibido utilizar algunos materiales como el vidrio en los sistemas de medida, por ello se han modificando la lengua electrónica, para esta aplicación consistió en cuatro electrodos activos metálicos (oro, platino, rodio y acero inoxidable) incrustados en PEEKTM (*polyetherether ketone*) para la discriminación de diferentes tipos de leche²²².

Otra aplicación alejada del campo de la alimentación, es el análisis de diferentes enjuagados de lavadora automática doméstica, para ello se utiliza una lengua electrónica

²²⁰ F. Winqvist, E. Rydberg, S. Homin, C. Krantz-Rülker, I. Lundström. *Flow injection analysis applied to a voltammetric electronic tongue*. *Analytica Chimica Acta* 471 (2002) 159-172.

²²¹ A. Gutiérrez, F. Cespedes, M. del Valle, D. Louthander, C. Krantz-Rülker, F. Winqvist. *A flow injection voltammetric electronic tongue applied to paper mill industrial waters*. *Sensors and Actuators B* (2005) 390-395.

²²² F. Winqvist, B. Bjorklund, C. Krantz-Rulker, I. Lundström, K. Östergren, T. Skoglund. *An electronic tongue in the dairy industry*. *Sensors and Actuators B*, 111-112 (2005) 299-304.

y realizan análisis con diversa cantidad de detergente, tipo de manchas y número de enjuagados²²³.

En la investigación también se ha tenido en cuenta el tratamiento dado a los electrodos, como es su limpieza electroquímica y pulido del metal según diversos métodos, y comparando los resultados utilizando análisis multivariante, como PCA²²⁴.

En diversas ocasiones han realizado comparaciones de diversos sistemas de medidas utilizados por otros grupos de investigación. Por ejemplo, en una de las primeras publicaciones realizan una comparación de lengua electrónica voltamétrica con nariz electrónica con sensores MOSFET realizando análisis de los datos conjuntos²²⁵.

En otra ocasión se compara el sistema de lengua voltamétrica con el sensor de sabor con membranas de lípidos desarrollado por K. Toko, para ello se realizaron medidas con té y con detergente de lavadoras y comprobándose que si se analizan los datos por separado se obtienen resultados satisfactorios, pero si se fusionan los datos de ambos sistemas se obtiene mejor discriminación de las muestras de té²²⁶.

Un paso hacia una mayor fusión de sensores de distinta naturaleza es el proyecto de creación de una “cabeza sensora”, es decir la combinación de medidas que simulen todos los sentidos humanos y de esta forma se pueda hacer una evaluación global de un producto alimenticio: la lengua y nariz electrónica ya es conocida, pero se le añade un

²²³ P. Ivarsson, M. Johansson, N-E Hójer, C. Krantz-Rúlckerb, F. Winqvistb, I. Lundstr. *Supervision of rinses in a washing machine by a voltammetric electronic tongue*. Sensors and Actuators B, 108 (2005) 851-857.

²²⁴ S. Holmin, C. Krantz-Rúlcker, F. Winqvist. *Multivariate optimisation of electrochemically pre-treated electrodes used in a voltammetric electronic tongue*. Analytica Chimica Acta, 519 (2004) 39-46.

²²⁵ P. Wide, F. Winqvist, P. Bergsten, E. Petriu. *The Human-Based Multisensor Fusion Method for Artificial Nose and Tongue Sensor Data*. IEEE Transactions on Instruments and Measurement, Vol. 47, no, 5. October 1998.

²²⁶ P. Ivarsson, Y. Kikkawa, F. Winqvist, C. Krantz-Rúlker, N Hójer, K. Hayashi, K. Toko, I. Lundström. *Comparison of a voltammetric electronic tongue and a lipid membrane taste sensor*. Analytica Chimica Acta, 449 (2001) 59-68.

sistema de visión, un sistema de audición y otro de resistencia a mordedura. De estas medidas se extraen parámetros y se toma una decisión de calidad del producto²²⁷.

La evaluación de la calidad de un producto se suele realizar con técnicas de lógica difusa, por ello han desarrollado técnicas específicas para el control de calidad de alimentos, que ofrecen como resultado tres posibilidades: buena, mala y dudosa²²⁸.

2.2 VOLTAMETRÍA CON POLÍMEROS CONDUCTORES

Los electrodos voltamétricos metálicos poseen alta sensibilidad pero generalmente pobre selectividad. Para intentar la mejora de la selectividad se ha investigado en nuevos materiales electroactivos cuyas propiedades sensoras puedan ser modificadas a nivel químico para obtener electrodos de mejores características.

Los polímeros conductores es una elección natural para preparar matrices de sensores voltamétricos porque poseen un rico comportamiento electroquímico y sus propiedades pueden ser moduladas introduciendo modificaciones por medio de agentes donantes.

El grupo de investigación del Departamentos de *Química Inorgánica* y de *Física de la Materia Condensada* de la *Universidad de Valladolid* ha desarrollado electrodos con distintos tipos de monómeros dopado con aniones que se han aplicado para el estudio de disoluciones de distintos sabores (amargo, salado, dulce ácido y astringente)²²⁹. La técnica de medida ha sido la voltametría cíclica y se ha comprobado que el voltagrama es bastante complejo, con picos relativos en los procesos de oxido-reducción de los materiales sensibles y también en las características químicas de las soluciones analizadas. Por este motivo cada electrodo ofrece una respuesta particular para cada una de las soluciones modelo, obteniendo una elevada sensibilidad cruzada cuando se

²²⁷ P. Wide. *The artificial sensor head: A new approach in assessment of human related quality in food industry*. ISIF, 1999, 1144–1149.

²²⁸ B. Iliev, M. Lindquist, L. Roberstsson, P. Wide. *A fuzzy technique for food- and water quality assessment with an electronic tongue*. Fuzzy sets and systems, 157 (2006) 1155-1168.

²²⁹ 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.

compara con otros sensores voltamétricos. Esto tipos de electrodos también fueron comprobados con soluciones patrón de características amargas²³⁰.

Otro tipo de sensores que han desarrollado este grupo de investigación está formado por **pasta de carbón** modificada con tres tipos de tierras raras²³¹. Estos sensores los han utilizado para la discriminación de **vinos** tintos, aplicando técnicas voltamétricas de dos tipos: cíclicas y con señal cuadrada, ofreciendo resultados similares, aunque la señal cuadrada facilita el tratamiento de datos.

Los sensores con pasta de carbón alcanzan formas más complejas, por ejemplo, presentan una matriz híbrida formada por sensores de tres familias de materiales sensibles (pasta de carbón basadas en ftalocianina, pasta de carbón basadas en perileno y polímeros conductores), para monitorizar el envejecimiento de los vinos tinto en barriles de roble²³². La evaluación se ha realizó mediante técnicas no supervisadas PCA y supervisadas SIMCA y llegando a la conclusión de que la capacidad de discriminación aumenta con el paso del tiempo, es decir con el envejecimiento. Con esta misma composición de materiales han realizado otros experimentos, como la capacidad de diferenciar 12 vinos españoles elaborados con diferentes variedades de uvas y diferentes añadas²³³.

A partir de la experiencia previa con narices electrónicas y lenguas electrónicas, este grupo de investigación han desarrollado un sistema sensorial específicamente diseñado para la caracterización de vinos²³⁴ que combinaban tres tipos de sensores para

²³⁰ C. Apetrei, M. L. Rodríguez-Méndez, V. Parra, F. Gutierrez, J. A. de Saja. *Array of voltammetric sensors for the discrimination of bitter solutions*. Sensors and Actuators B, 113 (2004) 145-152.

²³¹ 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.

²³² V. Parra, A. Arrieta, J. Fernández-Escudero, M. Iñiguez, J. A. Saja, M .L Rodríguez-Méndez. *Monitoring of the ageing of red wines in oak barrels by means of an hybrid electronic tongue*. Analytica Chimica Acta 563 (2005) 229-237.

²³³ V. Parra, A. Arrieta, J. Fernández-Escudero, H. García, C. Apetrei, M. L Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja. “*E-tongue based on a hybrid array of voltametric sensors based on phthalocyanines, perylene derivatives and conducting polymers: Discrimination capability towards red wines elaborated with different varieties of grapes*”. Sensors and Actuators B, 115 (2005) 54-61.

²³⁴ M. L Rodríguez-Mendez, A. Arrieta, V. Parra, A. Bernal, A. Vegas, S. Villanueva, R. Gutiérrez-Osuna, J. A. de Saja. *Fusion of Three Sensory Modalities for the Multimodal Characterization of Red Wine*. IEEE Sensors Journal, 4 n° 3 (2004) 348-354

medir los tres parámetros de interés en un vino: color, olor y sabor. El color se mide con sensores ópticos formado por LED, el olor con sensores orgánicos comerciales de Figaro y el sabor con voltametría cíclica con electrodos de polímeros. Las pruebas se han realizado con seis vinos Españoles, tres Riojas y tres de Ribera del Duero. La combinación de la información de todos los sensores ofrece una buena discriminación e información de las características del vino analizado.

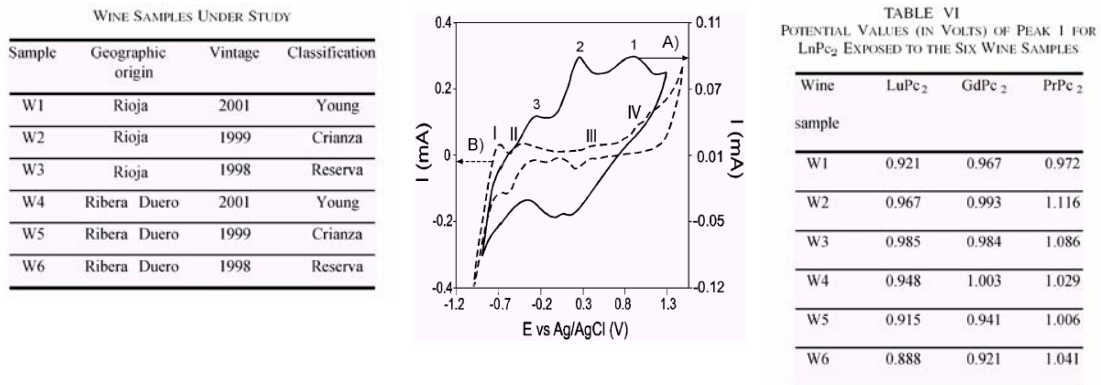


Figura 52. Resultados análisis vinos con voltametría cíclica

Otras de las aplicaciones realizadas con electrodos de pasta de carbón es el análisis de aceites vegetales.²³⁵ El polvo de carbón es mezclado con seis tipos de aceites vegetal para hacer el material apto para aplicar técnicas voltamétricas. Las características observadas en los voltogramas son un reflejo de las propiedades redox de los componentes electroactivos (principalmente antioxidantes) presentes en los aceites internados en la pasta de carbón. Los diferentes contenidos en polifenoles permiten una discriminación de muestras de diferentes aceites, desde oliva a girasol y de diferentes calidades. En otra experiencia realizan una discriminación de nueve aceites de oliva virgen según su grado amargor²³⁶.

Es de destacar el uso de un método propio para reducir la gran cantidad de información que ofrece las curvas voltamétricas, para ello utilizan funciones

²³⁵ C. Apetri, M. L. Rodríguez-Méndez, J. A. de Saja. *Modified carbon paste electrodes for discrimination of vegetable oils*. Sensors and Actuators B, 111-112 (2005) 403-409.

²³⁶ C. Apetri, 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 (2006) 567-575.

matemáticas (kernels) que capturan la información de las características dinámicas de la respuesta global²³⁷.

2.3 OTRAS LENGUAS ELECTRÓNICAS VOLTAMÉTRICAS

Otros grupos de investigación han utilizado la técnica de Voltametría Cíclica para obtener una lengua electrónica, como el *Jet Propulsion Laboratory* (California)²³⁸ para evaluar la calidad del agua midiendo la concentración de diversos iones. Los sensores utilizados son 20 electrodos comerciales: ion-selectivos, conductividad, temperatura y potencial Redox. Este sistema se ha desarrollado para el control de los niveles máximos de contaminación del agua potable de la Estación Espacial Internacional Alpha.

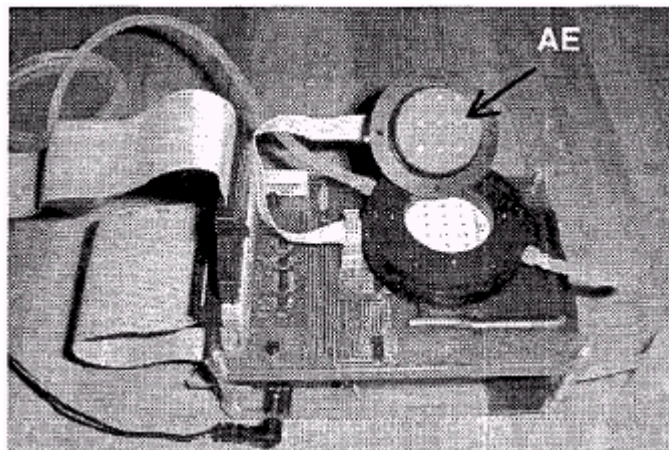


Figura 53. Sistema de medida creado por *Jet Propulsion Laboratory*, donde se muestra la cámara de trabajo y los nueve electrodos auxiliares

Las técnicas utilizadas son la Voltametría Cíclica, medida de la corrosión y Voltametría de Desprendimiento Anódico (ASV). El sistema incluye 20 electrodos ion-selectivos, un sensor de conductividad, un sensor de temperatura y un sensor de potencial oxido-reducción. Los iones objetivos son K^+ (340 mg/L), Ca^{2+} (30 mg/L), Mg^{2+} (50 mg/L) y Cl^- (200 mg/L), que representan para la NASA los niveles máximos de contaminación del agua potable. Los electrodos se fabricaron sobre substratos cerámicos formando una matriz de 3x3 celdas. Cada celda estaba formada por electrodo

²³⁷ R. Gutiérrez-Osuna, H. Troy-Nagle. *A method for evaluating data-preprocessing techniques for odour classification with an array of gas sensors*, IEEE Trans. Syst. Man Cybernetics B 29 (1999) 626-632.

²³⁸ M. Buehler, G. Kuhlman, D. Keymeulen. *Advanced Electronic Tongue Concept*. IEEE Aerospace Conference 2002.

de trabajo y otro electrodo de Referencia. A su vez, cada electrodo está formado por dos partes, el primero utiliza Pd (12%) y Ag (88%) y el segundo con Au. Los dos electrodos se imprimen sobre un substrato de alúmina de 1 mm de grosor y 96% de pureza. Después de impresos los electrodos se queman en aire a 840 °C. También se incorporan nueve electrodos auxiliares de Au/Ni. El termómetro está formado por una tira impresa de RuO₂.

El sistema fue posteriormente mejorado con la incorporación de una matriz de celdas galvánicas para investigar la corrosividad de las disoluciones acuosas²³⁹.

3 LENGUAS ELECTRÓNICAS AMPEROMÉTRICAS

Un reciente sistema de sensor electroquímico amperométrico, se ha utilizado para el desarrollo de lenguas electrónicas. El Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Milán (Italia) ha presentado diversas experiencias de evaluación de muestras utilizando un sistema de flujo de inyección (FIA) con un detector amperométrico con 8 alambres de oro y platino. El sistema trabaja de forma similar a un equipo voltamétrico, con electrodo auxiliar de platino y electrodo de Ag/AgCl como electrodo de pseudoreferencia²⁴⁰. Este sistema se ha utilizado en combinación de otros, como nariz electrónica²⁴¹ para la clasificación de vinos, y además con análisis de espectrografía para aplicaciones similares.²⁴² En este caso la predicción de las descripciones sensoriales del vino se logró aplicando modelos de regresión con Algoritmos Genéticos.

Otras aplicaciones de la combinación de lengua electrónica con nariz electrónica y análisis químicos son la evaluación de las condiciones de almacenamiento del aceite de

²³⁹ M. Kolody, M. Buehler, L.M. Calle. *Response of a Galvanic Cell Array to Corrosive Solutions in an Advanced Electronic Tongue for Substances Explorers*. IEEE, (2003).

²⁴⁰ M. Scampicchio, S. Benedetti, B. Brunetti, S. Mannino. *Amperometric Electronic Tongue for the Evaluation of the Tea Astringency*. *Electroanalysis*, 18 (2006) 1643 – 1648.

²⁴¹ S. Buratti, S. Benedetti, M. Scampicchio, E.C. Pangerod. *Characterization and classification of Italian Barbera wines by using an electronic nose and an amperometric electronic tongue*. *Analytica Chimica Acta* 525 (2004) 133-139.

²⁴² S. Buratti, D. Ballabio, S. Benedetti, M. S. Cosio. *Prediction of Italian red wine sensorial description from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models*. *Food Chemistry*, 100 (2007) 211-218.

oliva virgen²⁴³ concluyendo que con solo los datos de la nariz electrónica se obtiene la misma clasificación que son los tres métodos juntos. Una última aplicación consiste en la evaluación de la astringencia del te.

4 LENGUAS ELECTRÓNICAS POR VARIACIÓN DE IMPEDANCIA

La espectroscopía de impedancia es una herramienta útil para investigar las interacciones entre analitos y los materiales que componen los elementos sensibles. Los sensores de este tipo están formados por materiales que al introducirse en la muestra a analizar modificando su impedancia eléctrica.

El grupo de investigación formado por miembros del *EMBRAPA Instrumentação Agropecuária* de São Carlos (Brasil) y del *Laboratorio de Microelectrónica del Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos* de la *EPSUP* de São Paulo (Brasil) ha presentado lenguas electrónicas formadas por diversas capas superpuestas de distintas substancias.

El sistema está formado por seis elementos estructurados en capas de polímeros conductores (ácido esteárico, polianilina, polipirrol, etc.). Estas capas se depositan sobre electrodos interdigitados por técnicas de Langmuir-Blodgett²⁴⁴.

La principal ventaja que ofrecen tales electrodos son el incremento de la sensibilidad y la selectividad así como la posibilidad de suprimir reacciones de interferencia. En tales sensores, las membranas poliméricas actúan como una matriz de soporte para inmovilizar moléculas específicas. En la Figura 54 se muestra el circuito equivalente del sistema, donde la película que cubre el electrodo está representando por el paralelo de los condensadores C_b y G_b. Estos dos componentes están en serie con la **impedancia del electrolito** que contiene otros tres componentes: la capacidad geométrica del espacio entre-electrodo relleno con electrolito (C_g); la capacidad de

²⁴³ 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

²⁴⁴ A. Riul Jr. A.M. Gallardo, 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.

doble capa (Cd), que es cargada por la conductancia de disolución (Gd); y la conductancia total del electrolito representado por (Gd+Gt). Gt permite la transferencia de carga a través de la interfase film-electrolito.

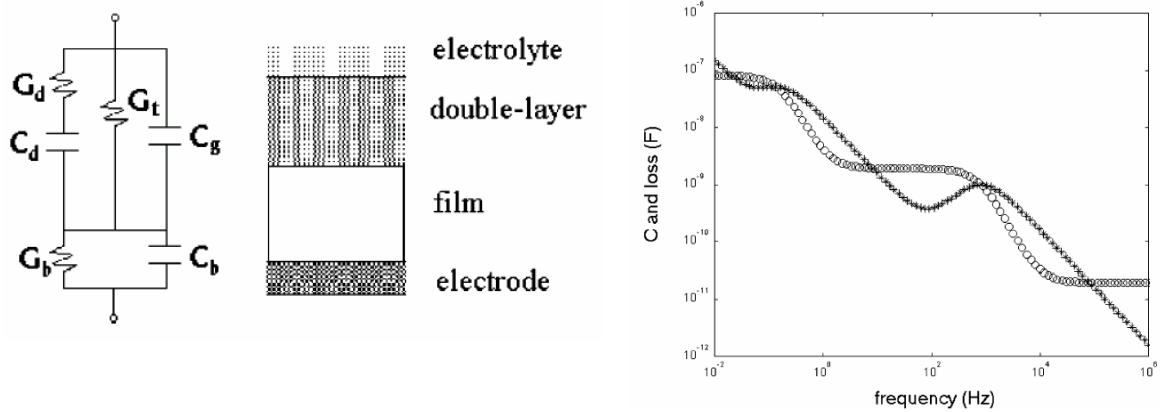


Figura 54. Circuito equivalente de un electrodo de metal cubierto con un film grueso conductor

La Figura 54 representa la dependencia de la capacidad total (C) del circuito equivalente y la pérdida dieléctrica (G/w) respecto a la frecuencia. A bajas frecuencias existe un dominio del efecto de la doble capa, a frecuencias medias aparecen los efectos del material de cubierta y a frecuencias altas la impedancia del sistema es dominada por capacidad geométrica resultante. Es decir, con el análisis de la función Capacidad - Frecuencia se puede determinar y discriminar el tipo de electrolito. Para comprobar su sensibilidad realizaron experiencias con agua, té y café.

El sistema ha tenido diversas modificaciones, como la combinación de películas delgadas de polímeros conductores con materiales similares a lípidos, de esta forma son capaces de identificar sabores por debajo del umbral humano en sustancias no electrolíticas como la sacarosa²⁴⁵. También se ha incorporado a las capas complejos de Rutenio y películas auto-ensambladas de un polímero que contienen azobenceno para distinguir diferentes tipos de aguas de coco, siendo capaz de detectar NaCl y sacarosa en concentraciones inferiores al umbral humano²⁴⁶.

²⁴⁵ A. Riul Jr, R.R. Malmegrim, F.J. Fonseca, L.H.C. Mattoso. *An artificial taste sensor based on conducting polymers* Biosensors and Bioelectronics, 18 (2003) 1365-1369.

²⁴⁶ A. Riul Jr, D.S. dos Santos Jr., K. Wahnath, R. Di Tommazo, A.C.P. Carvalho, J.F. Fonseca, O.N. Oliveira Jr., D.M. Taylor, L.H.C. Mattoso. *Artificial Taste Sensor: Efficient combination of sensors*

Otra modificación significativa es la creación de una lengua electrónica formada por solo dos unidades, una barra de oro y una fina capa de quitosan aplicada por el método de capa a capa²⁴⁷. El quitosan es un material útil por su bajo coste y su afinidad a metales, hidrocarburos aromáticos, proteínas, etc. De esta forma es capaz de distinguir sabores básicos.

Las aplicaciones con esta estructura de lengua electrónica se han enfocado a la detección de contaminantes inorgánicas en sistemas líquidos. Además, el sensor puede detectar la disminución de la acidez por dulzor, mostrando similitud con los sistemas biológicos. La aplicación principal de esta lengua electrónica es la clasificación de vinos tintos según su clase, región y añada, para ello hacen uso de redes neuronales artificiales.

Recientemente, otros grupos de investigación también han trabajado con sensores de impedancia para realizar sistemas de lengua electrónica. Así, han publicado los resultados de experiencias con matriz de sensores realizados con composite, basado en nanotubos de carbono o carbón disperso sobre polímeros y con determinados elementos dopantes. Se utilizaron para discriminar diferentes soluciones con los cinco sabores básicos por medio de PCA para detectar y eliminar errores (*outliers*) y análisis lineal discriminante (LDA) para realizar la clasificación de las muestras^{248, 249}.

5 LENGUAS ELECTRÓNICAS CON TÉCNICAS DE ONDA ACÚSTICA DE SUPERFICIE (SAW)

Los microsensores acústicos se utilizan para detectar propiedades de los líquidos y gases relacionadas con parámetros físicos como la densidad y viscosidad. La interacción de un analito químico con la superficie del sensor produce un cambio de las

made from Langmuir-Blodgett films of conducting polymers and a Ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene-containing polymer. Langmuir, 18 (2002) 239-245.

²⁴⁷ D. dos Santos Jr, A. Riul Jr, R. Malmegrim, F. Fonseca, O. Oliveira Jr, L. Mattoso. *A layer-by-layer film of chitosan in a taste sensor application.* Macromolecular Bioscience, 3 (2003) 591-595.

²⁴⁸ G. Pioggia, F. Di Francesco, A. Marchetti, M. Ferro, A. Ahluwalia. *A composite sensor array impedentiometric electronic tongue Part I. Characterization.* Biosensors and Bioelectronics (2006) Artículo en prensa.

²⁴⁹ 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 (2006) Artículo en prensa.

características de propagación de la onda. Los sensores SAW de ondas Reyleigh son los dispositivos más utilizados para sensores de gas, mientras que las de tipo SH (*Shear Horizontal*) son la alternativa más clara para elementos líquidos (capítulo 2) En este caso, el desplazamiento de las partículas es paralelo a la superficie y perpendicular a la dirección a la dirección de propagación de la onda. Se han creado modelos de comportamiento de la interfase sensor-líquido aplicado para la clasificación de diversos tipos de aguas embotelladas²⁵⁰.

El grupo de investigación de la Escuela de Ingeniería de la Universidad de Warwick (Coventry) fue de los pioneros en la investigación de narices electrónicas con SAW, pero también han presentado una lengua electrónica a partir de un sistema SH-SAW para medidas de parámetros eléctricos del líquido de muestra²⁵¹. Este objetivo se logra a través de una configuración de línea de retardo dual, una cortocircuitada y otra dejada libre.

El dispositivo se fabricó sobre substratos de $\text{LiTaO}_3/\text{LiNbO}_3$. Posee como elementos esenciales el transductor interdigital (IDT) que convierte energía eléctrica en energía mecánica, y viceversa, para la generación y detección de las ondas acústicas de superficie.

La superficie del dispositivo posee un campo eléctrico asociado que se propaga varios micrómetros dentro del líquido. Esta interacción eléctrica (también llamada interacción acústico-eléctrica) con el líquido afecta a la velocidad y/o atenuación de propagación del SH-SAW y se utiliza para detectar las propiedades dieléctricas de los líquidos. Las experiencias se realizaron sobre distintos tipos de leches, logrando una discriminación las muestras de leche según su contenido en grasa, y según el deterioro cuando las muestras se almacenan a temperatura ambiente. En otro artículo presentan los resultados realizados con muestras sintéticas de los cuatro sabores básicos²⁵².

²⁵⁰ A. Campitelli, W. Wlodarski, M. Hoummady. *Identification of natural spring water using shear horizontal SAW based sensors*. Sensors and Actuators B, 49 (1998) 195-201.

²⁵¹ M. Cole, G. Sehra, J. Gardner, V. Varadan. *Fabrication and Testing of Smart Tongue Devices for Liquid Sensing*. Proc. IEEE Sensors 2002, Florida, 12-14 June 2002,

²⁵² 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.

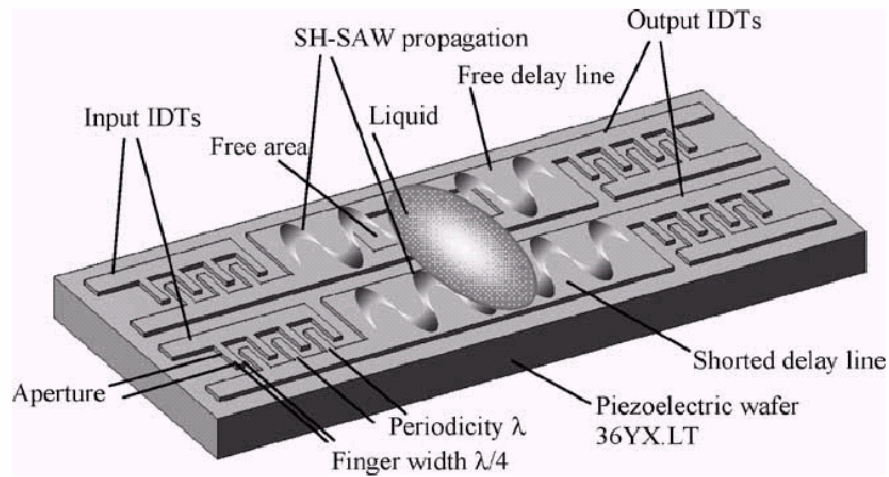


Figura 55. Esquema del sensor de línea de doble retraso SH-SAW

6 LENGUAS ELECTRÓNICAS CON MICROBALANZAS DE CRISTAL DE CUARZO (QCM)

Las microbalanzas de cristal de cuarzo (QCM) son dispositivos piezoeléctricos, formado por un delgado disco de cuarzo en corte AT con electrodos a sus lados. Debido a las propiedades piezoeléctricas del cuarzo se produce una deformación de su superficie. Una de las aplicaciones analíticas del cristal piezoeléctrico fue como detector de gases y vapores²⁵³ y posteriormente como sensor de líquidos fundamental para la obtención de biosensores²⁵⁴.

Las investigaciones realizadas por el *Instituto de Sensores y Microsistemas (IMOS)* de la *Universidad Otto-von Guericke* de Magdeburgo (Alemania) son la que han llevado este sistema de medida a utilizarse en lenguas electrónicas, fundamentalmente cuando comprobaron la posibilidad de detectar propiedades de los líquidos y especialmente

²⁵³ G.G. Guilbault, J.Jordan. *Analytical uses of piezoelectric crystals*. CRC Re. 19 (1988) 1-8.

²⁵⁴ C. Köblinger, S. Drost, F. Alberl, H. Wolf, S. Koch, P. Woias. *A quartz crystal biosensor for measurement in liquids*. *Biosensors Bioelectron.*, 7 (1992) 397-404

analitos en el rango de ppm, creando un modelo de comportamiento,²⁵⁵ que se muestra en la **Figura 56**

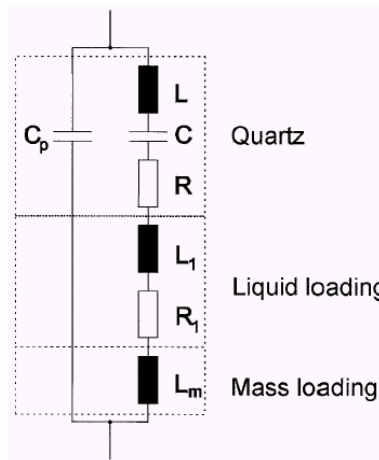


Figura 56. Circuito equivalente de QCM y cubierta inmerso en líquido

Posteriormente crearon un sistema para la detección de contaminantes orgánicos del agua por medio de un QCM cubierto con diversos polímeros hidrofóbicos y realizando una comparación entre ellos.²⁵⁶ Pero la realización de una lengua electrónica surge cuando utilizan varios QCM cubiertos con capas de distinto material y con los resultados realizan análisis multivariante (PCA) en una experiencia de detección de diversos tipos de hidrocarburos en agua del mar²⁵⁷. Posteriormente se ha creado una matriz con varios QMB en un simple bloque de cuarzo con corte en AT, cada uno cubierto con diferente material y se ha utilizado para comprobar la presencia de tolueno en agua, comprobando que aumenta la frecuencia de resonancia²⁵⁸.

²⁵⁵ J. Auge, P.Hauptmann, J. Hartmann, S. Rösler, R. Lucklum. *New design for QCM sensors in liquids*. Sensors and Actuators B, 24-25 (1995) 43-48.

²⁵⁶ S. Rösler, R. Lucklum, R. Borngräber, J. Hartmann, P. Hauptmann. *Sensor for the detection of organic pollutants in water by thickness shear mode resonators*. Sensors and Actuators, B 48 (1998) 415-424.

²⁵⁷ P. Hauptmann, R. Borngräber, J. Schoeder, J. Auge. *Application of novel sensor electronics for quartz resonators in artificial tongue*. 2000 IEEE/EIA International Frequency Control Symposium an Exhibition.

²⁵⁸ J. Rabe, S. Büttgenbach, J. Schöder, P. Haptmann. *Monolithic miniaturized Quartz Microbalance array and its application to chemical sensor system for liquids*. IEEE Sensors Journal 3 (2002) 361-368

7 LENGUAS ELECTRÓNICAS CON ISFET

El transistor de efecto campo selectivos de iones (ISFET) es un componente que se ha utilizado frecuentemente como sensor en aplicaciones químicas, fundamentalmente como sensor de pH, pero este dispositivo también se ha utilizado en lenguas electrónicas. Así, el *Institut de Microelectrònica de Barcelona* (IMB-CNM-CSIC) ha desarrollado una matriz de sensores químicos formados por seis ISFET, un electrodo de platino interdigitado, para medir la conductividad y el potencial redox, y un sensor de temperatura, todo ello integrado monolíticamente²⁵⁹. Los sensores con ISFET se obtienen depositando diferentes membranas fotocurables sobre sus puertas. El multisensor se utilizó para clasificar 13 diferentes marcas de aguas minerales utilizando varios métodos de reconocimiento de patrones, como HCA (*hierachical clustering analysis*), PCA y clasificación con algoritmo SIMCA que alcanzó un 100% de predicciones correctas.

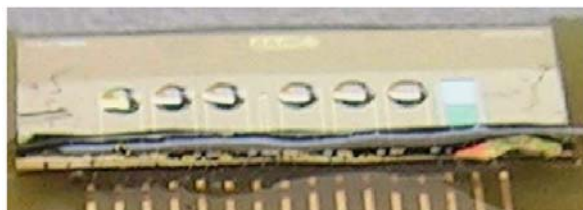


Figura 57. Fotografía del multisensor con ISFET

8 LENGUA ELECTRÓNICA CON SENSORES COLORIMÉTRICOS

Un último tipo de lengua electrónica es aquella que utiliza sensores de color. En algunos casos se ha realizado con colorantes sensibles impresos sobre membranas hidrofóbicas y aplicados para el análisis de varios tipos de cervezas²⁶⁰, Otras investigaciones se enfocan en la construcción de estructuras de micromáquinas

²⁵⁹ L. Moreno, A. Merolos, N. Abramova, C. Jiménez, A. Bratov. *Multi-sensor array used as an "electronic tongue" for mineral water analysis*. *Sensors and Actuators B*, 116 (2006) 130-134.

²⁶⁰ C. Zhang, D. P. Bailey, K. S. Suslick. *Colorimetric Sensor Arrays for the Analysis of Beers: A Feasibility Study*. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4925-4931.

consistente en cavidades que incrusta granos de polímeros sensibles a la radiación óptica por medio de dispositivos CCD²⁶¹.

9 SISTEMAS DE LENGUA ELECTRÓNICA COMERCIALES

Además del sistema presentado por la empresa *Anritsu Corp* a partir de los sensores de lípidos desarrollados por K. Toko y que ha sido presentado en el punto 1.1 de este capítulo, han aparecido en el mercado otros sistemas de lenguas electrónicas comerciales.

La empresa francesa Alpha-MOS²⁶² ha presentado un sistema de lengua electrónica comercial para el control de calidad de alimentos, bebidas y medicamentos bajo el nombre de α -ASTREE. Este sistema detecta moléculas poco volátiles (responsables del gusto) y tiene como principal aplicación la medida objetiva y precisa de la amargura de los productos farmacéuticos y la eficiencia de los cambiadores de sabor. Normalmente, estas medidas son difíciles de medir debido a la toxicidad de los compuestos farmacéuticos y a las fatigas y subjetividad de los panelistas de sabor. El sistema α -ASTREE con automuestreo de 16 posiciones permite una rápida comparación con referencia estándar para obtener indicadores de nivel de amargura. El análisis se logra por medio de una matriz de sensores, que el fabricante no especifica como están contruidos. Se han realizado experiencias para determinar el nivel de sabor dulce necesario para enmascarar el sabor amargo de algunos productos.²⁶³ Con el sistema, desarrollado por esta empresa se ha publicado trabajos de investigación sobre zumos de manzana²⁶⁴.

²⁶¹ Y. S. Sohn, A. Goodey, E. V. Anslyn, J. T. McDevittb, J. B. Shearb, D. P. Neikirk *A microbead array chemical sensor using capillary-based sample introduction: toward the development of an "electronic tongue"*. *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 303-312.

²⁶² <http://www.alpha-mos/proast.htm>.

²⁶³ J. Y. Zheng, M. P. Keeny. *Taste masking in pharmaceutical formulation development using an electronic tongue*. *International Journal of pharmaceutics*, 310 (2006) 118-124.

²⁶⁴ R. Bleimaum, H. Stone, T Tan, S. Labreche, E. Saint-Martin, S. Isz. *Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apples juices*. *Food Quality and Preference* 13 (2002) 409-422.



Figura 58. Sistema α -ASTEE comercializado por Alpha-MOS

Capítulo 5. Experiencias en Medio Acuoso

En los capítulos anteriores de la presente memoria de la tesis doctoral se han presentado los conceptos de lengua electrónica, las etapas que la constituyen, el tipo de cálculos que se utilizan y cual ha sido el desarrollo histórico de las lenguas electrónicas. Posteriormente, se ha presentado el sistema de medida desarrollado para realizar las medidas correspondientes a las experiencias de la presente tesis. A partir del presente capítulo se va a describir dichas experiencias, los resultados obtenidos y su análisis.

El sistema de lengua electrónica potenciométrica que se presenta se ha aplicado para el análisis de medios líquidos de distinto tipo, desde disoluciones preparadas en un laboratorio, hasta medios complejos como alimentos de origen animal, como carnes o pescados. En este capítulo se presentan los primeros estudios realizados, tomando como base disoluciones acuosas y en los siguientes capítulos se presentan las experiencias con otros tipos de muestras. En cada una de estas experiencias, se realizará una pequeña introducción sobre el interés de realizar el análisis, se presentará los elementos utilizados para las medidas, los resultados obtenidos, análisis de los resultados y conclusiones.

1 ANÁLISIS DEL AGUA

En el capítulo 4 de la presente memoria se indicó que el análisis del agua es una de las aplicaciones más comunes de los distintos tipos de lenguas electrónicas presentados por diversos grupos de investigación. El sistema de electrodos potenciométricos se presta claramente para realizar un análisis de diversos tipos de aguas naturales porque éstas poseen sales en disolución de distinto tipo y en diversas concentraciones. Estas ligeras diferencias en los componentes en disolución infieren a cada agua su sabor característico.

1.1 AGUAS POTABLES

Las aguas destinadas al uso alimentario deben responder a determinados requisitos físicos, químicos y bacteriológicos. Desde el punto de vista químico, un agua potable debe ser incolora, inodora, insípida, límpida, aireada y fresca. Químicamente el agua potable debe tener un residuo fijo (sales disueltas) comprendido entre 70 mg/L y 500 mg/L; no debe contener amoníaco, nitritos, niveles elevados de nitratos (sustancias poco dañinas en sí mismas pero que pueden transformarse en nocivos nitritos y nitrosaminas en el proceso de digestión), fosfatos, cloruros ni metales peligrosos para la salud (plomo, mercurio y otros). Desde el punto de vista bacteriológico, no deben contener más de 100 gérmenes por centímetro cúbico ni, en definitiva, ningún germen patógeno.

Las aguas potables pueden ser de diverso origen, y según ello reciben distintos nombres, que en ocasiones son dados a la confusión. Son conocidas las expresiones de: aguas de manantial, mineral, mineral natural, potabilizada, filtrada, etc.

Las aguas de manantial son aguas potables de origen subterráneo pero que previamente a su consumo precisan la aplicación de unos mínimos tratamientos físicos para la separación de materiales no deseables.

Las aguas minerales naturales se obtienen también de manantiales con gran pureza original y con naturaleza mineral variable. Su origen subterráneo protege el acuífero de contaminaciones químicas o bacterianas. Según el contenido global en minerales, o de algunos de ellos, se distinguen varios tipos de agua mineral natural: Mineralización muy débil (residuo seco hasta 50 mg/L), débil (residuo seco hasta 500 mg/L), fuerte (residuo seco superior a 1500 mg/L, bicarbonatadas, sulfatadas, cloruradas, cálcicas, fluoradas, sódicas, magnésicas, ferruginosas, etc.

Las aguas potabilizadas suelen proceder de ríos o manantiales y son tratadas por un proceso de potabilización para la eliminación de microorganismos. Por medio de la red pública de abastecimiento llega al consumidor final a través de los grifos. El agua potable suele diferir de una ciudad a otra. Los parámetros de distinción suelen ser el contenido de minerales (cloruros, sulfatos, bicarbonatos, calcio, magnesio, sodio) y la dureza (concentración de iones alcalinotérreos en disolución). Las aguas de las ciudades

de la costa de Valencia tienen un nivel alto de minerales, con altos valores de conductividad.

El agua filtrada es aquella tratada por un filtro para separar y retener las partículas en suspensión indeseables que pueda contener el agua, pero dejando el paso del líquido. El tipo de filtro más común es el que realiza la osmosis inversa, obteniendo agua osmotizada. Se define la osmosis como la tendencia de un disolvente a pasar hacia otra disolución más concentrada separadas por una membrana semipermeable. Realmente los conceptos de filtración y osmosis no son iguales, porque la filtración separa partículas en suspensión mientras que la osmosis separa iones disueltos.

Si se ejerce sobre la disolución una presión externa superior a la osmótica, se produce una inversión del flujo a través de la membrana; es decir, un paso del disolvente desde la disolución concentrada hasta la diluida. Este fenómeno recibe el nombre de osmosis inversa y se utiliza para la desalación o depuración de aguas. El proceso de desalación requiere unas 25 atm de presión sobre el agua salada, lo que dificulta su aplicación a gran escala. En la depuración de aguas se emplean membranas cuyo poro no supera las 0,0001 μm , lo que impide el paso de la práctica totalidad de los sólidos en suspensión, incluidos las bacterias y los virus.

2 OBJETIVO DEL ANÁLISIS

El objetivo del experimento es comprobar la validez del sistema de lengua electrónica para la discriminación de diferentes tipos de aguas. En medidas previas se comprobó que los electrodos potenciométricos metálicos contruidos en capa gruesa generaban un potencial eléctrico que variaba según el tipo de muestra de agua.

Para conseguir el objetivo de este experimento se tomaron 6 tipos de agua mineral envasada en España, 2 tipos de agua del grifo de dos ciudades diferentes (Valencia y Sagunto) y otra de agua osmotizada. Los nombres comerciales y las concentraciones de los principales minerales que proporcionan los responsables de las marcas en la etiqueta de la botella, en mg/L, son las que indican en la **Tabla 3**

	CO_3H^-	SO_4^{-2}	Cl^-	Ca^{+2}	SiO_2	Mg^{+2}
Primavera	295,3	43,0	39,7	86,6	6,9	23,3
Solán	285,8	21,3	7,9	58,3	7,0	25,1
Liviana	252,4	21,3	2,1	62,1	No Datos	18,2
Lanjarón	145,8	38,1	No Datos	38,1	No Datos	11,4
Font Vella	135	11,6	6,9	33,5	No Datos	6,6
Bezoya	10,4	No Datos	0,7	2,1	11,2	0,3

Tabla 3. Concentración de sales (mg/L) según indicación de las empresas envasadoras

2.1 ELECTRODOS

En pruebas previas se emplearon diversos tipos de electrodos, variando el tipo de material utilizado y la forma de presentación y agrupación. Se comenzó utilizando electrodos individuales, que ya se habían utilizado en sensores de pH, constituidos por pastas resistivas de óxido de rutenio. También se utilizaron diversas pastas conductoras formadas por metales, fundamentalmente plata, paladio, platino, etc. En cuanto a la disposición de los electrodos, uno de los problemas básicos era evitar el contacto entre los diversos electrodos, así como asegurar un buen contacto con la muestra de forma segura y cómoda. Para ello, se construyó diversos sistemas para lograr el alojamiento de los electrodos, tal como muestra la **Figura 59**, donde un sistema con múltiples electrodos ubicados bajo la tapa del recipiente que contenía la muestra. Los electrodos están, colocados de forma concéntrica respecto al orificio central donde se introducía el electrodo de referencia. Este sistema funcionaba adecuadamente pero no era suficientemente compacto.



Figura 59. Prototipo inicial de sistema multielectrodo

El sistema que finalmente fue elegido es un sistema híbrido de sensores, formado por electrodos en tecnología de capa gruesa y por electrodos individuales metálicos. Se realizaron pruebas preliminares con diversos tipos y cantidades de electrodos para determinar cuales eran los materiales más apropiados para realizar la experiencia final.

2.1.1 Multielectrodo en Tecnología de Capa Gruesa

El sistema definitivo de sensores estuvo constituido por un multielectrodo formado por un total de 9 electrodos formados con pastas de los siguientes materiales activos: platino, oro, carbón, cobre, níquel, plata-paladio (Ag/Pd), aluminio y dos de óxido de rutenio (RuO_2), una con resistividad de $10 \Omega/\text{Cuadro}$ y otro de $1 \text{ M}\Omega/\text{Cuadro}$.

La construcción del multielectrodo se realizó sobre una base aislante de alúmina (Rubalit 708S suministrado por *Ceram Tec.*) de tamaño $50,8 \text{ mm} \times 25,4 \text{ mm}$ ($2'' \times 1''$) y de espesor $0,625 \text{ mm}$. El proceso de construcción se realizó en tres fases, que quedan esquematizadas en la **Figura 60**

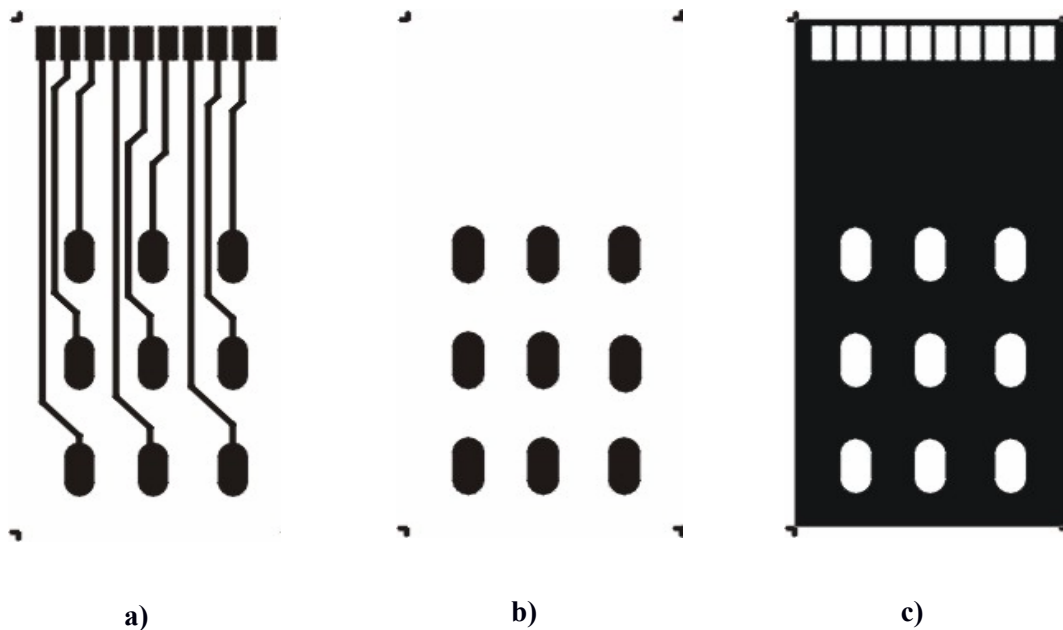


Figura 60. Fotolitos de las 3 capas del multielectrodo a) Conductor b) Activa c) Aislante

La primera etapa consiste en la deposición de la capa conductora, compuesta por una pasta de Ag/Pd. Esta capa sirve tanto como base de los electrodos como de líneas de conexión de la señal desde el electrodo hasta un extremo de la placa, de forma que permita el uso de un conector de tipo plano. La segunda etapa consiste en la deposición

de la pasta activa de cada uno de los sensores. La distribución de los 9 sensores sobre la placa se realiza en forma de matriz 3x3, tal como indica la **Figura 60-b**. No todas las pastas se depositan al mismo tiempo porque la temperatura y los tiempos de secado y quemado varían según el tipo de pasta. Se empieza por las pastas de temperatura de quemado mayor y se continúa en orden descendiente de la temperatura. Para depositar la pasta de cada electrodo sin afectar al resto, se oculta las ventanas de aquellos electrodos que no se van a depositar la pasta. Una vez depositada todas las pastas activas con sus correspondientes procesos de secado y quemado (o curado), se ejecutó la tercera etapa, que consiste en aplicar una capa de pasta con características dieléctricas para realizar una misión aislante y protectora. Los tipos pasta y su temperatura de quemado quedan reflejados en la **Tabla 4**

<i>Nombre Electrodo</i>	<i>Elemento Activo</i>	<i>Fabricante pasta</i>	<i>Modelo</i>	<i>Tª Quemado</i>
Ru10	RuO ₂ (10Ω/cuadro)	HERAEUS	R8921	700
Ru1M	RuO ₂ (1MΩ/cuadro)	HERAEUS	R8961	700
Cu	Cu	HERAEUS	C7257	850
Ag	Ag	HERAEUS	C1075S	850
Pt	Ag/Pt	HERAEUS	C1076S	850
Au	Au	HERAEUS	C5755A	850
Ni	Ni	GEM	C2000904D4	150
C	C	GEM	C2000802D2	175
	Pasta Protectora	HEREAUS	IP020	80 (2h)
	Pasta Conductora	HEREAUS	C4081T	800

Tabla 4. Pastas utilizadas para la construcción del multielectrodo

La distribución de cada una de las pastas a lo largo de la placa del multielectrodo se representa en la **Figura 61**, donde se indica el nombre que recibe cada electrodo en los siguientes análisis y gráficas.

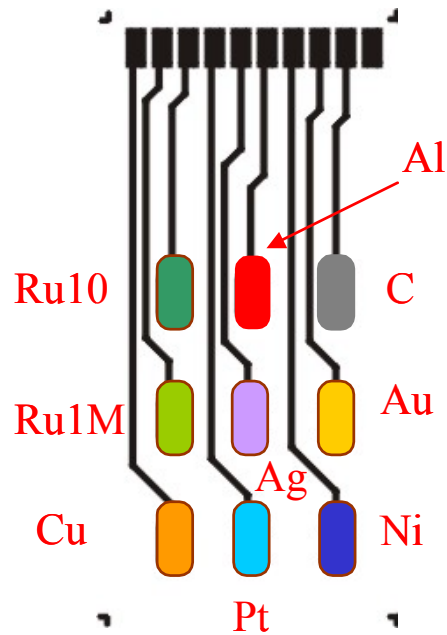


Figura 61. Distribución de las pastas en el multielectrodo

El aspecto final del multielectrodo queda reflejado en la **Figura 62**, donde se puede comprobar su aspecto miniaturizado y compacto. Mayores detalles del proceso de construcción se encuentran explicados en el Anexo I de la presente memoria

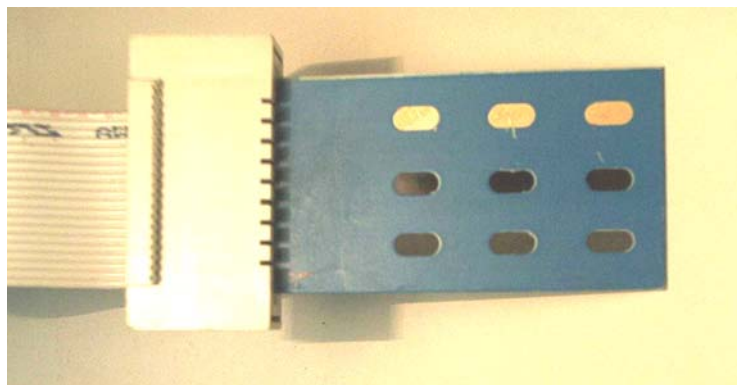


Figura 62. Aspecto final del Multielectrodo para análisis de aguas

2.1.2 Electrodo Individuales

Con el fin de ampliar el espectro de materiales que componen el sistema multielectrodo, además de la placa con sensores fabricados en tecnología de capa gruesa, el sistema de medida incorporó otros electrodos de materiales que no es fácil de encontrar en la pastas de tecnología de capa gruesa, como son el estaño (Sn/SnO) (*Sn*) y

el plomo (Pb/PbO) (*Pb*). También se incorporó un electrodo individual de grafito (*Graf*) para así comparar los resultados con su equivalente en tecnología de capa gruesa. De esta forma el sistema total de medida posee 12 electrodos, 9 en tecnología de capa gruesa y 3 en electrodos individuales. La nominación de los electrodos a lo largo del presente capítulo es la siguiente:

- Multielectrodo de Capa Gruesa: *Ru10, Ru1M, Ag, Pt, Au, Pd, C, Al y Ni*.
- Electrodo Individuales: *Sn, Pb y Graf*.

2.2 PROCESO DE MEDIDA

La experiencia consistió, en primer lugar, en realizar medidas de calibración de los electrodos. Estas medidas sirven como valor de referencia a las medidas con las muestras a analizar. Las medidas de calibración se realizaron sobre una disolución tampón, formada por un 90% de agua destilada + 5% NaCl 0,1 M + 5% de Tampón fosfato pH7. Las medidas se realizaron depositando las muestras en un recipiente de unos 100 mL que se mantiene en movimiento por medio de un agitador magnético a velocidad constante. Para realizar las medidas potenciométricas se incluyó un electrodo de referencia de Ag/AgCl con disolución de KCl 3,5 M. Las medidas se realizaban mediante un muestro automático y continuo cada 5 segundos durante el tiempo necesario para que los electrodos alcancen el equilibrio electroquímico con la muestra a analizar. Se consideraba que se alcanzaba este equilibrio cuando la diferencia entre un muestro y su anterior es de aproximadamente 1 mV durante 3 muestros consecutivos. El tiempo necesario para realizar una medida de este tipo era de unos 10 minutos. Una vez realizada la medida, los electrodos se limpian con abundante agua destilada. Posteriormente se cambia el tipo de muestra siguiendo un orden aleatorio. Cada muestra fue medida en cinco ocasiones. En la **Figura 63** se muestra en ejemplo del aspecto de la pantalla del ordenador con el programa *Agilent VEE-Pro*²⁶⁵ de medidas con distintos tipos de muestras.

²⁶⁵ Agilent VEE-Pro es un producto de Agilent Technologies.

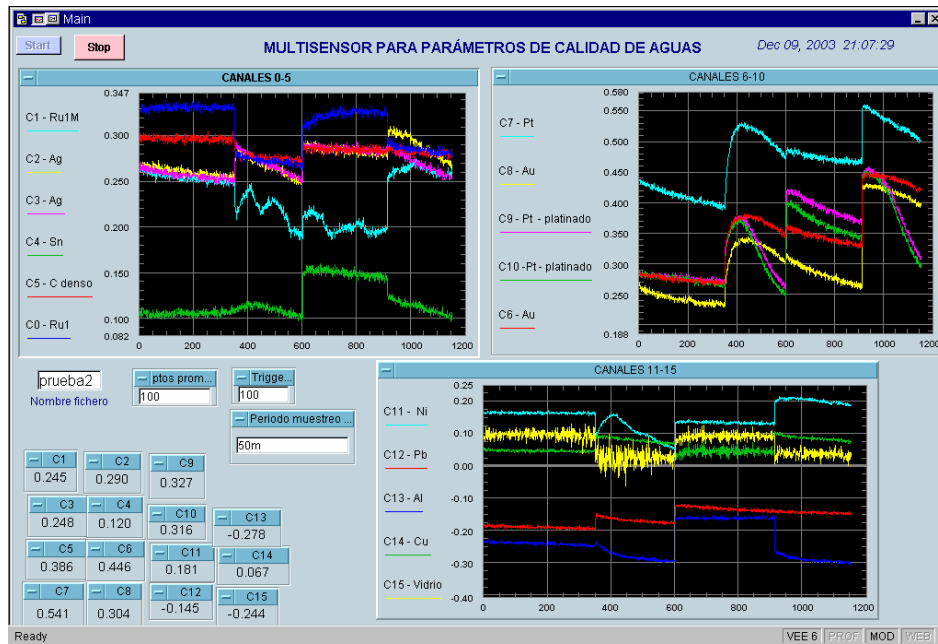


Figura 63. Aspecto de la pantalla de programa *Agilent VEE-Pro* de medidas para distintas muestras

El dato final de cada medida es la media de las 10 últimas medidas, de esta forma se amortiguan los posibles efectos del ruido eléctrico o las variaciones aleatorias de las medidas. A cada medida se resta el valor de la medida del correspondiente electrodo con la disolución patrón.

2.3 RESULTADOS

Los resultados de las medidas se distribuyen en una matriz de datos en formato *Excel*, formada por 12 columnas correspondientes a los 12 electrodos y por 45 filas, correspondientes a las 5 experiencias con los 9 tipos de aguas diferentes. Realizando una representación gráfica de los potenciales de cada electrodo se obtiene las gráficas expuestas en la **Figura 64**. Las medidas de los 12 electrodos se han distribuido en 3 gráficas según la magnitud de potencial eléctrico.

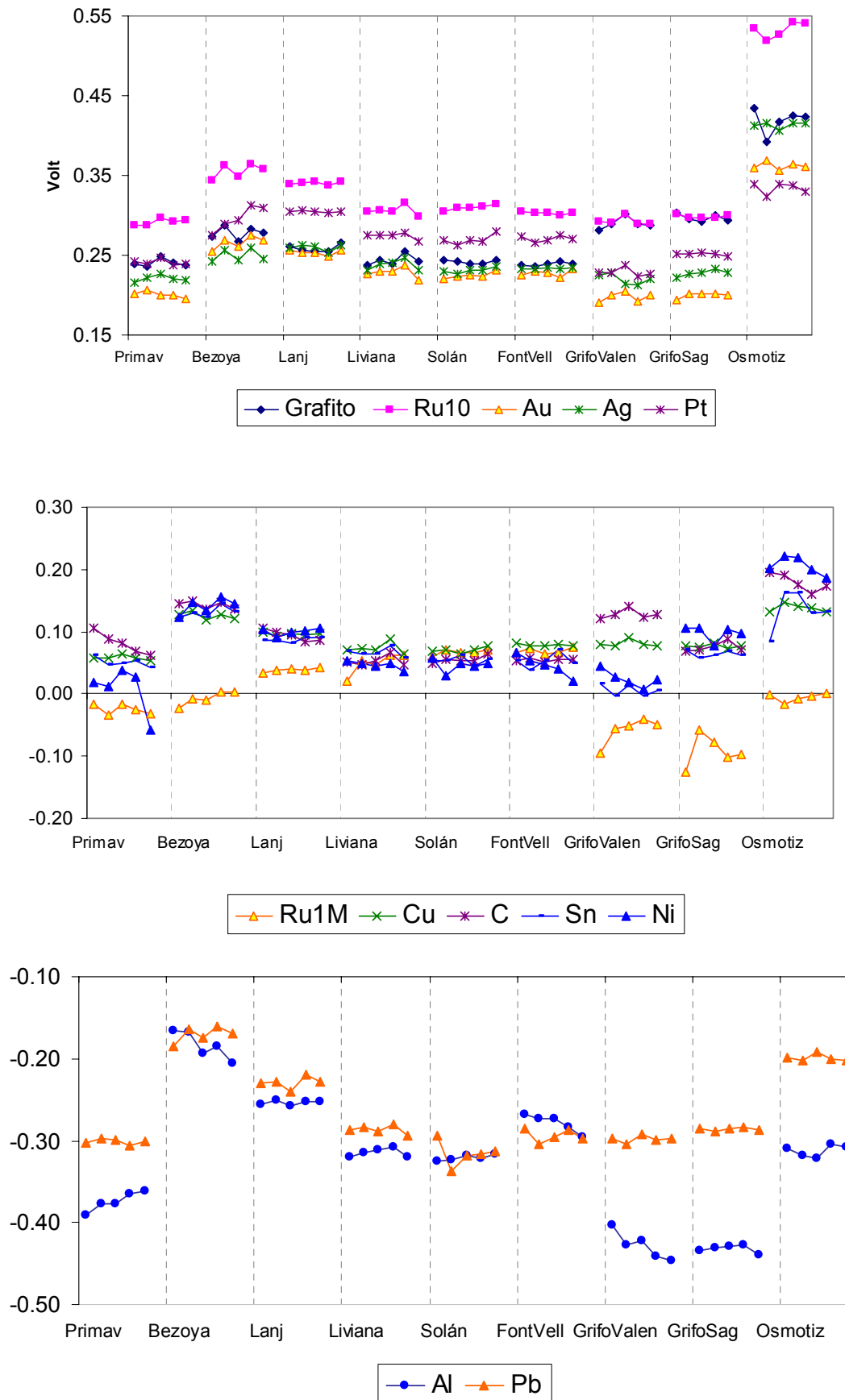


Figura 64. Potenciales de los electrodos para cada una de las muestras

En estas gráficas se puede observar la clasificación de los electrodos según el valor del potencial. En la primera gráfica se han representado los metales nobles (Au, Ag y Pt) que poseen valores de potencial positivo, con un margen de variación para la mayoría de las muestras entre 150 y 350 mV, pero donde muestras de agua osmotizada poseen potenciales que alcanzan valores superiores a 500 mV. Estos electrodos son sensibles al potencial redox de la muestra. La segunda gráfica está compuesta, entre otros, por electrodos de metales no nobles (Sn y Ni) que generan señales con potenciales cercanos a cero, sobretodo con las muestras de agua embotelladas, pero sufriendo una mayor dispersión de valores con las muestras aguas del grifo y osmotizada. La última gráfica representa los valores de dos electrodos con potenciales negativos (Al y Pb) con valores en el entorno de -300 mV. De la observación del conjunto de estas gráficas se puede concluir que los electrodos tienen distinto comportamiento según el tipo de muestra analizada, observando una mayor homogeneidad en algunas de las aguas embotelladas, y una mayor distinción de las aguas del grifo y osmotizada. Este comportamiento es totalmente lógico a raíz de la composición mineral de las muestras.

A la luz de los datos del potencial de los electrodos, es interesante encontrar alguna relación entre el valor del potencial de los electrodos con respecto a la concentración del tipo de ion de las muestras de las aguas. Aunque a simple vista es difícil encontrar alguna relación, con cierto detenimiento se puede observar una relación entre el potencial del aluminio y la concentración de carbonatos (CO_3H^-). Calculando el valor medio del potencial del electrodo de aluminio (Al) de cada tipo de muestra y expresándolas en una tabla se comprueba que posee un ajuste lineal con una buena correlación (0,9161). En la **Figura 65** se muestra esta correlación.

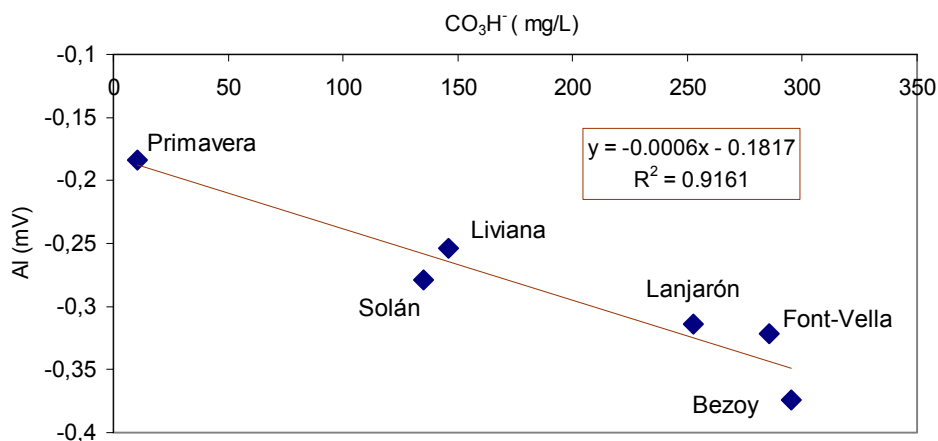


Figura 65. Relación entre la concentración de carbonato y el potencial del electrodo de aluminio

2.4 ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Para obtener una visión global de la capacidad de discriminación del conjunto de los electrodos con las muestras de agua, es conveniente aplicar los métodos de búsquedas de patrones por medio del análisis multivariante. El método de análisis más utilizado en estos casos es el Análisis de Componentes Principales (PCA), que se expuso en el capítulo 3 de la presente memoria.

Para aplicar el análisis PCA la matriz de datos fue capturada y analizada por el programa de análisis matricial *MATLAB* y su programa anexo *PLS_Toolbox*²⁶⁶. De esta forma se comprueba si se obtienen agrupaciones espontáneas de los datos de la matriz.

La representación de las coordenadas de los *scores* de los dos primeros Componentes Principales (PC1 y PC2) del análisis PCA se muestra en gráfica bidimensional de la **Figura 66**. En ella, se puede observar que las muestras están distribuidas formando claras agrupaciones. En un extremo derecho del eje PC1 se encuentran las aguas del grifo y en el extremo izquierdo el agua osmotizada, lo que da a entender que el eje PC1 es proporcional a la cantidad de sales disueltas, ya que la osmotizada tiene muy poca mineralización mientras que la del grifo suele poseer gran

²⁶⁶ PLS_Toolbox es un producto de Eigenvector Research, Inc.

cantidad de minerales. Por otro lado, las aguas embotelladas están cerca entre sí, lo que indica que deben poseer características similares, solo se separan del resto las muestras correspondientes a las marcas *Primavera* y *Bezoya*. Comparando esta gráfica con los valores de la **Tabla 3** se comprueba que el agua de la marca *Bezoya* tiene una mineralización general bastante baja y la de *Primavera* bastante alta.

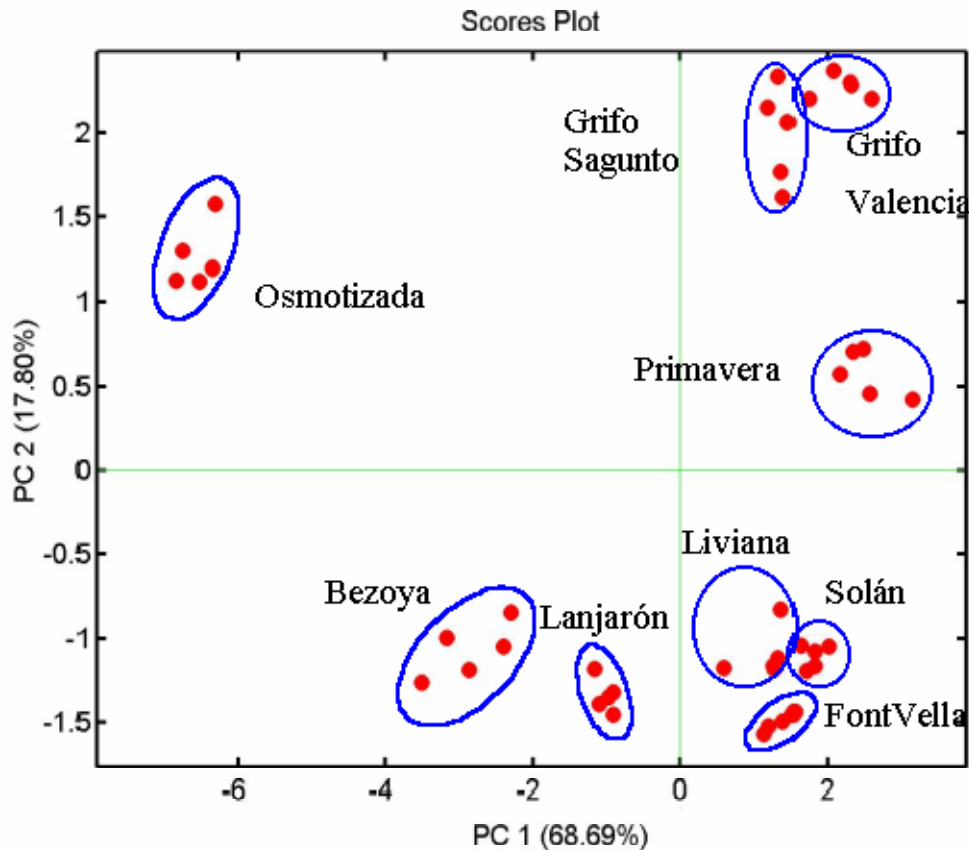


Figura 66. Resultados del análisis PCA con distintos tipos de aguas

Otro resultado de interés que se desprende del análisis PCA es el peso de cada electrodo en los valores de los dos primeros parámetros (PC1 y PC2). Los resultados quedan reflejados en la **Figura 67**. En ella, los puntos que se encuentran cercanos significan que los electrodos poseen un comportamiento similar y aquellos que se encuentran aislados que tienen un comportamiento diferenciado al resto, es decir para el caso que nos ocupa, los electrodos de óxido de rutenio de 1 M Ω (*Ru1M*) y aluminio (*Al*) poseen un comportamiento diferenciado y **ortogonal** respecto al resto de electrodos. Los electrodos de carbón (*C* y *Graf*) también poseen un cierto comportamiento diferenciando, mientras que en la parte izquierda de la gráfica se observan los electrodos

metálicos en posiciones cercanas entre si, lo que indican que hay bastante **correlación** entre ellos.

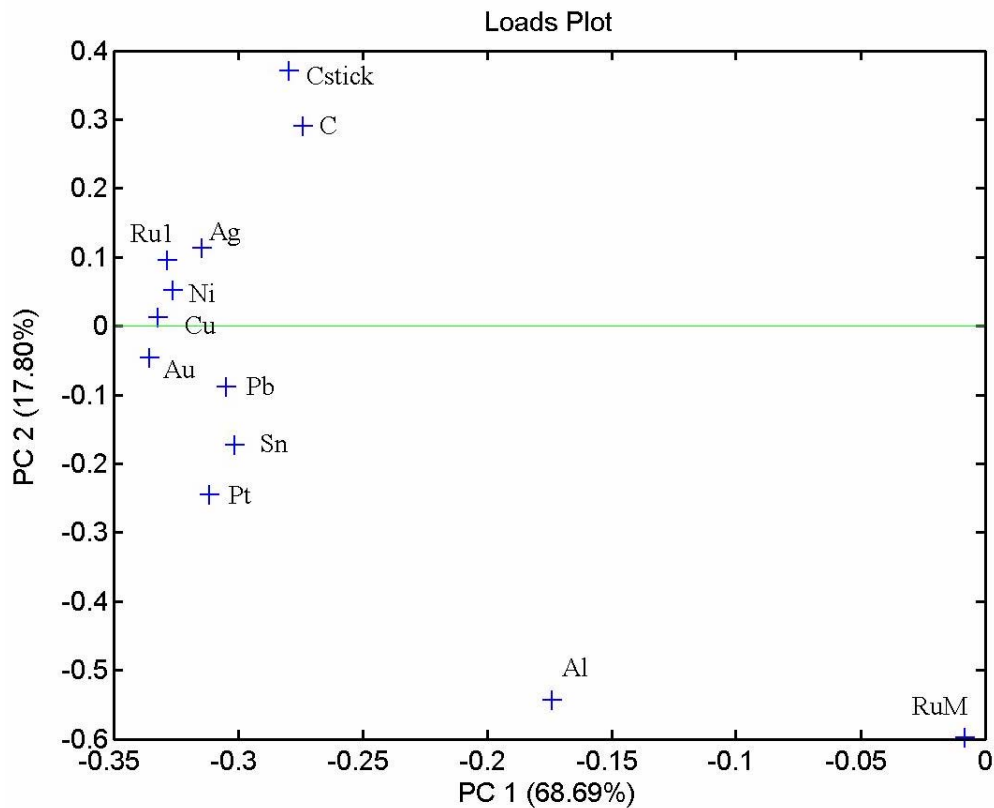


Figura 67. Pesos de cada electrodo en los valores de PC1 y PC2

2.4.1 Análisis Datos de Aguas Embotelladas

Realizando un nuevo análisis PCA pero solamente con los datos de las aguas embotelladas se obtiene una figura similar a la anterior, donde las muestras de las aguas de *Bezoya*, *Lanjarón* y *Primavera* están bien discriminadas y en el resto de las muestras hay cierta confusión y mezcla de *scores*. En esta gráfica también se puede observar una relación entre la concentración de carbonatos (CO_3H^-) y la distribución de los *scores* a lo ancho de la gráfica en forma de diagonal de los ejes PC1-PC2 de forma similar a la indicada en la **Figura 65**

Agua	CO_3H
Primavera	295,3
Solán	285,8
Liviana	252,4
Lanjarón	145,8
Font Vella	135
Bezoya	10,4

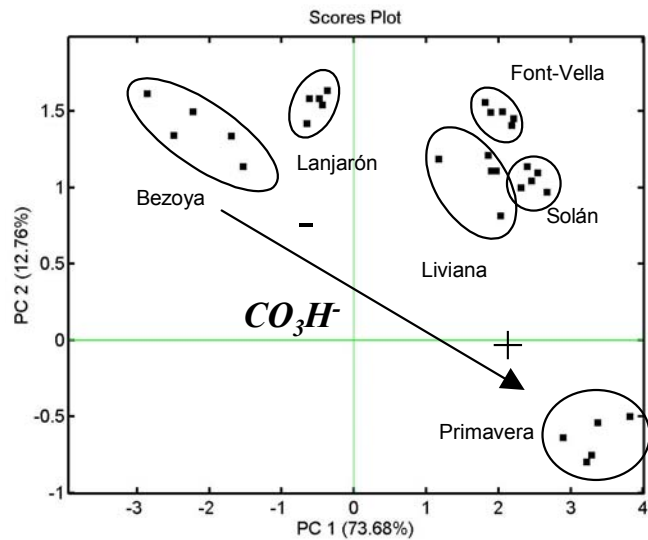


Figura 68. Análisis PCA de las aguas embotelladas

2.5 REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE ELECTRODOS.

La observación de la **Figura 67** sugiere que se podría haber construido un sistema que funcionase de forma similar pero utilizando un número menor de electrodos, de esta forma se obtendría un sistema más cómodo y sencillo de fabricar y utilizar.

La reducción de electrodos se realiza por medio de una selección según la gráfica de los pesos de los electrodos en los valores de PC1 y PC2. Se realizaron diversos tanteos, seleccionando diversos electrodos, pero la selección que ofreció mejor resultados con una disminución sustancial del número electrodos fue la siguiente:

Selección de 7 de los 12 electrodos originales, estos 7 electrodos son: *Ru1M*, *Al*, *C*, *Ru10*, *Au*, *Pb*, *Pt*. Es decir, se han mantenido los dos electrodos que tienen comportamiento ortogonal (*Ru1M*, *Al*), uno de los dos electrodos de carbono (*C*) y 4 del conjunto de los 8 electrodos metálicos con fuerte correlación (*Ru10*, *Au*, *Pb*, *Pt*). Para comprobar la diferencia entre estos electrodos y los originales se realizó un análisis por medio de redes neuronales.

2.5.1 Predicción del Tipo de Muestra

Con cada uno de estos dos conjuntos de electrodos (12 electrodos y 7 electrodos) se ha construido una red neuronal de tipo resonante adaptativo (ART) trabajando en modo supervisado (ARTMAP) de tipo *Fuzzy-Artmap*, cuyas características se exponen

en el capítulo 3 de la presente memoria. Para entrenar y validar la red neuronal se dispone de 45 medidas (9 muestras de agua reproducida 5 veces). Para comprobar los resultados se aplica el método de validación cruzada de orden uno (*leave-one-out*), es decir se entrena la red con todas las medidas menos con una y con la medida que ha quedado fuera se valida la red. Este método se repite tantas veces como medidas existan, dejando fuera cada vez una medida distinta y se comprueba cual es el grado de acierto de la red neuronal (capítulo 3). En nuestro caso la red es entrenada con 44 medidas y probada con el valor que ha quedado fuera para así comprobar si acierta en la predicción. Posteriormente se repite el mismo proceso con otra red neuronal con las medidas con los 7 electrodos elegidos y se realiza una comparación de los resultados de ambas redes neuronales.

Los resultados de las predicciones con las dos redes neuronales se muestran en la **Tabla 5**, en ella se puede observar que los resultados son parecidos para ambas redes neuronales, con 12 electrodos se obtiene una tasa de éxito del 91,1% y con 7 electrodos del 93,3%. Con lo cual se concluye que el índice de predicción es bastante alto y que el sistema se puede reducir de 12 a 7 electrodos con resultados similares.

	Agua Real								
	Primavera	Bezoya	Lanjarón	Liviana	Solán	Font-Vella	Grifo Valencia	Grifo Sagunto	Osmotizada
Predicción usando 12 electrodos									
Primavera	5								
Bezoya		5							
Lanjarón			5						
Liviana				4	1				
Solán				1	3	1			
Font-Vella					1	4			
Grifo Valencia							5		
Grifo Sagunto								5	
Osmotizada									5
Predicción usando 7 electrodos									
Primavera	5								
Bezoya		5							
Lanjarón			5						
Liviana				4	2				
Solán				1	3				
Font-Vella						5			
Grifo Valencia							5		
Grifo Sagunto								5	
Osmotizada									5

Tabla 5. Resultados de las predicciones con Red Neuronal Fuzzy-Artmap

2.6 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE IONES EN AGUA

El último tipo de análisis que se realiza con esta experiencia es la estimación de las concentraciones de iones del agua a partir de los datos de las medidas de los electrodos.

La información de la concentración de iones es la facilitada por los envasadores y queda reflejada en la **Tabla 3**. El tipo de análisis predictivo que se utiliza es el *Partial Least Square* (PLS), para ello se construye un modelo para cada uno de los iones del que se posee información completa en la tabla, es decir: CO_3H^- , SO_4^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} . Mediante un macro de *MATLAB* con *PLS_Toolbox* se realiza primero una validación de cada modelo para determinar el número óptimo de coeficientes (variables latentes).

La precisión de los modelos se realiza por el método de validación cruzada de orden uno (*leave-one-out*). Los resultados de este análisis quedan reflejados en la **Tabla 6**, donde se puede observar que el coeficiente de correlación entre los valores de concentración de iones predichos y los valores reales. Este coeficiente es siempre superior a 0,9 lo que indica una buena correlación. En la tabla también se indica otros parámetros que se utilizan para estimar la precisión del modelo, como son la pendiente y la intercepción (origen) del ajuste lineal entre los valores predichos y los valores reales.

<i>Ion</i>	<i>Nº Var. Lat.</i>	<i>Coef. Correl.</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Origen</i>
CO_3H^-	6	0,954	0,950	9,402
SO_4^-	8	0,913	0,948	1,469
Ca^{2+}	6	0,980	0,975	1,109
Mg^{2+}	6	0,902	0,897	1,549

Tabla 6. Predicciones concentración iones con PLS

Los resultados y análisis de este experimento se han publicado en Revista SCI²⁶⁷ y en Congreso internacional especializado²⁶⁸.

²⁶⁷ R. Martínez-Mañez, J. Soto, E. García-Breijo, L. Gil, J. Ibáñez, E. Llobet. *An “electronic tongue” design for the qualitative analysis of natural water*. Sensors and Actuators B, 104 (2005) 302-307.

²⁶⁸ R. Martínez-Mañez, J. Soto, L. Gil, E. García-Breijo, J. Ibáñez, E. Gadea, E. Llobet. *Electronic tongue for qualitative analysis of waters using thick-film technology*. ISOEN – 11th International Symposium on Olfaction and Electronic Nose – Barcelona 2005.

3 DISCRIMINACIÓN DE DISOLUCIONES PREPARADAS

Una vez realizadas las primeras experiencias válidas de la lengua electrónica con aguas naturales y comprobado que logra una buena discriminación de las muestras según el contenido de su mineralización, el siguiente paso fue determinar cómo afecta el tipo de mineralización de las aguas en el comportamiento del multielectrodo potenciométrico con electrodos metálicos, pero de una forma más controlada, y distinguiendo los iones entre el tipo de **anión** y el tipo de **catión**. Para ello, se realizaron una serie de experiencias con disoluciones acuosas preparadas con contenidos y concentraciones de sales conocidas.

La hipótesis inicial es que el comportamiento de la lengua debe ser distinto según el tipo de anión de la disolución, pero quizás también del tipo de catión. Para comprobar esta hipótesis se realizaron medidas con diversas soluciones de una solo tipo de sal, variando en algunos casos el tipo anión y otros casos el tipo de catión. Se prepararon 10 tipos de disoluciones puras utilizando 5 tipos de aniones y 2 tipos de cationes.

$NaNO_3$	Na_2SO_4	$NaCl$	$NaHCO_3$	NaH_2PO_4
KNO_3	K_2SO_4	KCl	$KHCO_3$	KH_2PO_4

Todas las disoluciones tienen una concentración 0.05M por corresponder aproximadamente a la concentración de sales en aguas de consumo.

3.1 SISTEMA DE MEDIDA

Para realizar las medidas se construyó un multielectrodo en tecnología de capa gruesa utilizando pastas comerciales con los siguientes elementos activos: RuO_2 , Ag, y Cu. El proceso de construcción del multielectrodo fue similar al utilizado en la experiencia anterior. Además se utilizaron otros electrodos en forma de varilla: Au, Pb, Zn y Ni. Es decir, en total se contaban con 7 electrodos todos ellos diferentes, además se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl. El conjunto de electrodos se sumergía en la disolución a analizar contenida en un recipiente de unos 100 mL. Para conseguir la mayor homogeneidad posible de las medidas y su mejor reproducibilidad se procuró construir un entorno estable. Los análisis se realizaron con el recipiente termostatzado a 25°C. Las medidas se realizaron bajo una atmósfera de argon, haciendo pasar el gas

por un tubo que accedía a la parte superior del recipiente. De esta forma, las medidas no estaban afectadas por el oxígeno disuelto en el agua.

Las señales potenciométricas generadas por los electrodos fueron acondicionadas por el sistema electrónico de desarrollo propio que se describe en el Anexo II de la presente memoria. El sistema de adquisición, monitorización y almacenamiento de los datos que se utilizó fue el también descrito en el mismo Anexo II.

El proceso de medida fue similar a la experiencia anterior realizando muestreos de forma continua y automática hasta alcanzar el equilibrio electroquímico entre los electrodos y la muestra a analizar. Después de cada medida se realizaba una limpieza de los electrodos con agua destilada.

3.2 RESULTADOS

En la primera parte de la experiencia se realizaron **tres** medidas para cada una de las disoluciones. En pruebas previas se observó que los valores del potencial del electrodo de cobre son muy bajos, cercanos a cero y variando muy poco de una disolución a otra, el motivo de este comportamiento puede ser a debido a que este elemento tiene un comportamiento muy estable o que el electrodo estaba oxidado, formando una capa aislante en la superficie. Los efectos de los datos del cobre sobre el análisis PCA afectaban mucho a los valores de PC1 y PC2 con datos poco fiables. Además en la gráfica de los pesos (*loads*) los electrodos estaban cerca del centro. Por este motivo, los datos del electrodo de cobre fueron eliminados en el resto de los análisis de datos.

Los resultados definitivos del análisis PCA con los datos de las tres medidas de cada una de las 10 disoluciones se muestran en la **Figura 69**

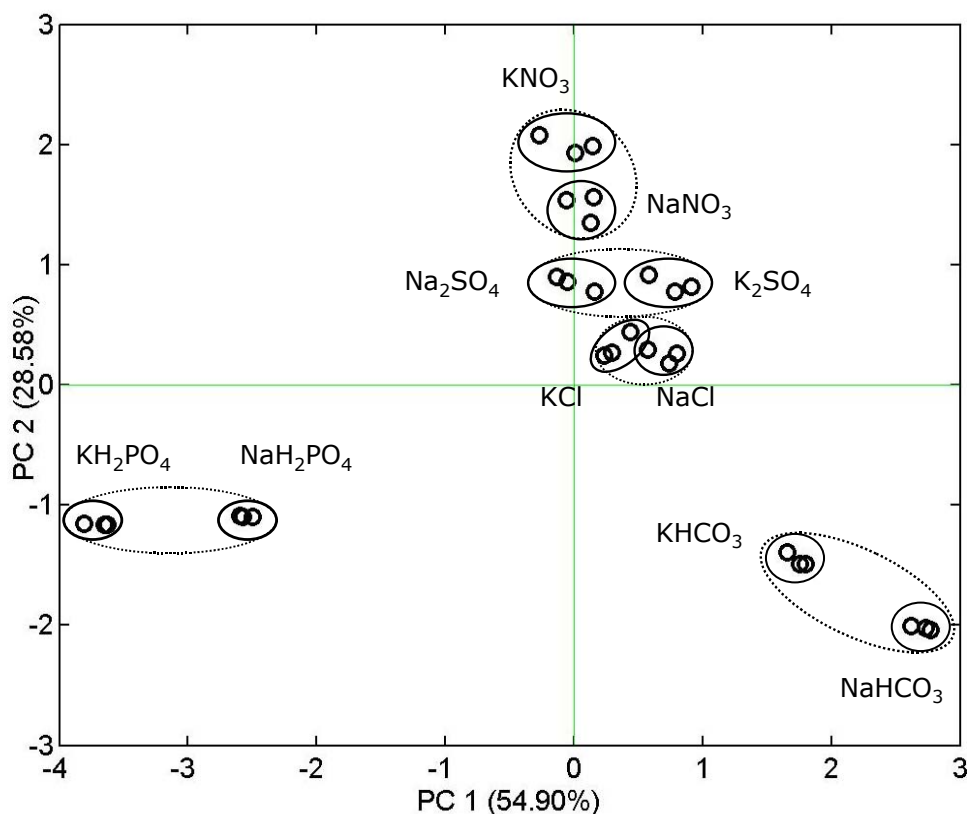


Figura 69. Resultados de PCA de las 10 disoluciones

La figura muestra una discriminación muy efectiva de los aniones fosfatos, carbonatos y menos efectiva pero también clara entre cloruros, nitratos y sulfatos. Al mismo tiempo los grupos aniónicos se dividen en dos subgrupos, correspondiendo a los dos cationes de Na^+ y K^+

Estos resultados prometen y sugieren sobre la posibilidad de discriminar diferentes tipos de aguas según su diferente concentración de aniones. Para comprobar la relación del comportamiento entre los diferentes electrodos se muestra en la **Figura 70** el peso (*loads*) de los valores de las PC. En ella se observa tres tipos de electrodos, el primero formado por Au, Ag y RuO_2 , el segundo por Zn y Pb, que son casi ortogonales con el primer tipo, y finalmente el electrodo de Ni con una correlación negativa con respecto al resto de los electrodos.

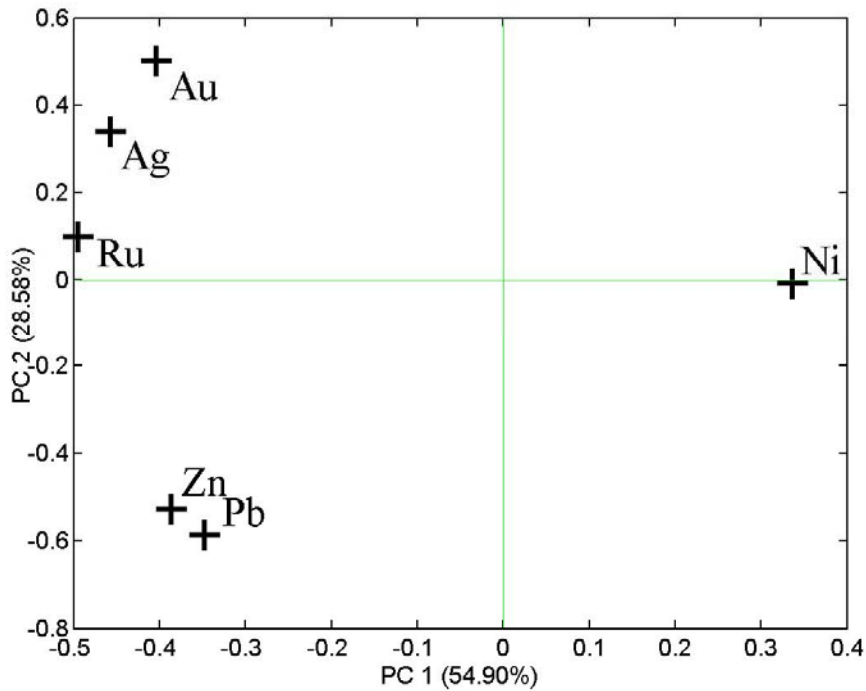


Figura 70. Pesos de cada uno de los electrodos en análisis PCA

Un análisis de interés es encontrar relación entre los resultados del análisis PCA y la **conductividad**. Para ello se realizó la medida de la conductividad de cada una de las 10 disoluciones por medio de un conductímetro comercial, modelo CRISON GLP32. La **Tabla 7** muestra el valor de la conductividad de cada una de las disoluciones.

NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	NaNO ₃	KNO ₃	NaHCO ₃	KHCO ₃	Na ₂ SO ₄	K ₂ SO ₄
596	707	376	490	611	647	449	532	1081	1254

Tabla 7. Valor de la conductividad en μS

Con la medida de la conductividad se obtiene un dato indicativo de la cantidad total de iones presente en la disolución, pero si se compara los valores de la conductividad con los obtenidos con el análisis PCA se comprueba que no existe mucha relación entre ambos métodos de medida porque, por ejemplo, los sulfatos poseen alta conductividad pero están en la posición media de la gráfica PCA y a su vez cerca de los nitratos y de los cloruros que tiene menor conductividad. Los fosfatos y los carbonatos tienen una conductividad similar pero sin embargo están muy separados en la gráfica. Además, para un mismo anión, la conductividad del catión K^+ es siempre superior al catión Na^+ . Es decir, los resultados que se obtienen con los electrodos que forman la lengua

electrónica no son equiparables ni redundantes con las medidas de la conductividad, obteniendo una discriminación de las muestras por motivos diferentes a la estricta cantidad total de iones.

Para una mejor evaluación de la capacidad de discriminación de las disoluciones según el tipo de anión o el tipo de catión, se ha construido una red neuronal artificial. El objetivo de esta red es la clasificación de cada muestra según el tipo de anión (5 posibilidades) y el tipo de catión (2 posibilidades). El tipo de red neuronal más utilizada en sistemas de narices y lenguas electrónicas es el *Perceptron Multilayer (MLP) feed-forward*, por ello se construyó una red con una capa oculta con 6 neuronas, con 6 entradas, correspondientes a los 6 electrodos y 7 neuronas en la capa salida correspondiente a los 5 posibles aniones y a 2 cationes. Cada neurona posee una función de transferencia de tipo logsig que genera un resultado analógico entre cero y uno, pero no lineal. Se realizó una aproximación de los resultados de forma que valores superiores a 0,5 se asignen el valor 1 y los inferiores a 0. Los valores que se utilizaron en las entradas fueron los valores de las diferentes medidas, mientras que el valor ideal de las salidas era 1 ó 0 según corresponda o no al anión o catión correspondiente. Por ejemplo, el código de salida 1;0;0;0;0;1;0 significa que se ha identificado una disolución que contienen el anión Cl⁻ y el cation Na⁺. Para entrenar a la red neuronal y evaluar el proceso se utiliza el método de validación cruzada de orden uno (*leave-one-out*), de esta forma se obtiene el índice de correlación entre los valores ideales y las calculadas. Estos valores se muestran en **Tabla 8**, donde los iones poseen una tasa de éxito del 100% (6 sobre 6) excepto los cloruros y nitratos que poseen una tasa de 5 sobre 6, sin embargo los cationes poseen tasas de éxito inferior (13 sobre 15). Este hecho vuelve a corroborar que con el sistema de lengua electrónica se obtiene una clara discriminación de las disoluciones con diferentes aniones y una baja discriminación para disoluciones con diferentes cationes.

	<i>Cloruros</i>	<i>Sulfatos</i>	<i>Nitratos</i>	<i>Carbonatos</i>	<i>Fosfatos</i>	<i>Sodio (Na)</i>	<i>Potasio (K)</i>	<i>Total</i>
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)	(15)	(15)	(30)
Tasa de éxito	5	6	5	6	6	13	13	22

Tabla 8. Tasa de éxito entre los valores ideales y los calculados

En las condiciones que se ha hecho trabajar a esta red neuronal artificial difícilmente podría obtener resultados satisfactorios porque el número de entradas es relativamente pequeño y en cambio el número de salidas es bastante elevado, es decir estamos exigiendo mucha precisión a una red de este tipo. Para estos casos resulta mucho más apto las redes de tipo ARTMAP que han demostrado que pueden tener mejor capacidad de aprendizaje.²⁶⁹ Construyendo una red que realiza una tarea similar se obtiene una **tasa de éxito del 100%**. Estos resultados están con buena consonancia respecto a los resultados obtenidos con el análisis PCA, donde se ha obtenido una buena separación entre las soluciones acuosas analizadas por medio de los dos primeros parámetros principales. Este hecho confirma que la lengua electrónica de 6 elementos permite una discriminación de diferentes disoluciones según el tipo de anión o de catión.

3.2.1 Análisis con Mezclas de Disoluciones

A partir de los resultados de la lengua electrónica con disoluciones simples es deseable comprobar cual es su comportamiento con disoluciones más complejas, que sean más similares a aguas naturales. Para comprobar esta posibilidad se crearon diferentes tipos de “aguas preparadas” realizando mezclas de algunas de las disoluciones anteriores en diferentes concentraciones. Las disoluciones se denominan A, B, C, D y E, se prepararon según el siguiente procedimiento, una mezcla de 80 ml con cinco tipos de sales, tres con catión Na⁺ y dos con catión K⁺, todas ellas con concentración original de 0,05M. La **Tabla 9** resume la cantidad de cada una de las disoluciones origen y la **Tabla 10** la concentración final de los aniones y de los cationes de las disoluciones A-E. Como se puede observar se utilizaron sales con sodio y potasio. Las muestras contienen una mezcla de aniones cuyas concentraciones estaban en el rango 2×10^{-3} a 3×10^{-4} M.

²⁶⁹ E. Llobet, E. Hines, J. Gardner, P. Barlett, T. Mottran. *Fuzzy ARTMAP based nose data analysis*. Sensors and Actuators B, 61 (1999) 183-190.

	K_2SO_4	$NaCl$	$NaPO_4H_2$	KCO_3H	$NaNO_3$
A	5	10	15	20	30
B	30	5	10	15	20
C	20	30	5	10	15
D	15	20	30	5	10
E	10	15	20	30	5

Tabla 9. Sales participantes en las cinco mezclas acuosas 0.05M (valores en ml)

	$SO_4^{=}$	Cl	$PO_4H_2^-$	CO_3H	NO_3^-	Na^+	K^+
A	$3,125 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$	$9,375 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,875 \times 10^{-3}$	$3,4375 \times 10^{-3}$	$1,8750 \times 10^{-3}$
B	$1,875 \times 10^{-3}$	$3,125 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$	$9,375 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,0625 \times 10^{-3}$	$4,6875 \times 10^{-3}$
C	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,875 \times 10^{-3}$	$3,125 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$	$9,375 \times 10^{-4}$	$3,0250 \times 10^{-3}$	$3,1250 \times 10^{-3}$
D	$9,375 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,875 \times 10^{-3}$	$3,125 \times 10^{-4}$	$6,25 \times 10^{-4}$	$3,7500 \times 10^{-3}$	$2,1875 \times 10^{-3}$
E	$6,25 \times 10^{-4}$	$9,375 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^{-3}$	$1,875 \times 10^{-3}$	$3,125 \times 10^{-4}$	$2,5000 \times 10^{-3}$	$3,1250 \times 10^{-3}$

Tabla 10. Concentración de aniones y cationes (en mol/L) para las cinco mezclas A-E

Para cada una de las cinco mezclas se realizaron siete medidas. Para analizar la posibilidad de la existencia de patrones en la variación del potencial de los electrodos se realizó un análisis PCA. En la **Figura 71** se muestra los valores de los dos primeros PC. En esta figura se reconoce claramente diferentes agrupaciones para cada una de las mezclas, con lo cual se vuelve a comprobar que el sistema es capaz de discriminar las muestras preparadas con diferente contenido de aniones. Este hecho podría anticiparse por medio del modelo teórico de los sistemas M, M/MO/OH⁻ y M/MX/X La relación entre los pesos de los distintos electrodos en el análisis PCA tiene un aspecto similar al de la **Figura 70**

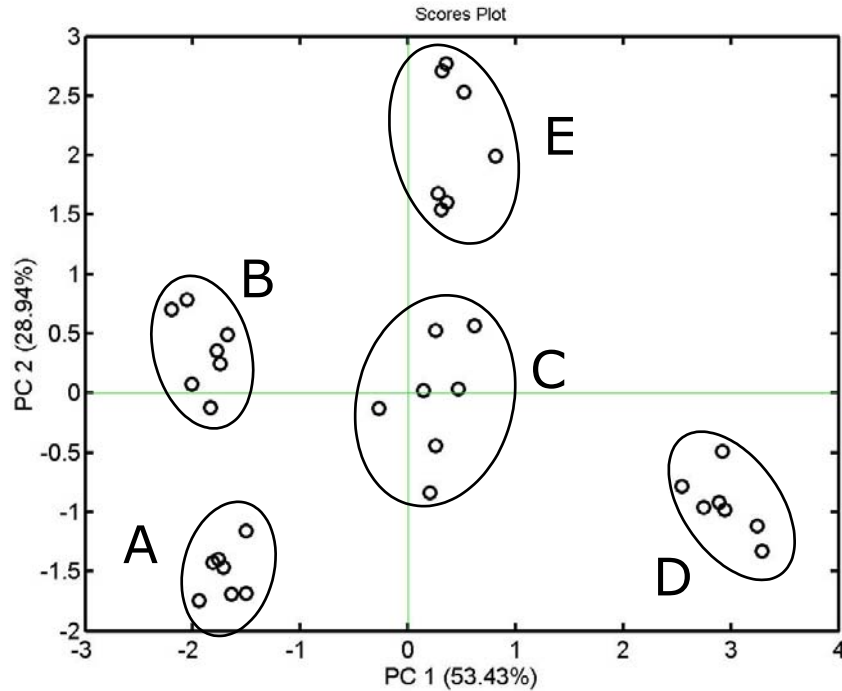


Figura 71. Análisis (PCA) para las diferentes mezclas

Con estas cinco mezclas de sales se realizó la medida de la conductividad, pero al igual que con las disoluciones puras, no se observó una clara correlación entre los valores de la conductividad y los valores de PC1 y PC2. Hay que tener presente que la concentración total de los iones de las cinco muestras es muy similar. Sin embargo, es llamativo que, a pesar de la similitud de las mezclas, el conjunto de electrodos es capaz de discriminar las muestras.

3.2.1.1 Análisis Predictivo

Para comprobar mejor cual es la capacidad de discriminación que muestra la lengua electrónica se ha realizado un análisis cuantitativo con los resultados de las medidas. El objetivo es la construcción de modelos de calibración para ver si es posible estimar correctamente la concentración de los iones (SO_4^{2-} , Cl^- , PO_4H_2^- , CO_3H^- , NO_3^- , Na^+ y K^+) presentes en las diferentes disoluciones estudiadas. Los modelos de calibración se construyen a partir del análisis PLS (*Partial Least Squares*). Se construye un modelo PLS específico para cada uno de los iones analizados. Los datos de entrada al modelo son las respuestas centradas sobre el valor medio de los 6 elementos de la matriz de sensores. Como hay suficientes medidas disponibles por cada “agua preparada”, se toman 7 conjuntos diferentes de entrenamiento y validación que funcionan de la

siguiente manera: en el conjunto de validación se integra una medida por cada tipo de agua y las seis medidas restantes se integran en el conjunto de medidas de entrenamiento. Como en cada ocasión se selecciona una medida diferente, se pueden definir 7 diferentes conjuntos de entrenamiento y validación. Cada conjunto de validación está formado por 30 medidas y cada conjunto de validación está formado por 5 medidas. Es decir es una técnica de validación cruzada de orden 5.

Inicialmente, a cada modelo se le realiza una validación cruzada para determinar el número óptimo de factores (variables latentes) a utilizar. Para ello, se realiza un cálculo de la denominada “suma de los cuadrados de los errores de predicción” (*Prediction Error Sum of Squares* - PRESS) estimado por medio de una validación cruzada de orden uno frente al número de variables latentes (por ejemplo de 1 a 6). Para realizar esta tarea se utilizan 7 juegos de medidas de entrenamiento. El criterio empleado consiste en elegir el mínimo número de variables latentes que proporciona un fuerte descenso en PRESS y seleccionan el mismo números de variables latentes para los 7 conjuntos de entrenamiento disponibles.

Una vez que se ha decidido el número de variables latentes que se va a utilizar, se construyen los modelos PLS, utilizando los conjuntos de entrenamiento y su comportamiento fue estimado utilizando las medidas de los correspondientes conjuntos de validación. Al igual que en las experiencias con aguas naturales la precisión se estima por medio del coeficiente de correlación entre los valores de concentración de iones predichos y los valores reales, la pendiente y la intercepción del ajuste lineal entre los valores predichos y los valores reales. Los modelos más precisos son los que poseen valores de pendiente cercanos a 1 y de interceptación cercanos a 0. Los resultados del análisis quedan resumidos en la **Tabla 11**.

<i>Ion</i>	<i>Var. latent</i>	<i>Coeff. corr</i>	<i>Pendiente</i>	<i>Intercep.</i>
SO ₄ ⁼	5	0,757	0,566	0,434
Cl ⁻	3	0,843	0,702	0,302
PO ₄ H ₂ ⁻	5	0,807	0,649	0,350
CO ₃ H ⁻	5	0,888	0,738	0,265
NO ₃ ⁻	2	0,979	0,935	0,062
Na ⁺	5	0,941	0,887	0,249

K ⁺	5	0,869	0,748	0,760
----------------	---	-------	-------	-------

Tabla 11. Resultados de la validación cruzada de los modelos de calibración construidos con las concentraciones de iones predichos (intercepción en mmol/L)

Esta tabla muestra que se alcanza una buena estimación de la concentración de nitratos y sodio, y una aceptable estimación de las concentraciones de carbonatos, potasio, cloruros y fosfatos. Finalmente, el comportamiento de la estimación de la concentración de ion sulfato es más bien pobre. Sin embargo, el comportamiento global de la lengua electrónica en el análisis cuantitativo de los iones presente en las diferentes mezclas de las disoluciones estudiadas es suficiente para obtener una discriminación de disoluciones acuosas de sales.

3.3 CONCLUSIÓN

Como conclusión de la segunda experiencia, es de destacar la posibilidad de discriminar aguas según su contenido de iones por medio de una lengua electrónica formada por electrodos simples metálicos y no metálicos. El concepto es simple y de fácil ajuste. Esta experiencia sugiere que el uso de sistemas de tipo M, M/MO/OH- y M/MX/X pueden abrir nuevas perspectivas para el diseño futuro de lenguas electrónicas para la discriminación de disoluciones acuosas.

Los resultados de estos experimentos han sido recientemente publicados²⁷⁰.

²⁷⁰ L. Gil, E. Garcia-Brejjo, J. Ibañez, R. H. Labrador, E. Llobet, R. Martínez-Máñez, J. Soto. *Electronic Tongue for Qualitative Analysis of Aqueous Solutions of Salts Using Thick-film Technology and Metal Electrodes*. Sensors 2006, 9, 697-707.

Capítulo 6. Experiencias. Análisis con Vino

A lo largo del presente capítulo se exponen las experiencias y los resultados de los análisis de distintos tipos de vino. De esta forma, se amplía el uso del sistema de medida, que se diseñó para la discriminación de distintos tipos aguas y disoluciones acuosas, a otro tipo de líquidos de composición más compleja como es el vino. En algunas experiencias de este capítulo además del sistema de medida de lengua electrónica también se aporta un sistema de nariz electrónica húmeda para que actúe tanto de forma independiente como en combinación con la lengua electrónica, de forma similar al catador humano de vino que lo huele y lo paladea para obtener la información necesaria para su análisis. Para lograr estos objetivos se ha desarrollado este capítulo con la siguiente estructura:

En primer lugar se presentan los sensores y los análisis previos con lenguas electrónicas para discriminar preparados artificiales con características similares a los vinos. De esta forma, se intenta averiguar si los sensores pueden detectar las variaciones típicas de los parámetros que caracterizan a los vinos. Se continúa con experiencias con vinos reales para realizar una comparación entre distintos tipos de muestras.

Posteriormente, se muestran las experiencias para lograr un sistema de detección de volátiles por medio de electrodos potenciométricos y su aplicación con muestras de vino y vinagre. Un sistema que sea capaz de absorber de forma natural los aromas desprendidos por el vino y cuya principal novedad es que actúa como una nariz húmeda. Logrando de esta forma un mimetismo con el sentido del olfato humano.

En la última parte de este capítulo se exponen las experiencias para obtener un sensor global para detectar el deterioro del vino cuando está durante un tiempo muy prolongado en contacto con el aire y se produce en el vino el efecto del picado por ácido acético y otros compuestos volátiles. El sistema está formado por una nariz y una lengua electrónica, para de esta forma, imitar la labor de un catador humano de vino. Esta

información determina las características organolépticas del vino. Para comprobar el sistema de medida se han utilizado cuatro vinos españoles de mesa, todas las botellas se abrieron el mismo día y se realizaron medidas durante 48 días.

1 COMPOSICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DEL VINO

El vino es un producto obtenido exclusivamente por fermentación alcohólica, total o parcial, de uva fresca, estrujada o no, o de mosto de uva. (Reglamento UE). Es un líquido alcohólico obtenido por la fermentación del jugo del fruto de la *vitis vinífera*, las uvas, frescas o ligeramente pasificadas, que presenta una graduación mínima natural adquirida del 9% vol.

El vino es un líquido de estructura muy compleja y variable, pero los principales componentes se pueden resumir en los siguientes elementos²⁷¹:

- **Agua.** El agua del vino alcanza en algunos casos hasta el 90% de su volumen total, pero lo normal es que ronde el 85%; es un agua de origen vegetal y químicamente pura.

- **Alcohol.** Los alcoholes del vino nacen de la fermentación debida a las levaduras de los distintos azúcares contenidos en el jugo de la uva; puede representar entre un 8% y un 20% de la masa exprimida. Su composición química es compleja y abarca desde trazas de alcohol metílico, proveniente de las partes leñosas y pectínicas de la uva, hasta glicerol, un trialcohol proveniente de los azúcares, que es el principal responsable de la sensación calórica que se siente al degustar un vino (aunque también participa en las sensaciones oleosas y de viscosidad).

- **Ácidos.** Los ácidos provienen de los contenidos en la propia uva, y son el ácido tartárico, el ácido málico, el ácido cítrico y el ácido glucínico. Su cantidad total varía entre 2 y 7 g/L. Son los responsables del sabor ácido del vino que en presencia de la saliva se hace evidente a las papilas gustativas de la lengua.

²⁷¹ G. D'Este *El vino y su protocolo*. Ed. Bonvivant.

- **Compuestos fenólicos** del vino están presentes en dos grandes grupos bien definidos, los compuestos colorantes flavonoides, responsables del color amarillo, y los antocionatos, responsables del color rojo; en conjunto están presentes entre 2 y 5%.

Los **taninos** del vino, un tipo de compuestos fenólicos proviene de las pieles y de las pepitas en algunas variedades o, adicionalmente, de la misma madera de las mismas barricas de fermentación o crianza, y llegan a estar presentes entre 1 a 3 g/L. Los taninos son responsables de la textura y astringencia del vino.

- **Azúcares no fermentados** del vino están presentes, tanto en los vinos más secos (alrededor de 2 g/L) como en los vinos licorosos (hasta 30 g/L); se componen de glucosa, fructosa arabinosa o xilosa. Estos azúcares contribuyen decididamente a la sensación de viscosidad, además de actuar sobre las papilas gustativas proporcionando al vino su clásico sabor dulce; la sensación oleosa que produce al mezclar el alcohol con el azúcar en los recipientes bucales.

- **Sustancias saladas** de los vinos, trazas e iones específicos aportados por cada variedad de uva, contribuyen en delicada medida, y con sensaciones muy sutiles de distintas sales de potasio, compuestos clorhídricos, sulfatos y tartratos, a dar personalidad gustativa al vino.

- **El gas carbónico** se encuentra siempre presente, tanto en los vinos tranquilos como en los espumosos. Se comienza a percibir (sensación de aguja) sólo cuando está presente en una concentración en torno a los 500 mg/L, y es una importante vector de aromas, especialmente en los espumosos, a los que, además, aporta su característica personalidad y vigor.

- **Las sustancias aromáticas** aportan la riqueza y la complejidad del vino y provienen de diferentes familias químicas: alcoholes, aldehídos, esterres, ácidos grasos, terpenos, presentes algunos en dosis infinitesimales, son los responsables del aroma de cada variedad brinda al vino.

1.1 EL PROCESO DE VINIFICACIÓN

El proceso de vinificación se logra por medio de una serie de procesos químicos que partiendo del mosto de la uva conducen a un vino maduro. Los procesos más

significativos y que están más implicados en las experiencias de este capítulo son los siguientes:

1.1.1 Fermentación Alcohólica

La fermentación alcohólica es el proceso por el que los azúcares contenidos en el mosto se convierten en alcohol etílico. Para llevar a cabo este proceso es necesaria la presencia de levaduras, hongos microscópicos que se encuentran, de forma natural en los hollejos.

El oxígeno es el desencadenante inicial de la fermentación, ya que las levaduras lo van a necesitar en su fase de crecimiento. Sin embargo al final de la fermentación conviene que la presencia de oxígeno sea pequeña para evitar la pérdida de etanol y la aparición en su lugar de acético o acetilo.

El proceso, simplificado, de la fermentación es:



La fermentación alcohólica es un proceso exotérmico, es decir, se desprende energía en forma de calor. Es necesario controlar este aumento de temperatura ya que si ésta ascendiese demasiado (25°C - 30°C) las levaduras comenzarían a morir deteniéndose el proceso fermentativo.

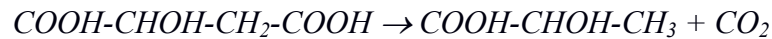
Otro producto resultante de la fermentación es el anhídrido carbónico (CO₂) en estado gaseoso, lo que provoca el burbujeo, la ebullición y el aroma característico de una cuba de mosto en fermentación.

A lo largo de todo el proceso de fermentación, y en función de las condiciones (cantidad de azúcar disponible, temperatura, oxígeno, etc.) cambia el tipo de levadura predominante.

Otras sustancias generadas en la fermentación son: ácido acético, ácido láctico, ácido pirúvico y acetaldehído, ácido succínico, acetoina, diacetilo y 2-3 butanodiol (butilenglicol), alcoholes superiores, ésteres y acetatos, vinil-fenoles y etil-fenoles, etc. El proceso fermentativo termina cuando ya se han desdoblado prácticamente todos los azúcares y cesa la ebullición.

1.1.2 Fermentación Maloláctica

Es la transformación del **ácido málico** en **ácido láctico** (con emisión de anhídrido carbónico) por acción de bacterias lácticas. La reacción química es la siguiente:



El proceso tiene lugar después de la fermentación alcohólica (maloalcohólica) por lo que en algunas ocasiones se denomina "fermentación secundaria". Esta fermentación reduce la acidez total del vino al perderse parte de la acidez fija: una parte de la acidez del vino se transforma en gas carbónico, el cual se desprende y desaparece. La fermentación del ácido málico está provocada por el desarrollo de bacterias lácticas que se encuentran en los hollejos de las uvas maduras.

1.1.3 Acidez Volátil

Es el conjunto de ácidos formados durante la fermentación o como consecuencia de alteraciones microbianas. Estos ácidos son, principalmente: ácido acético, ácido propionico, ácido butírico y ácido sulfúrico.

Si la acidez volátil está presente en todos los vinos, pero si es muy elevada, el vino se picará y avinagrará con el paso del tiempo. Es conveniente que la acidez volátil de un vino sea lo más baja posible.

1.1.4 Ácido Acético

Es el resultado de la oxidación del alcohol etílico a ácido o fermentación acética. La fórmula del ácido acético es: $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$.

Junto con los ácidos propionico, butírico y sulfúrico compone la acidez volátil del vino. En la boca se percibe como un sabor que recuerda el vinagre. Está presente en las botellas con el corcho mal colocado o en mal estado. Normalmente se considera que un vino se ha estropeado cuando contiene 1,4 g/L de ácido acético.

El ácido acético presente en el vino puede deberse a varios procesos químicos: Se produce como un subproducto del final de la fermentación al transformarse parte del alcohol etílico debido a la acción de las *Acetobacter*, un género de bacterias aeróbicas,

que transforman el etanol primero en acetaldehído y luego en ácido acético. La temperatura ideal del proceso de fermentación acética está entre los 28 y los 30°C.

El proceso consiste:



Por esta razón es conveniente que el nivel de oxígeno sea bajo en esta etapa de la fermentación para que no actúen las bacterias. También puede aparecer por la degradación de ácido cítrico combinado con las lactobacterias del vino. Y también por la degradación de los azúcares del mosto. El ácido acético está presente en el vinagre hasta en un 5%. En este caso se favorece el proceso de fermentación acética.

2 ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE VINO CON LENGUA Y NARIZ ELECTRÓNICA

Una de las aplicaciones con un mayor desarrollo de las narices electrónicas y lenguas electrónicas es el análisis de vinos. El motivo principal de este interés es porque el vino está formado por un gran número de componentes químicos y en proporción muy diversa. La mayor parte del vino está formado por: agua, alcohol, ácidos, etc. pero los elementos que distinguen un vino de otro, ya sea por su calidad, zona de procedencia, añada, etc. lo forman componentes que están presentes en muy pequeña proporción pero en un gran número, por lo que es difícil y laborioso realizar un análisis cuantitativo de todos ellos. Por este motivo, es adecuado el uso de sensores no específicos que sean sensibles a múltiples componentes.

Otro de los motivos del interés del análisis de los vinos es por el elevado valor comercial de muchos de ellos, por lo que suele ser rentable el control de la calidad y la detección de posibles adulteraciones. Por estos motivos, es de interés la investigación en sistemas para el análisis cualitativo del vino de forma rápida, cómoda y económica.

Son múltiples los grupos de investigación que se dedican a desarrollar sistemas de lenguas y de narices electrónicas aplicadas a análisis de vinos, pero lógicamente son en los países con mayor producción y comercialización del vino donde más han arraigado estas investigaciones, concretamente en España, Italia, Francia, Brasil, etc. Cada uno de

los grupos de investigación se ha especializado en trabajos con algún determinado tipo de sensor.

La mayor parte de la investigación se ha realizado con narices electrónicas por ser sistemas desarrollados más antiguamente y por la facilidad del vino en desprender aromas que características peculiares para cada vino, aunque últimamente han surgido numerosos trabajos de lenguas electrónicas aplicadas a los vinos, tal como se describe en el capítulo 4 de la presente memoria.

En los puntos siguientes se presenta los sistemas de **narices electrónicas** aplicadas a los vinos, para los sistemas **de lenguas electrónicas** se remite al capítulo 4.

2.1 SISTEMAS DE NARICES ELECTRÓNICAS APLICADOS A LOS VINOS

Para realizar los sistemas de **narices electrónicas** aplicados al análisis de vinos se han utilizado sistemas con diversos tipos de sensores, destacando los óxidos metálicos; sensores con WO₃, películas de Langmir- Blodgett y los sensores SAW con capas activas poliméricas.

2.1.1 Sensores Resistivos de Óxidos Estaño

Los sensores de óxidos metálicos se han utilizado ampliamente como sensores de gas, por ello son los también utilizados en los sistemas de narices electrónicos, como los desarrollados por el grupo de investigación de la Universidad “Tor Vergata” de Roma, que consiguen este tipo de sensores depositando una capa de estaño y posteriormente depositando capas ultrafinas de metal noble catalizador (Pd o Pt) para modificar la selectividad del sensor. Este sistema lo han aplicado para el reconocimiento de vinos de la misma denominación pero de diferentes añadas²⁷². Los resultados se compararon con métodos habituales de análisis de vinos, logrando una mejor discriminación la nariz electrónica porque los métodos estándar fallaron al intentar distinguir los vinos con la misma cantidad de SO₂ libre.

²⁷² C. Di Natale, F. Davide, A. D’Amico, P. Nelli, S. Groppelli, G. Sberveglieri. *An electronic nose for the recognition of the vineyard of a red wine*. Sensors and Actuators B, 33 (1996) 83-88.

Otros análisis de vino de este grupo de investigación consistieron en la monitorización de los cambios de aroma cuando se abre una botella y se deja el vino en contacto con el aire durante 24 horas. En la **Figura 72** se muestra la respuesta de los sensores respecto al tiempo, que es coincidente con el sabor del vino, y alcanza su máximo pocas horas después de abierta, a partir de entonces decae el sabor.

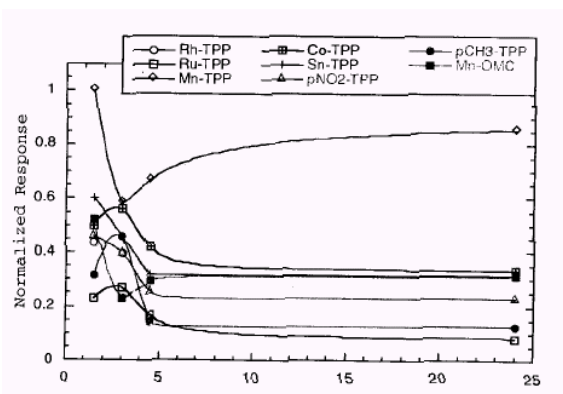


Figura 72. Respuesta de los sensores frente al tiempo de apertura de las botellas de vino²⁷³

El Laboratorio de Sensores del Instituto de Física Aplicada del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid también lleva años en la experimentación con vinos por medio de narices electrónicas con sensores de óxido de estaño. Los primeros trabajos consistieron en lograr detectores de componentes orgánicos volátiles (VOC) presentes en el suelo en concentraciones muy bajas²⁷⁴. Este mismo sistema de medida se ha utilizado para analizar otros componentes orgánicos y discriminar tres tipos componentes volátiles²⁷⁵.

La aplicación de este sistema de medida en el campo de vinos consistió en la discriminación de las diferentes fases de elaboración del vino (mosto de uva, vino fermentado y vino), comparando la respuesta del vino fermentado con su

²⁷³ C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, R. Paolesse, T. Boschi, M. Faccio, G. Ferri. *An electronic nose for food analysis*. Sensors and Actuators B 44 (1997) 521-529.

²⁷⁴ M. C. Horrillo, J. Getino, J. Gutiérrez, L. Arés, J. I. Robla, C. García, I. Sayago. *Measurements of VOCs in soils through a tin oxide multisensor system*. Sensors and Actuators B 43 (1997) 193-199.

²⁷⁵ J. Getino, M. C. Horrillo, J. Gutiérrez, L. Arés, J.I. Robla, C. García, I. Sayago. *Analysis of VOCs with a tin oxide sensor array*. Sensors and Actuators B 43 (1997) 200-205.

correspondiente mosto²⁷⁶. Han comprobado que la mejor respuesta de estos sensores se alcanza a la temperatura de 350°C.

En posteriores trabajos presentan sistemas de medida para la detección de vapores procedentes de líquidos. Utilizan sensores resistivos comerciales (FIS)²⁷⁷, aplicados para la identificación de compuestos aromáticos: ácido acético, acetato de etilo, acetaldehído, tricloroanisol (TCA) y SO₂ disueltos en agua, etanol y vino.²⁷⁸ En la **Figura 73** se muestra un esquema del sistema de medida presentado²⁷⁹.

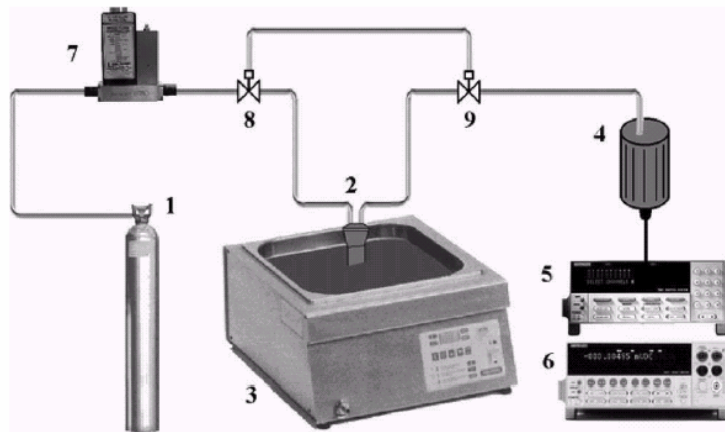


Figura 73. Esquema de Sistema de medida

Los resultados de la matriz de sensores de la nariz electrónica se comparan con otro método de análisis: la espectrometría de masas- cromatografía de gas (GC-MS), para determinar el contenido de componentes volátiles de control de calidad (alcoholes,

²⁷⁶ I. Sayago, M. C. Horrillo, J. Getino, J. Gutiérrez, L. Arés, J. I. Robla, M. J. Fernández, J. Rodrigo. *Discrimination of grapes juice and fermented wine using a tin oxide multisensor*. Sensors and Actuators B, 57 (1999) 249-254.

²⁷⁷ J.P. Santos, J. Lozano, H. Vázquez, J. A. Agapito, M. A. Martín, J. González. Clasificación e identificación de vinos mediante un sistema de sensores de estado sólido. XXI Jornadas de Automática. Sevilla – 2000.

²⁷⁸ J. Lozano, J.P. Santos, M. Aleixandre, M.J. Fernández, J. Gutiérrez, T. Arroyo, J.M: Girón, M.C. Horrillo. *Identificación de compuestos aromáticos del vino mediante nariz electrónica*. XXIV Jornadas de Automática. Universidad de León – 2003.

²⁷⁹ J. Lozano, J. P. Santos, M. Aleixandre, I. Sayago, M. García, A. Martínez, M. Cabellos, J. Girón. *Sistema de nariz electrónica para el análisis de la evolución del vino controlada por PC*. XXIV Jornadas de Automática. Universidad de León – 2003.

ésteres, acetatos y ácidos) en momentos diferentes de la fermentación del vino²⁸⁰ comprobando que los resultados de ambos métodos son coincidentes.

El estudio se ha combinado con el análisis de otros tipos vinos y con mayor número de componentes. Así, realizaron el reconocimiento de 29 aromas típicos del vino blanco.²⁸¹ Los resultados muestran que a pesar de la fuerte influencia del etanol y de otros componentes mayoritarios del vino, el sistema podía discriminar correctamente, por medio de PCA y PNN, los componentes aromáticos añadidos con una precisión del 97%. Las experiencias han continuado con sistemas de inyección de volátiles con muestreo con cabeza estática y dinámica²⁸².

2.1.2 Sensores de Óxido Metálico Semiconductor (WO₃)

Las películas delgadas de WO₃ también se han utilizado ampliamente en sistemas de narices electrónicas. Los grupos de investigación de M. Penza y G. Cassano de Brindisi (Italia) han diseñado y fabricado una matriz de sensores sobre películas delgadas de WO₃ para el análisis de alimentos, bebidas y perfumes,²⁸³ formado por cuatro sensores de óxido metálico de WO₃ modificado por cuatro metales como Pd, Au, Bi y Sb para así obtener diferentes sensibilidades químicas. Posteriormente caracterizaron diferentes gases como H₂S, SO₂, CH₄, NO, NO₂ en un rango de concentraciones de 1 a 7000 ppm en aire seco, a 180°C²⁸⁴.

Los sensores de WO₃ se aplicaron finalmente al análisis del vino, realizando análisis de 9 vinos italianos y analizados con cuatro sensores de semiconductor óxido

²⁸⁰ T. Arroyo, M. Aleixandre, J. Lozano, I. Sayago, M. Garcia, M.J. Fernández, L. Arés, J. Gutiérrez, J.M. Cabellos, M. Gil, M.C. Horrillo, J.P. Santos. *A comparative study of sensor array and GC-MS: application to Madrid wines characterization*. Sensors and Actuators B, 102 (2004) 299-307.

²⁸¹ J. Lozano, J.P. Santos, M.C. Horrillo. *Classification of white aromas with an electronic nose*. Talanta, 67 (2005) 610-616.

²⁸² M. García, M. Aleixandre, J. Gutiérrez, M.C. Horrillo. *Electronic nose for wine discrimination*. Sensors and Actuators B, 113 (2006) 911-916.

²⁸³ M. Penza, G. Cassano, F. Tortorella, G. Zaccacia. *Classification of food, beverages and perfumes by WO₃ thin-film sensor array and pattern recognition techniques*. Sensors and Actuators B, 73 (2001) 76-87.

²⁸⁴ M. Penza, G. Cassano, F. Tortorella. *Gas recognition by active WO₃ thin-film sensors array*. Sensors and Actuators B, 81 (2001) 115-121.

metal²⁸⁵. De forma similar, logran el reconocimiento de la adulteración de vinos italianos al que se les añade metanol, etanol o vino del mismo color²⁸⁶.

2.1.3 Sensores con Películas Langmuir-Blodgett

Las propiedades de absorción de gas de las películas de Langmuir-Blodgett han sido aplicadas como sensores de gas por el grupo de investigación de la *Universidad de Valladolid*²⁸⁷, que ha presentado numerosos trabajos del uso de este tipo de películas para la construcción de lenguas electrónicas con aplicación fundamental al análisis de vino (capítulo 4). La aplicación de estas películas como sensor de gas se ha centrado en la discriminación en la detección de volátiles²⁸⁸. Este tipo de sensores se ha utilizado para la discriminación del aroma del vino²⁸⁹. La experiencia se ha realizado con sistemas de inyección de componentes volátiles, estáticos y dinámicos.

2.1.4 Sensores de Ondas Acústicas Superficiales (SAW)

En trabajos recientes el grupo de investigación del CSIC realiza el mismo tipo de análisis pero con sensores basados en dispositivos de onda acústica superficial (SAW)²⁹⁰ cubiertos con películas poliméricas.

Otros grupos de investigación también han utilizado los dispositivos (SAW) para el análisis de vino. En principio reconocieron volátiles individuales en mezclas binarias de metanol y 2-propanol²⁹¹ en concentraciones en el rango de los límites umbrales.

²⁸⁵ M. Penza, G. Cassano. *Chemometric characterization of Italian wines by thin-film multisensors array and artificial neural networks*. Food Chemistry, 86 (2003) 283-296.

²⁸⁶ M. Penza, G. Cassano. *Recognition of adulteration of Italian wines by thin-film multisensor array and artificial neural networks*. Analytica Chimica Acta, 509 (2004) 159-177.

²⁸⁷ M.L. Rodríguez-Méndez, J. Souto, J. de Saja-González, J.A. de Saja. *Crown-ether lutetium bisphthalocyanine Langmuir-Blodgett films as gas sensors*. Sensors and Actuators B, 31 (1996) 51-55.

²⁸⁸ M.L. Rodríguez-Méndez, J. Souto, R. Saja, J. Martínez, J.A. Saja. *Lutetium bisphthalocyanine thin films as sensors for volatile organic components (VOCs) of aromas*. Sensors and Actuators B, 58 (1996) 544-551.

²⁸⁹ A. Guadarrama, J.A. Fernández, M. Íñiguez, J. A. de Saja. *Array of conducting polymer sensors for the characterization of wines*. Analytica Chimica Acta, 411 (2000) 193-200.

²⁹⁰ M. García, M. J. Fernández, J.L. Fontecha, J. Lozano, J.P. Santos, M. Aleixandre, I. Sayago J. Gutiérrez, M.C. Horrillo. *Differentiation of red wines using an electronic nose based on surface acoustic wave devices*. Talanta, 68 (2006) 1162-1165.

2.1.5 Otros Sistemas de Análisis de Vino con Narices Electrónicas

La espectrometría de masas es un método emergente en el campo del análisis de aromas. El espectro global de masas del sistema proporciona una huella de cada muestra analizada relacionada con la composición volátil. Se han presentado métodos para el análisis de vino utilizando un espectrómetro de tipo *headspace sampler* (HS-MS)²⁹².

Una de las mayores dificultades del análisis de bebidas alcohólicas con narices electrónicas es el enmascaramiento debido a los efectos del etanol. Para solucionarlo se ha propuesto la cromatografía de gas como un tratamiento de vapores antes del análisis en la lengua electrónica²⁹³, de esta manera se logra un proceso de deshidratación y desalcoholización.

3 SISTEMA DE MEDIDA

Los trabajos por parte de diversos grupos de investigación con narices electrónicas y lenguas electrónicas para el análisis del vino han servido como referencia en esta tesis para plantearse nuevas investigaciones en el análisis de vinos pero con nuevas estrategias, fundamentalmente en lo referente a los sensores. Las nuevas estrategias se han concretado en el uso de electrodos potenciométricos metálicos y de óxidos metálicos para la confección de sistemas de lengua electrónica y también este tipo de electrodos para obtener un sistema de nariz electrónica. Los dos sistemas podrían actuar por separado o de una forma conjunta sobre la muestra a analizar.

Para lograr el objetivo propuesto se ha planteado un sistema de medida similar al utilizado en medios acuosos descrito en el capítulo 5 de la presente memoria. El sistema de medida está formado por dos posibles grupos de electrodos (nariz y lengua electrónica) que confluyen en un sistema de acondicionamiento de la señal y

²⁹¹ M. Penza, G. Cassano *Application of principal component analysis and artificial neural networks to recognize the individual VOCs of methanol/2-propanol a binary mixture by SAW multi'-sensor array.* Sensors and Actuators B, 89 (2003) 269-284.

²⁹² M. P. Martí, O. Busto, J. Guasch. *Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing.* Journal of Chromatography, 1057 (2004) 211-217.

²⁹³ J. A. Ragazzo-Sanchez, P. Chalier, C. Ghommidh. *Coupling gas chromatography and electronic nose for dehydration and desalcoholization of alcoholized beverages. Application to off-flavour detection in wine.* Sensors and Actuators B, 104 (2004) 253-257.

posteriormente otro de adquisición de datos. Para discriminar las distintas muestras se aplican cálculos de análisis multivariante. El conjunto de bloques de medida se muestra en la la **Figura 74**. Los detalles de los sistemas de acondicionamiento de la señal y adquisición de datos se describen en el Anexo II de la presente memoria, aunque se realizaron los cambios necesarios en el sistema de acondicionamiento de la señal para habilitarlo al número y tipo de electrodos. También se realizaron algunas modificaciones en el programa informático para la adquisición, monitorización y almacenamiento de las medidas. En los siguientes apartados se detallan el sistema de sensores utilizados para obtener la lengua y la nariz electrónica.

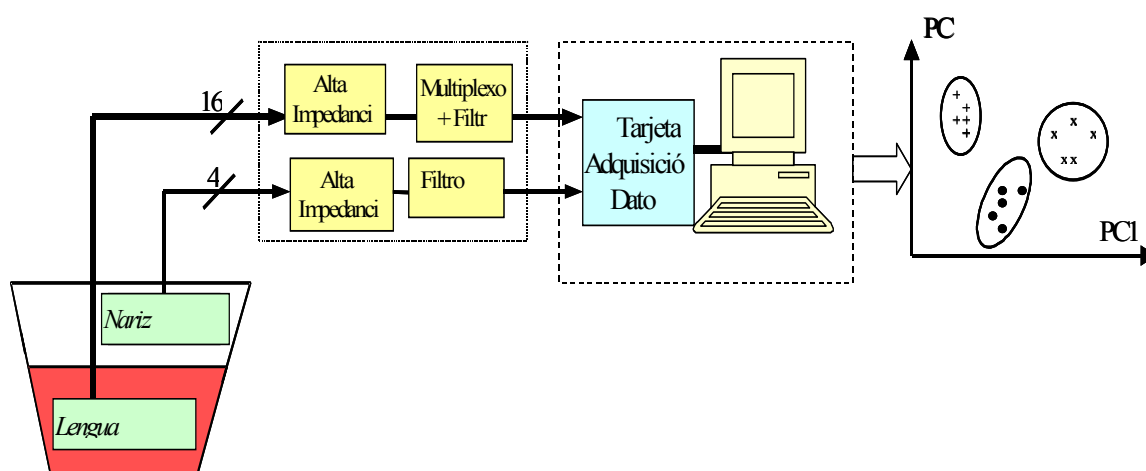


Figura 74. Sistema de bloques para la medida de Lengua y Nariz Electrónica

3.1 DESARROLLO DE SENSORES PARA LA LENGUA ELECTRÓNICA

La aplicación de sistemas de lenguas electrónicas potenciométricas para el análisis de vinos conlleva unas dificultades superiores a su aplicación para análisis de aguas. El motivo principal es que el vino es un producto con gran cantidad de compuestos orgánicos que son más difíciles de detectar por medios potenciométricos que las especies inorgánicas disueltas en agua. En segundo lugar, el vino posee componentes volátiles, que hace variar las propiedades del vino con el paso del tiempo y ocasiona que las medidas sean más inestables.

Inicialmente se realizaron diversas medidas para determinar el comportamiento de electrodos con el vino de distintos materiales y con dos modos de fabricación

(tecnología de capa gruesa o electrodo metálico aislado). Los electrodos fueron, en primer lugar, la misma placa multielectrodo que se utilizó para los análisis con agua, posteriormente electrodos discretos y por último, se construyó una placa en tecnología gruesa a propósito para este tipo de aplicación con vinos.

3.1.1 Electrodo Discretos

Con el fin de probar la mayor cantidad posible de electrodos de distintos materiales, se realizaron múltiples experiencias con electrodos discretos, es decir formados por varillas de material lo más puro posible, y así determinar el comportamiento de cada uno de ellos con distintas muestras de vino. Los materiales utilizados fueron:

Platino Platinado: es un electrodo que puede actuar catalíticamente en procesos electroquímicos entre componentes de distinta naturaleza.

Plomo: metal no noble, puede comportarse como electrodo metálico de 1º orden.

Aluminio: es un metal que puede reaccionar, entre otros compuestos, con los ácidos orgánicos presentes en el vino.

Vidrio: se utiliza normalmente como medidor de pH. Tiene la característica de poseer una muy elevada impedancia de salida lo que perjudicará en los efectos del ruido, pero al mismo tiempo se le supone una gran precisión, por ser utilizado como instrumento de medida comercial.

Electrodos utilizados en sistemas de medida de voltametría: Se aprovechó los electrodos del sistema de medida de voltametría, los materiales activos de estos electrodos son: **oro, grafito y platino.**

3.1.2 Multielectrodo para Lengua Electrónica

A partir de los resultados de las experiencias realizadas con la primera placa multielectrodo y con los electrodos discretos, se construyó otra placa multielectrodo específica para las medidas con vino. Esta placa está formada por 9 electrodos y se construyó con técnicas serigráficas de capa gruesa, siguiendo los mismos procesos que con otras placas anteriores. Las pastas utilizadas son también comerciales con los

siguientes elementos activos: Pt, Ag, Au, Cu, Ru, AgCl y C. Los detalles de la tecnología en capa gruesa se especifican en un Anexo II de esta memoria.

En la Figura 75 se muestra la distribución de electrodos en la placa y las pistas para su conexión eléctrica al sistema de medida a través de un cable plano de 20 contactos.

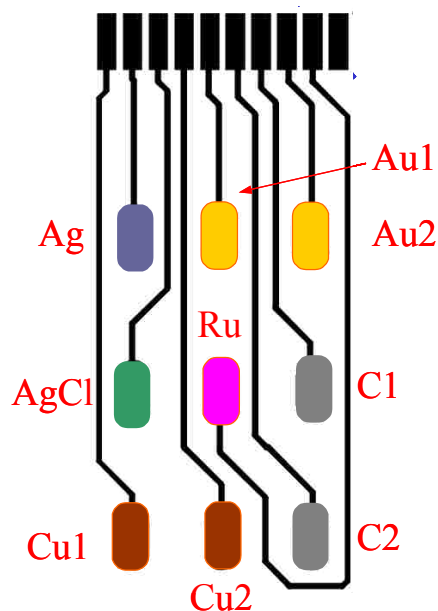


Figura 75. Distribución de electrodos en la placa multielectrodo

Las pastas utilizadas en la tecnología de capa gruesa están formadas básicamente por los elementos activos y otras sustancias aglutinantes. La información de la composición detallada de las pastas no es facilitada por el fabricante.

Para obtener una mayor información acerca de la composición química de los electrodos se realizó un análisis para determinar los principales elementos químicos que están presentes en cada sensor. El análisis se realizó con ayuda de un microscopio electrónico cuando la placa ya estaba confeccionada (procesos de secado y quemado o curado de las pastas). Este instrumento equipado con un detector EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) permite la realización de un análisis que ofrece la proporción de cada elemento químico en la mezcla. En la **Tabla 12** se muestra el porcentaje de los tres elementos con mayor representación en cada una de las pastas, representando en letra negrita el que corresponde al elemento activo. Como elementos aglutinantes destacan el carbono y el oxígeno. En el caso de Ru, este componente está

presente en forma de óxido: RuO₂. En el Anexo I de esta memoria se especifica con detalle los resultados del análisis microscópico para cada uno de los electrodos.

Electrodo	Primer Element %		Segund. Elem %		Tercer Elem. %	
Cu1	Cu	66,83	O	16,13	C	14,87
Cu2	Cu	73,42	O	16,04	C	9,23
Au1	Au	58,77	Ag	15,96	Pd	8,49
Au2	Au	55,76	Ag	11,21	C	15,29
C1	C	72,81	O	15,12	Cl	7,88
C2	C	76,61	O	13,91	Cl	7,16
Ag	Ag	87,49	Pd	7,03	C	2,22
Ru	O	27,88	Pb	26,27	Ru	14,37
ClAg	Ag	76,93	C	7,79	Cl	7,1

Tabla 12. Proporción (%) del elemento activo en cada electrodo

4 MEDIDAS CON VINOS

Las primeras experiencias consistieron en realizar medidas con distintos tipos de vinos comerciales para determinar si el sistema de lengua electrónica es capaz de discriminarlos. Se presentan resultados de medidas utilizando electrodos discretos y sistema multisensor.

4.1 ANÁLISIS DE VINOS CON ELECTRODOS DISCRETOS

Se presenta los resultados de una experiencia para conseguir la discriminación de vinos. Se eligió cuatro vinos tintos: *Tinto Don Simón*, *Enterizo 1997* (D.O. Utiel-Requena), *Rioja 1998* y *Rioja 2003*. Se utilizaron electrodos individuales de los siguientes materiales: vidrio, platino, plomo, carbón, cobre, níquel, aluminio y óxido de rutenio.

4.1.1 Resultados. Análisis PCA

Las medidas se realizaron siguiendo el protocolo de experiencias anteriores. Se realizaron de 5 a 7 medidas por cada muestra. Las gráficas también tuvieron un aspecto

similar a la anterior. Con los resultados de cada electrodo se realiza un Análisis de Componentes Principales (PCA). El resultado de los *scores* de las dos primeras componentes (PC1 y PC2) se muestra en la gráfica de la **Figura 76**. En ella se puede observar una clara agrupación y discriminación de las muestras de vino *Enterizo* (**ent 2-7**) y de forma similar pero menos evidente sucede con los vinos Tinto de *Don Simón* (**T1-T5**). Los vinos de Rioja de la añada de 1998 (**R98**) y 2003 (**R03**) se distinguen entre los demás pero hay un solapamiento entre ellos.

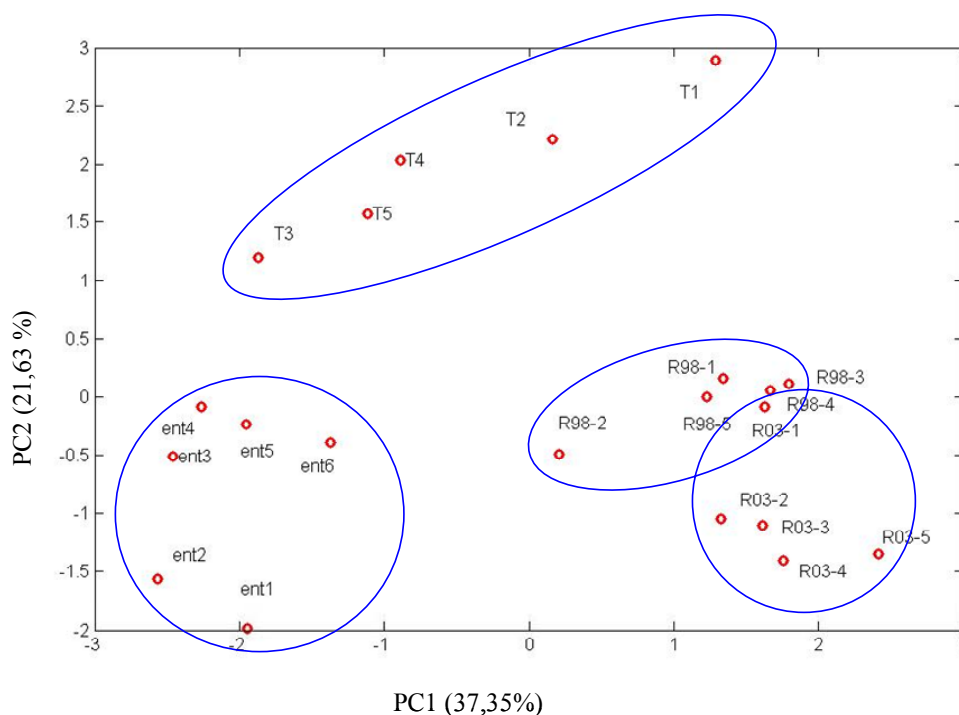


Figura 76. Análisis PCA de las medidas con electrodos individuales

4.2 ANÁLISIS VINOS TINTOS CON MULTIELECTRODO

De forma similar a los electrodos discretos, se presenta los resultados de una experiencia realizada la placa multielectrodo construida en tecnología de capa gruesa y cuyas características se presentaron en el apartado 3.1.2 del presente capítulo. Los sensores están contruidos con pastas de los siguientes metales: oro, plata, carbón, cobre, rutenio y AgCl. Las experiencias se realizaron sobre tres tipos de vino tinto: *Tinto Don Simón* (**DST**), *Enterizo* (D.O. Utiel-Requena-1997) (**Ent**) y *Rioja 1998* (**R98**). Se realizaron cinco medidas con cada una de las muestras. Con las medidas finales se realiza un análisis PCA cuyos resultados se presentan en la **Figura 77** y donde

se observa una clara discriminación entre los tres tipos de muestras aunque menor que con los electrodos discretos.

Con estos análisis se comprueba que los electrodos potenciométricos son capaces de discriminar muestras de vino real.

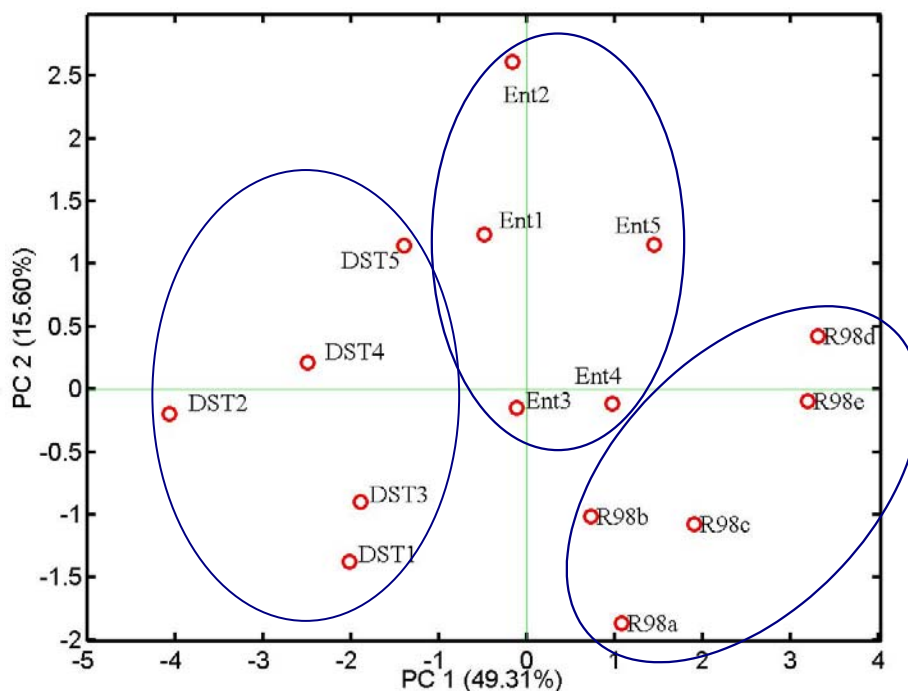


Figura 77. Discriminación de las medidas con multielectrodo

5 NARIZ ELECTRÓNICA PARA VINOS

El segundo método de análisis de vinos consiste en la detección de los aromas que desprende el vino y de esta forma obtener una nariz electrónica.

La idea inicial consiste en crear una placa sensora formada por múltiples electrodos potenciométricos más un electrodo de referencia que sea capaz de detectar el aroma que desprende el vino. Para conseguir la continuidad eléctrica entre los electrodos sensores y el de referencia es necesario que el sistema esté siempre húmedo. Para lograrlo, se encierran los electrodos en funda humedecida con agua destilada. Esta funda debe absorber los vapores procedentes del vino y medir la variación del potencial de los electrodos.

5.1 NARIZ ELECTRÓNICA CON ELECTRODOS DISCRETOS

Las experiencias se realizaron con electrodos individuales de distintos materiales y de tamaño grande para así obtener una buena superficie de contacto entre el electrodo y la funda humedecida, las medidas se realizaron primero en forma solitaria para cada electrodo y posteriormente de forma conjunta.

5.1.1 Sensor de Vidrio

Las primeras experiencias se realizaron con un el sensor de medida del pH pero utilizado en este caso como simple indicador de potencial. Para utilizarlo como detector de volátiles se creó una funda capaz de acoger al electrodo de referencia y al de vidrio. El motivo de elegir este tipo de electrodo es por la posibilidad de detectar volátiles ácidos como el ácido acético.

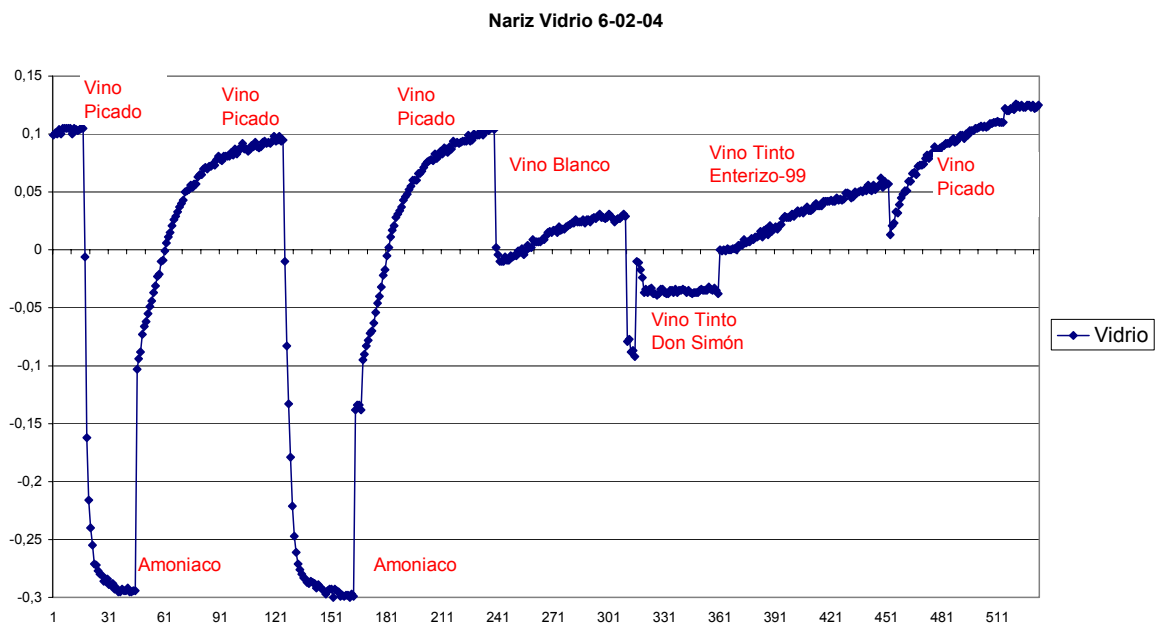


Figura 78. Medidas de Nariz Electrónica con electrodo de vidrio

Las muestras utilizadas fueron productos que se presumían sensibles al pH: Vino tinto muy picado, Amoniaco, Vino *Don Simón* Tinto y Blanco. En la **Figura 78** se muestra un aspecto de los resultados con estas medidas. En esta figura destaca el amoniaco que responde más rápido que el vino porque es más volátil. El vino blanco posee menos ácidos volátiles (ácido acético) pero posee otros ácidos no volátiles.

5.1.2 Funda para Varios Electroodos

Para crear un sistema multielectrodo se utilizó una funda de tela de poliéster cosida para formar una funda para 4 electrodos individuales más el electrodo de referencia. La funda fue humedecida con agua destilada. Las primeras experiencias consistieron en comprobar la respuesta del sistema con muestras muy distintas entre si. Por una lado el aire, es decir el recipiente vacío, luego un vino tinto convencional (Rioja 2003) y por último vinagre de vino. El motivo de elegir este componente es porque emite gran cantidad de vapores de ácido acético.

5.1.2.1 Electrodos

Los electrodos utilizados para la experiencia con vinagre fueron los siguientes: **vidrio, grafito, aluminio, plomo, platino-platinado, rutenio, cobre, níquel**, también se utilizaron electrodos para voltametría de **grafito, oro y platino**. Como referencia se usó un electrodo de calomelanos.

Las experiencias consistieron en realizar medidas alternas con los tres tipos de muestras y entre ellas se realizó una limpieza los electrodos con disolución 0,1g ClK en 75 ml de agua destilada. En la **Figura 79** se muestra el conjunto de medida de la nariz electrónica húmeda.



Figura 79. Sistema de nariz electrónica húmeda

5.1.2.2 Resultados

Se presenta una tabla con los resultados medios de las medidas de cada día con **aire, vino y vinagre** para cada electrodo.

<i>Electrodo</i>	<i>Aire (V)</i>	<i>Vinagre (V)</i>	<i>Vino (V)</i>
vidrio	0,0743	0,1726	0,1206
aluminio	-0,5157	-0,5603	-0,5205
níquel	-0,0830	-0,0562	-0,1237
plomo	-0,4747	-0,4756	
cobre	-0,1138	-0,0996	
platino platinado	0,2834	0,2833	
rutenio	0,2713	0,2919	
grafito	0,2162	0,2259	
grafito (Voltimetría)	0,2440	0,2490	0,2669
oro (Voltimetría)	0,2449	0,2453	0,2442
platino (Voltimetría)	0,2628	0,2413	0,2419

Tabla 13. Resultado de las medidas de volátiles con distintos electrodos

En la tabla destacan los resultados del electrodo de vidrio (medidor pH) porque discrimina con cierta facilidad las muestras de aire, vino y vinagre. Este fenómeno es lógico ya que el electrodo actúa como un medidor de pH y tanto el vino, y sobre todo el vinagre tienen una muy elevada acidez. El electrodo de aluminio realiza una pequeña discriminación del vino (5 mV) y una mayor del vinagre (40 mV). Para los electrodos de platino-platinado y plomo apenas hay variación de las medidas en el aire y en vinagre, no sirven para discriminar las muestras pero pueden servir como referencia.

5.1.3 **Conclusión**

Con las experiencias realizadas se ha analizado la sensibilidad de diversos electrodos de distintos materiales cuando son expuestos en un recipiente cerrado con una fuente de aromas procedentes de vino tinto y de vinagre y comparándolos con el valor de referencia que es el aire, es decir el recipiente vacío. Aunque las pruebas se realizaron con cierto carácter preliminar, se puede llegar a la conclusión que hay algunos electrodos que sí pueden ser útiles para el desarrollo de una nariz electrónica

potenciométrica húmeda, los que mejor resultado han ofrecido, son: vidrio, aluminio, platino y grafito de electrodo de voltametría.

6 MONITORIZACION DETERIORO DEL VINO CON SISTEMA DE LENGUA Y NARIZ ELECTRÓNICA. ACIDEZ VOLÁTIL

La experiencia final de este capítulo consiste en una aplicación conjunta de los sistemas de lengua y nariz electrónica para determinar el deterioro del vino cuando está expuesto mucho tiempo al aire y es afectado por el ácido acético y otros volátiles.

La acidez acética es un proceso de formación de ácidos durante la fermentación o como consecuencia de una evolución aeróbica del vino producida por microorganismos que se desarrollan sobre su superficie del vino cuando está en contacto con el aire. El contenido en acidez volátil no puede ser superior a:

- a) 18 miliequivalentes por litro para los mostos de uva parcialmente fermentados,
- b) 18 miliequivalentes por litro para los vinos blancos y rosados,
- c) 20 miliequivalentes por litro para los vinos tintos.

En las experiencias para detectar la acidez volátil se utilizaron cuatro vinos embotellados diferentes que se abrieron el mismo día y se realizaron medidas en diversos días hasta el día 48. La hipótesis inicial es que durante los primeros días los vinos sufrirían pocas modificaciones, pero a medida que pasara el tiempo se producirá el fenómeno del “picado” del vino o avinagramiento, que consiste en un aumento de su acidez por aumento del ácido acético. Para corroborar los resultados se realizaron medidas de medida de la acidez de los vinos mediante procedimientos químicos convencionales.

6.1 SISTEMA DE MEDIDA. MULTIELECTRODO PARA NARIZ ELECTRÓNICA

Para conseguir el objetivo de esta experiencia se realizaron medidas de doble naturaleza, por un lado un sistema de lengua electrónica formado por la placa multielectrodo construida con tecnología de capa gruesa y cuyos resultados de las medidas previas se han presentados en anteriores apartados del presente capítulo, y por

otro lado, el sistema de nariz electrónica húmeda mediante cuatro electrodos potenciométricos.

6.1.1 Multielectrodo para Nariz Electrónica

Para determinar los electrodos que van a participar en el sistema multielectrodo de la nariz electrónica nos basamos en las experiencias previas con electrodos de distinto material y recubiertos con una tela ceñida de poliéster humedecida para conseguir una buena conductividad eléctrica. Estas experiencias previas se han expuesto en el punto 5.1 y según los resultados que se obtuvieron se eligieron 4 electrodos: **vidrio**, **aluminio**, **grafito** y **platino**, más un electrodo de referencia de Ag-ClAg.

Los electrodos de grafito, platino y aluminio están formados por simples barras de cada uno de estos materiales. Todos los electrodos se meten en una funda de tela de nylon cosida de tal forma que crea un receptáculo para cada uno de los electrodos bien ceñido a la tela para su adecuado contacto eléctrico. El conjunto se introducía en un recipiente cerrado donde se incorporaba previamente la muestra a analizar, pero de forma que no existiera un contacto directo con el líquido (**Figura 79**). Las medidas se realizaron a temperatura ambiente.

6.2 EXPERIENCIAS

Los análisis con la lengua y la nariz electrónicas se realizaron con dos vinos tintos y dos vinos blancos. Los tintos utilizados fueron de la marca: *Castillo de Liria* y *Don Simón* y que en este análisis son denominados RA y RB, y los vinos blancos fueron de la marca: *Castillo Liria Blanco* y *Valdepeñas*, denominados WA y WB. Todas las botellas se abrieron el mismo día y las medidas se realizaron los días 1, 5, 9, 11, 15, 19, 22, 28, 36 y 48 después de abrirse. El vino se almacenó a una temperatura constante, 25°C. La experiencia consistió en tres tipos de medidas para cada día de trabajo: acidez, lengua electrónica y nariz electrónica. Con las medidas de la acidez se obtuvo un elemento comparativo para saber si el vino está picado.

6.3 MEDIDA DE LA ACIDEZ

Las medidas de acidez se realizaron para tener un elemento de referencia de las señales potenciométricas. La medida de la acidez total del vino se realizó con la técnica

química de valoración ácido-base, utilizando como reactivo de valoración una base fuerte (NaOH), como punto equivalente el $\text{pH} = 7$ y expresado en concentración (g/L) de ácido tartárico 0,1N estandarizado por ftalato ácido de potasio ($\text{C}_8\text{H}_5\text{O}_4\text{K}$).

La valoración se realizó con los vinos **tintos** por medio de análisis **potenciométricos** y con los vinos **blancos** por medios **titulométricos**.

La medida titulométrica se basa en el cambio de color de la muestra cuando se le añade otro compuesto que ocasiona la neutralización. Para conseguir la valoración titulométrica de las muestras de vino blanco se diluyó en agua destilada (90%), con tres gotas de fenoftaleína 0.1%. La disolución de NaOH se coloca en una bureta y se dejan caer gotas de disolución de vino hasta que el indicador cambió a rosa, registrando el volumen de neutralización. Este proceso se realizaba dos veces para cada uno de los vinos y entonces se obtenía la normalidad de las muestras y la acidez expresada como ácido tartárico.

Para medir la acidez del vino tinto se ponen las muestras un vaso de precipitados y se mide el pH mientras se gotea la disolución de NaOH. Para obtener el volumen de neutralización se calcula la derivada primera para así obtener el punto de inflexión, En la **Figura 80** se representa el volumen reactivo añadido frente a $\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$. Por medio del programa matemático *Origin 50* se ajusta los puntos a una curva Gaussiana, obteniendo el error para cada volumen de neutralización.

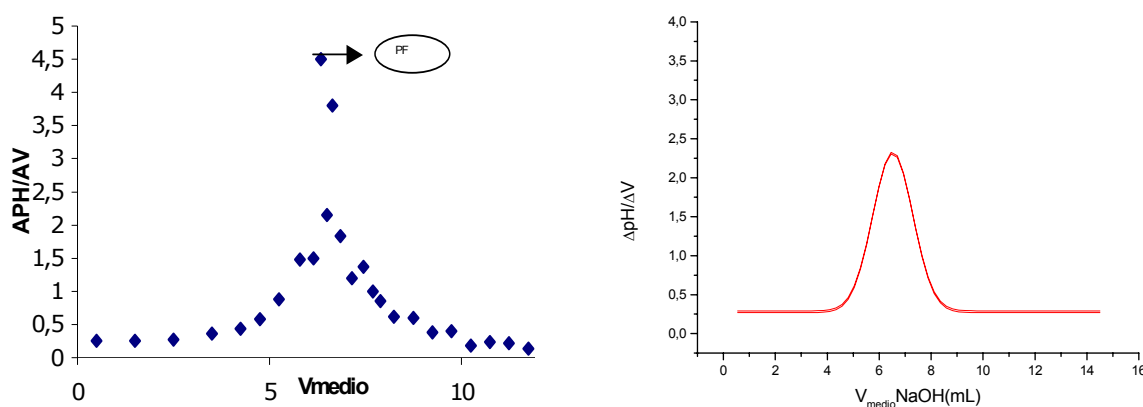


Figura 80. Primera derivada para obtener el volumen de neutralización

En la **Figura 81** se muestra la acidez a lo largo del tiempo (días) de los todos los vinos donde se comprueba que en general la acidez es constante durante los primeros 15

días y, a partir de entonces, comienza a subir ligeramente. En el día 48 alcanza el valor de mayor acidez porque el vino se ha “picado”.

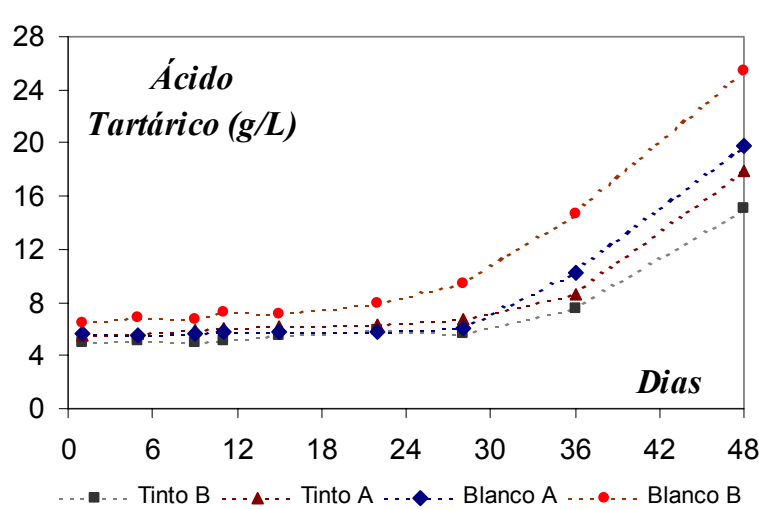


Figura 81. Variación de la acidez de los vinos

6.4 MEDIDAS DE LA LENGUA ELECTRÓNICA

El proceso de medida de cada día consistió en sumergir la placa multielectrodo en un recipiente con aproximadamente 200 ml de vino y realizando las medidas hasta que se alcanzaba el estado estacionario de forma similar a experiencias anteriores. Con todas las medidas se construye una matriz de datos formada por 9 columnas y una fila para cada día. Esta matriz se repite para cada uno de los 4 vinos. Con los datos de esta matriz se realizaron gráficas preliminares y se comprobó que tres de los vinos (Tintos A y B y Blanco A) tienen un comportamiento bastante homogéneo entre sí, mientras que el cuarto vino (Blanco B - Valdepeñas) difiere sustancialmente de los otros vinos. Además es coincidente con el análisis de acidez, que poseía valores superiores. Por este motivo los posteriores análisis se realizarán solamente con tres vinos. En la **Figura 82** se muestra las trazas de los distintos electrodos para cada uno de los vinos clasificando las gráficas por los materiales de los electrodos.

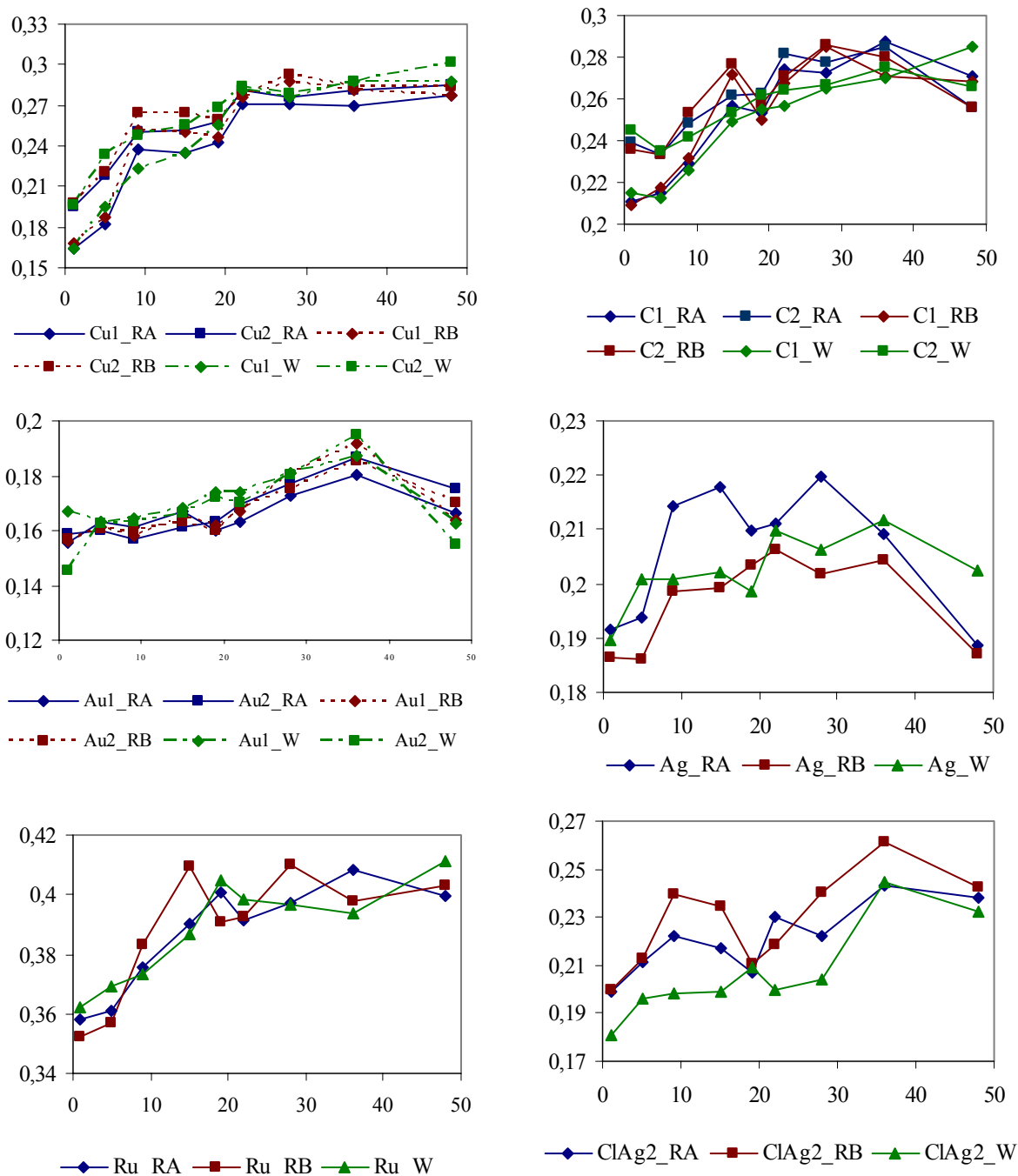


Figura 82. Resultados de algunos electrodos potenciométricos (Volt vs. Días)

En las gráficas se observa que hay algunos materiales como el cobre, óxido de rutenio y el carbón para los que las trazas tienen un claro comportamiento ascendente con el tiempo y para todos los vinos, mientras que otros materiales, como el oro, plata y $ClAg_2$ poseen un comportamiento también ascendente aunque menos claro que los anteriores, aunque el último día (48) sufren un considerable descenso de potencial. En estas gráficas es difícil observar a primera vista una clara discriminación entre cada tipo

de vino. Este hecho nos sugiere que el comportamiento de los electrodos es bastante homogéneo con todos los vinos.

6.4.1 Análisis PCA de la Lengua Electrónica

Para averiguar si existe discriminación entre los valores de los distintos días, se realiza un análisis PCA con los datos de los electrodos de la lengua electrónica, obteniendo como resultado la gráfica que se representa en la **Figura 83**.

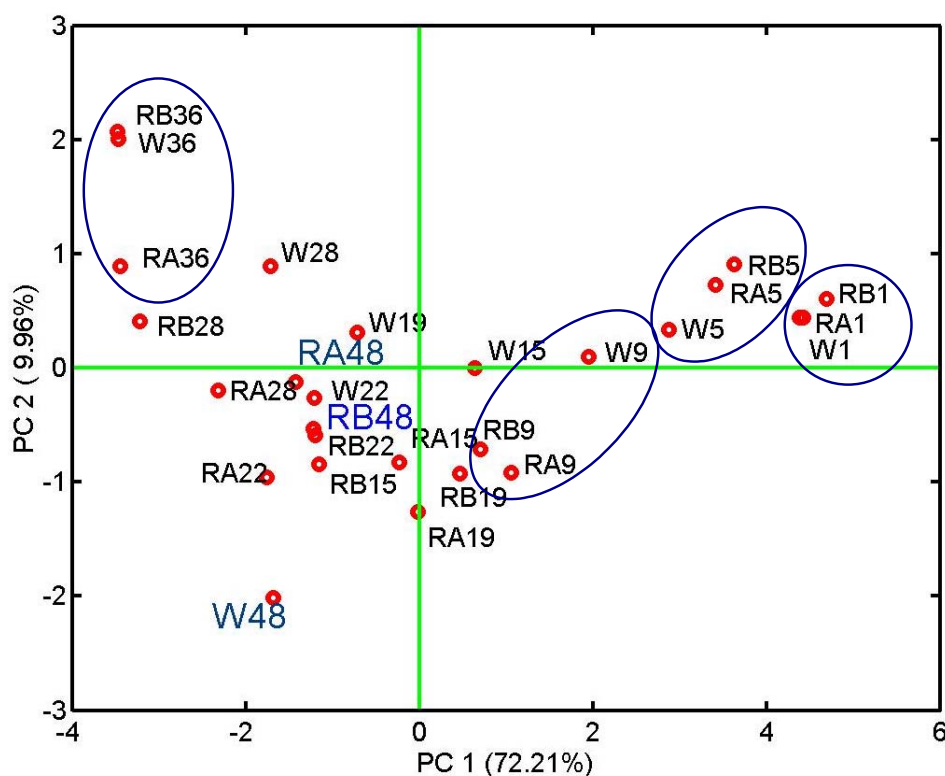


Figura 83. Scores del análisis PCA de la lengua electrónica

En la gráfica se observa una cierta discriminación de algunos días, fundamentalmente los primeros (gracias al comportamiento ascendente de algunos electrodos), pero en cambio no se puede discriminar las medidas del último día (48) que son significativas porque corresponden al aumento súbito de la acidez y a la apreciación organoléptica de vino picado. Es decir, este método tiene aplicación para detectar parte del proceso del deterioro del vino, pero no realiza un análisis completo porque los resultados del día más significativo, es decir el último (48), no son del todo consistentes. Por este motivo, se va a completar la experiencia con el sistema de nariz electrónica.

6.4.2 Pesos de Cada Electrodo en los Componentes Principales (PC)

Para conocer el peso (*load*) de cada electrodo en los valores de los parámetros principales se realizó el gráfico representado en la **Figura 84**

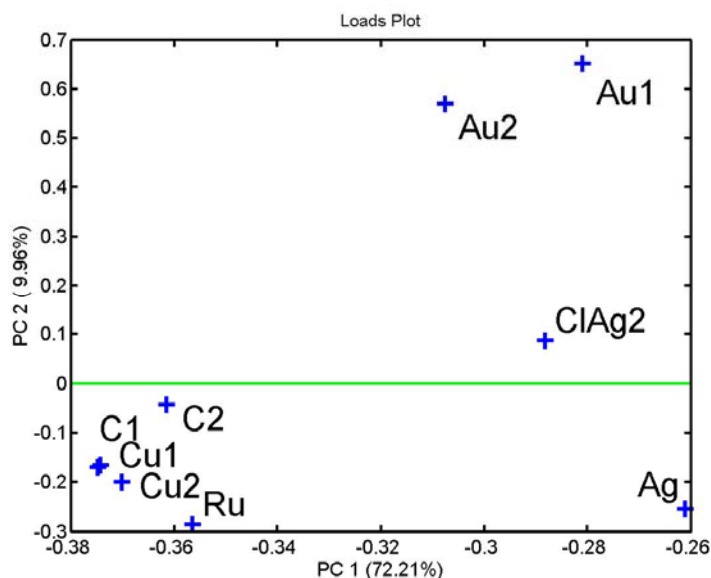


Figura 84. Pesos de los electrodos en el análisis PCA de la lengua electrónica

En este gráfico se muestra los pesos de los 9 electrodos para las dos primeras Componentes Principales (PC1 y PC2). Todos ellos poseen valores negativos de PC1 y se agrupan en dos bloques, por un lado cobre (Cu1 y Cu2), carbón (C1 y C2) y Ru, con una fuerte correlación entre ellos. Y por otro lado oro (Au1 y Au2), plata (Ag) y ClAg₂, más dispersos entre si. Esta característica ya se podía anticipar observando las trazas del potencial de cada material.

6.5 RESULTADOS DE LA NARIZ ELECTRÓNICA

El método experimental de la nariz electrónica fue similar al de la lengua electrónica, se realizaron cuatro experiencias diarias, una para cada vino. Las medidas consistieron en colocar cuatro electrodos, más el electrodo de referencia, en un recipiente con vino pero sin tocarlo. Los electrodos se cubrieron con una pequeña funda de nylon humedecida para así lograr la conductividad eléctrica. El recipiente se cerraba herméticamente y posteriormente tomaban las medidas. El sistema de electrodos es el representado en la Figura 79

De la misma forma que la lengua electrónica, las muestras de cada medida se realizaban cada 5 segundos y terminaban cuando se alcanzaba un valor estable. En las siguientes gráficas se muestran las trazas de las experiencias con el vino tinto RA, donde se comprueba que el electrodo de aluminio ofrece siempre valores negativos de alrededor $-0,5V$, el resto de los electrodos (C, vidrio-pH y Pt) ofrecen valores negativos y positivos pero de menor valor absoluto.

En la siguiente figura se muestra los valores de cada uno de los cuatro electrodos para los tres vinos a lo largo del tiempo.

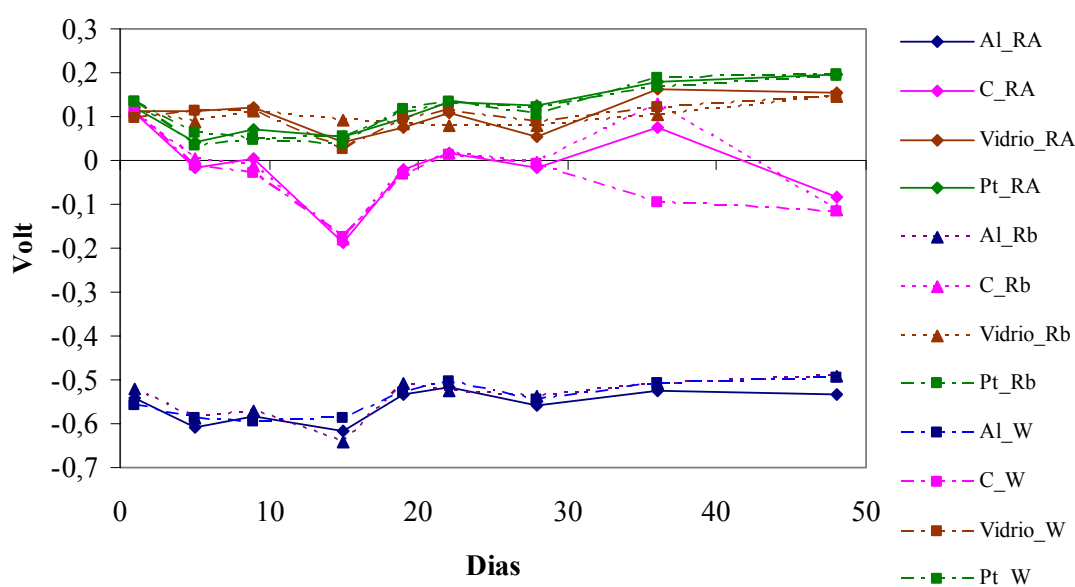


Figura 85. Resultados de los electrodos de la nariz electrónica

En la gráfica conjunta de todos los electrodos se observa que el aluminio presenta siempre valores muy negativos mientras que los otros tres ligeramente positivos, Los tres vinos poseen valores similares para cada electrodo, excepto las medidas de algunos días del grafito (D15). Este hecho sugiere que va resultar difícil discriminar los vinos. En estas circunstancias es aconsejable el uso de herramientas de análisis paramétrico para conseguir la discriminación de los datos.

Los resultados del análisis PCA con los datos de la nariz electrónica se presentan en la **Figura 86**, en ella se comprueba que las medidas del último día (48) están claramente

diferenciadas del resto, mientras que las medidas del resto de los días no poseen una discriminación tan clara como las de la lengua electrónica.

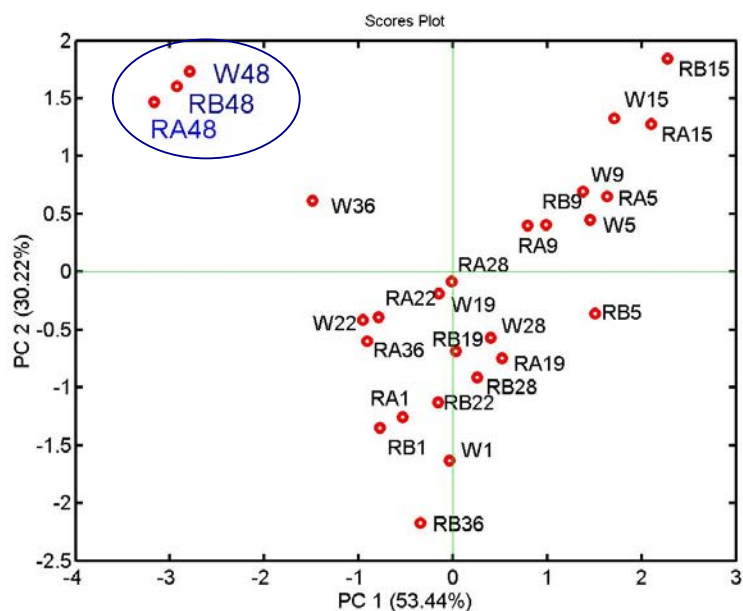


Figura 86. Scores de la nariz electrónica

Para comprobar la posible correlación entre electrodos se representa los pesos de cada electrodo en el análisis PCA, tal como se representa en la **Figura 87**. La gráfica muestra que todos los electrodos poseen valores de PC1 negativos, lo que indica la existencia de correlación de la información de los electrodos. El aluminio (Al) y el platino (Pt) están juntos, luego la información que ofrecen es similar, mientras que el grafito (C) y Pt están es en posiciones dispersas.

Como se ha comprobado en las gráficas anteriores, los sistemas de lengua electrónica y nariz electrónica ofrecen una información complementaria entre si. En el primer caso realizan una discriminación de los primeros días pero no del último (48), mientras que la nariz electrónica es al contrario, discrimina claramente el último día, pero no el resto. En estas circunstancias es lógico pensar en una fusión de los datos de los dos sistemas de medida.

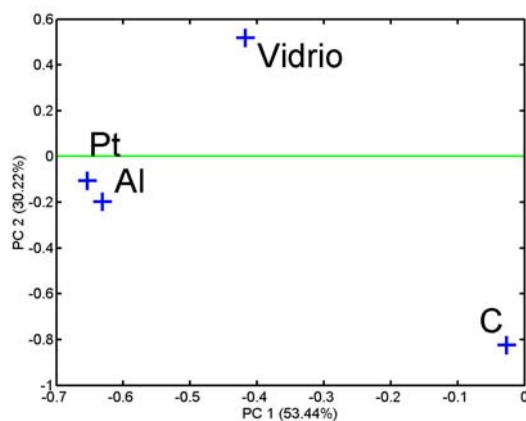


Figura 87. Pesos de los electrodos en la nariz electrónica

6.6 COMBINACIÓN DE LOS DATOS DE LA NARIZ ELECTRÓNICA Y DE LA LENGUA ELECTRÓNICA

Si se combinan los datos de la lengua y nariz electrónica se puede obtener un sistema que actúa como un sensor completo de vino que ofrece información sobre el aroma que emana el vino y de las características del líquido.

Para alcanzar este objetivo, se confecciona una matriz con los datos de los cuatro electrodos de la nariz electrónica (Pt, vidrio, Al y C) y los nueve electrodos procedentes de la lengua electrónica (Cu1, Cu2, C1, C2, Ag, Ru, Au1, Au2, ClAg). Se realizó una selección de los días porque los datos procedentes de días consecutivos era de prever que fuesen bastante similares.

El Análisis de Componentes Principales (PCA) de los datos de la matriz se representa en la **Figura 88**, donde se observan grupos muy representativos

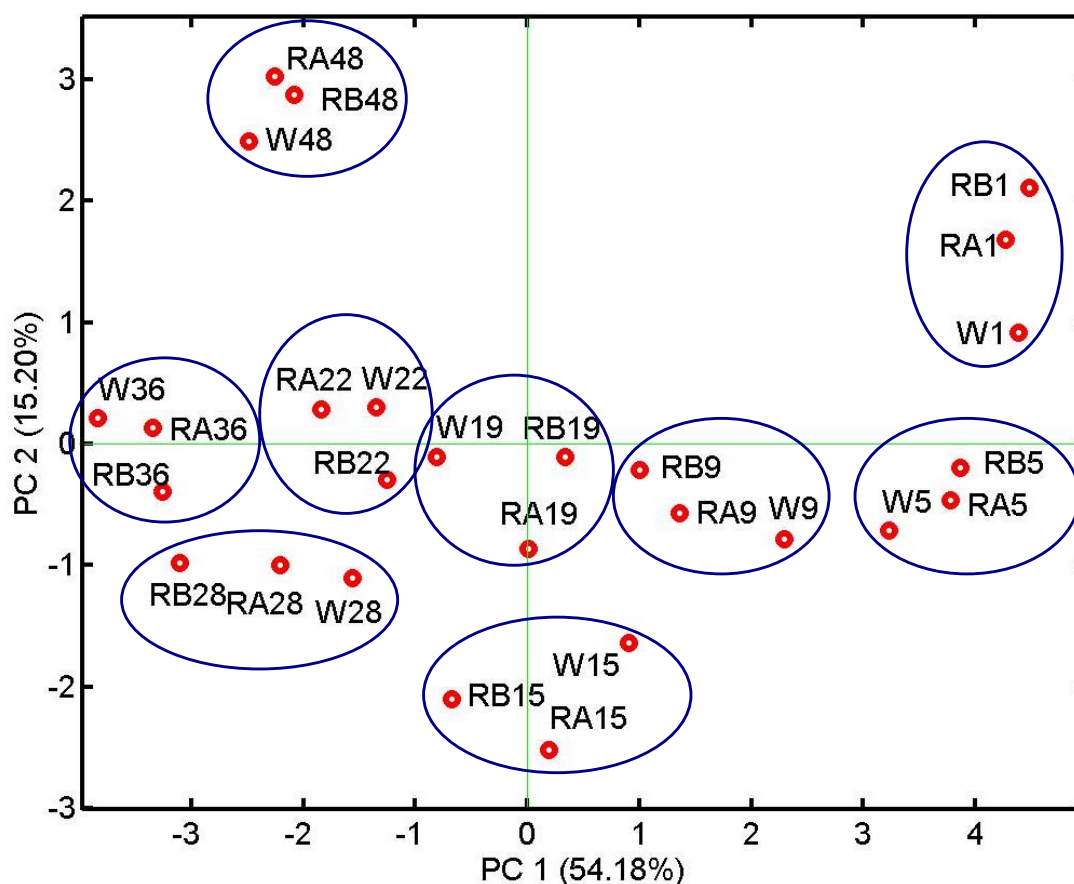


Figura 88. Scores de la combinación de la lengua electrónica y la nariz electrónica

Las muestras de tres vinos RA, RB y W de cada vino de cada día están cerca uno de otro formando grupos como lo muestran los grupos encerrados en elipses, alcanzando en la mayoría de los casos una discriminación aceptable. Los únicos casos en que no hay son los grupos están poco diferenciados son con los datos con pocos días de diferencia (19 y 22).

Existe un cierto orden entre la posición en PC1 y el día de experiencia, de esta manera los *scores* de los días iniciales están localizados en la parte de la derecha y el día siguiente están gradualmente localizada hacia a la izquierda. La única excepción es la experiencia del día 48 que está localizado en un valor intermedio de PC1.

Los resultados del día 48 son bastante distintos al resto, este hecho es indicado por el parámetro PC2. Este parámetro es bastante diferente en los datos de ese día porque están en la parte superior de la gráfica y el resto está en la parte inferior.

Comparando los resultados de esta gráfica con las medidas de acidez de los vinos (**Figura 81**) se comprueba la existencia de una relación entre ambas formas de medida porque hay una gran diferencia entre las medidas del último día con respecto al resto de los días. Pero en cambio el sistema combinando de lengua y nariz electrónica también puede discriminar las medidas de cada uno de los días seleccionados, algo que la medida de la acidez no es capaz de realizar. De esta forma, se llega a la conclusión que el sistema de medida presentado no solo es capaz de detectar la acidez del vino sino que es sensible a otros elementos del vino, tanto volátiles, por medio de la nariz electrónica, como líquidos por medio de la lengua electrónica.

Para completar las conclusiones de los *scores* de la gráfica PCA es útil realizar una gráfica con los pesos (*loads*) de cada electrodo, que se muestran en la Figura 89.

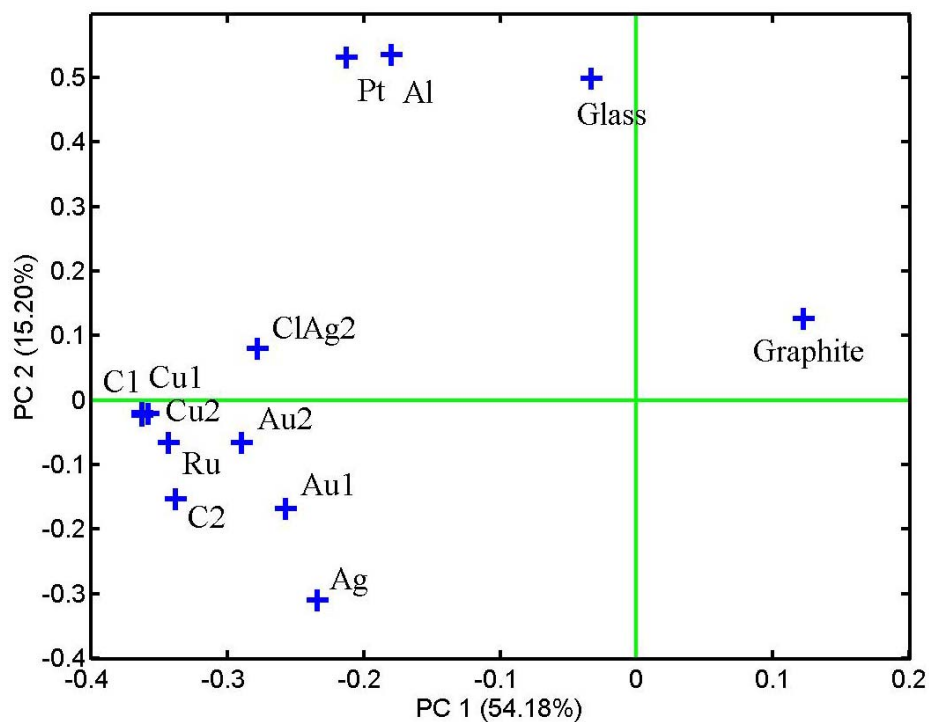


Figura 89. Pesos de la combinación de la lengua electrónica y la nariz electrónica

Observando la gráfica se llega a las siguientes conclusiones:

El comportamiento de los electrodos del sistema de la lengua electrónica es bastante diferente a los electrodos de la nariz electrónica. Este hecho es bastante lógico porque son de naturaleza distinta y las circunstancias de las medidas son muy

diferentes, en el primer caso los electrodos estaban en contacto con el vino mientras que en el segundo caso no lo estaban.

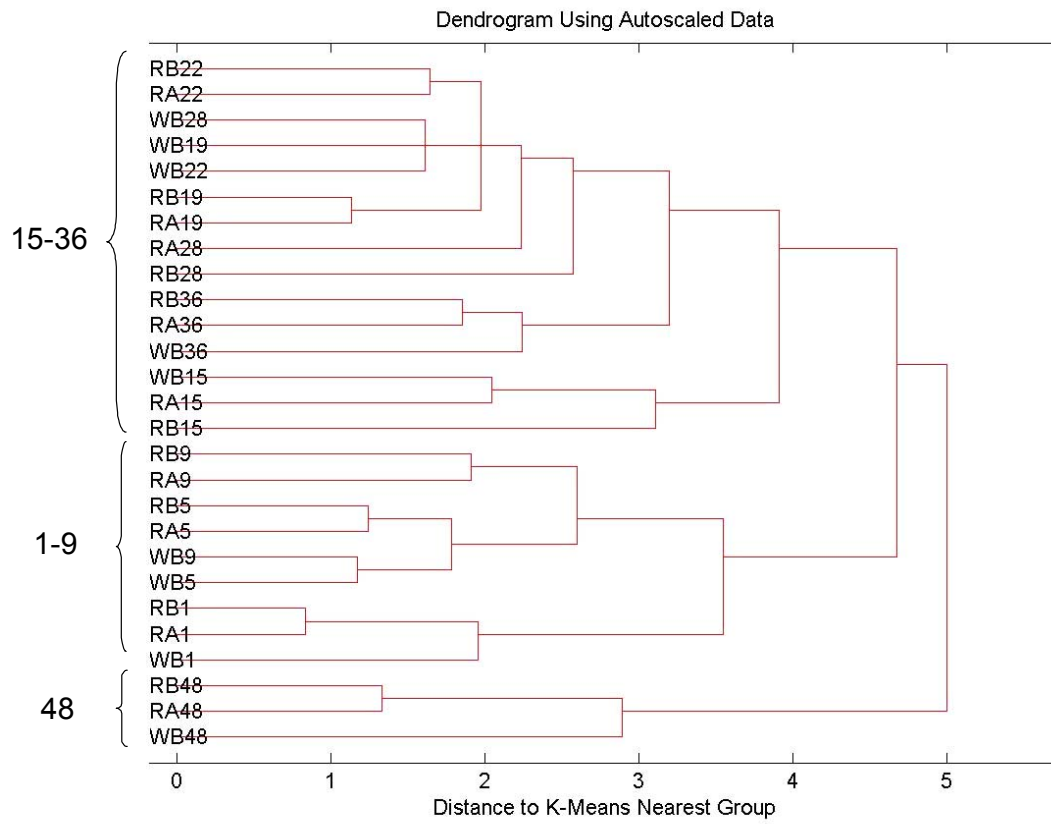
Los pesos de los electrodos de la lengua electrónica están muy cercanos entre si, su comportamiento es muy homogéneo. Además, todos los electrodos de la lengua electrónica están en la parte izquierda de la gráfica, con valores negativos de PC1, por lo que existe una correlación entre dichos electrodos con respecto a este parámetro. De esta forma, un valor de PC1 negativo alto significa, en general, medidas altas de los electrodos de la lengua electrónicas. Este hecho explica el orden casi consecutivo de los puntos con respecto el tiempo en la gráfica precedente.

Los electrodos de vidrio, Al y Pt de la nariz electrónica están situados en la parte inferior de la gráfica, entonces las medidas con valores superiores están en la parte inferior de la gráfica. Este hecho explica que las medidas del día 48 están separadas del resto. Una posible interpretación química de estos resultados es, que el último día (48) los vinos despiden aromas con una acidez superior al resto de los días es decir los vinos están picados.

Se observa una distribución de los *loads* en forma de círculo alrededor del centro, lo que significa que el comportamiento de los electrodos está bien definido por los dos primeros parámetros principales (PC1 y PC2), estos parámetros aportan el 69,38% de la información. La excepción es el electrodo de grafito que está bastante cerca del centro, esto hecho significa que el electrodo no está bien definido por los dos primeros PC. Este comportamiento ya era predecible con la visualización de las trazas de la **Figura 86**, donde aparecen variaciones aparentemente erráticas y poco fiables, por este motivo de un electrodo de este tipo podría prescindirse en posteriores experiencias.

Otra forma de relacionar los datos de una matriz es mediante de un árbol de tipo **dendograma** (capítulo 4). En la **Figura 90** se muestra los resultados utilizando la técnica del vecino más próximo (k-NN). Este tipo de análisis tiene la ventaja respecto a PCA que plasma el 100% de la información. En la gráfica se observa que, a partir del tronco común, la primera “rama” que se desprende corresponde con los datos del día 48 (parte inferior de la gráfica). Con el resto de datos, el árbol se bifurca en dos grandes ramas, una correspondiente a los primeros días (1 a 9) y otra a los últimos días (15 a 22). Cada una de estas dos ramas continúan bifurcándose sucesivamente hasta separar

todas las medidas. Este mismo análisis también se puede realizar con técnicas *k-means* con resultados similares



Capítulo 7. Experiencias: Análisis de la Conservación de Pescado

Una vez comprobada en capítulos anteriores la capacidad de la lengua electrónica potenciométrica para la discriminación de muestras de aguas naturales o disoluciones líquidas complejas como el vino, se plantea su uso para el análisis de la conservación de alimentos perecederos, como es el caso del pescado fresco, cuya vida útil es bastante breve debido a su rápida y fácil descomposición y por el interés de la industria pesquera en la búsqueda de métodos que permitan la detección de la frescura de pescado de forma rápida, cómoda y económica.

En los métodos clásicos de análisis de la calidad del pescado se realizan diversos tipos de análisis físicos, químicos y microbianos, para detectar los compuestos que intervienen directamente sobre la calidad del alimento y así obtener una caracterización del mismo. Estos tipos de análisis suelen ofrecer una gran precisión y fiabilidad, pero suelen realizarse en laboratorios utilizando medios técnicos complejos y costosos y ejecutados por personal especializado. En muchas ocasiones, es conveniente realizar análisis de alimentos con mayor interés cualitativo que cuantitativo, de forma rápida y económica, en los lugares donde se preparan, almacenan o comercializan los alimentos y realizado por personal no necesariamente especializado. Por este motivo, se investiga la posibilidad de que electrodos potenciométricos sencillos puedan ofrecer una información válida sobre la conservación del pescado.

A lo largo de este capítulo se presentan los trabajos y resultados de las experiencias realizadas sobre pescado fresco con un sistema de electrodos potenciométricos múltiples. Este extenso capítulo se divide en los siguientes apartados: presentación de las características biológicas de los peces y el proceso del deterioro del pescado, en el siguiente apartado se detallan los parámetros de medida de la frescura del pescado y los precedentes del uso de nariz y lengua electrónica aplicada a la calidad del pescado. A partir del apartado 3 se describe las distintas experiencias realizadas para la tesis.

Primero con disoluciones preparadas y a partir del punto 4 con pescado real. Se han realizado un total de 6 tandas de experiencias con pescado real, todas ellas en el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la UPV en el transcurso de aproximadamente un año. En ellas se han utilizado distintos tipos de electrodos, métodos de medida y presentaciones del pescado. En los últimos puntos se realiza un análisis multivariante, resumen y perspectivas de futuro.

1 ASPECTOS BIOLÓGICOS

El pez es uno de los vertebrados más numerosos con 20.000 especies conocidas. Por lo general se dividen en tres clases: **ciclóstomos**, que son peces no madibulados como las lampreas, los condriictios o peces **cartilaginosos** como los tiburones y rayas y los **osteictios** o peces con estructura ósea, que incluyen la mayor parte de las especies comerciales importantes.

1.1 ANATOMÍA DEL MÚSCULO DE LOS PECES

El tejido muscular de los peces está compuesto por células estriadas. La célula muscular consta de **sarcoplama** que contiene el núcleo, granos de glucógeno, mitocondria, etc y un número (hasta 1000) de miofibrillas. La célula está envuelta por una cubierta de tejido conectivo denominado sarcolema. Las miofibrillas contienen proteínas contráctiles, actina y miosina.

Generalmente el tejido muscular es blanco pero, dependiendo de la especie, muchos peces presentan cierta cantidad de tejido oscuro de color marrón o rojizo. Este músculo presenta un alto contenido de lípidos del músculo oscuro que resulta importante debido a los problemas asociados a la rancidez.

1.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La composición química de los peces varía considerablemente entre las diferentes especies y también entre individuos de una misma especie, dependiendo de la edad, sexo, medio ambiente y estación del año. Los principales compuestos químicos de los peces se ilustran en la Tabla 14

	Min. (%)	Norma (%)	Máximo (%)
Proteínas	6	16-21	28
Lípidos	0,1	0,2-25	67
Carbohidratos		0,5	
Cenizas	0,4	1,2-1,5	1,5
Agua	28	66-81	96

Tabla 14. Principales constituyentes (%) del músculo del pescado²⁹⁴

1.2.1 Lípidos

Los lípidos presentes en las especies de peces óseos pueden ser divididos en dos grandes grupos: los **fosfolípidos**, que constituyen la estructura integral de la unidad de membranas de la célula y los **triglicéridos** que son empleados para el almacenamiento de energía en depósitos de grasas. Los triglicéridos son a menudo denominados depósitos de grasa.

Los lípidos de los peces difieren de los lípidos de los mamíferos debido a que están compuestos por ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) con un alto grado de insaturación. Los ácidos grasos de los mamíferos raramente contienen más de dos dobles enlaces por molécula mientras que los depósitos grasos del pez contienen muchos ácidos grasos con cinco o seis dobles enlaces.

1.2.2 Proteínas

Las proteínas estructurales de músculo del pescado (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina) conforman el aparato contráctil, responsable de los movimientos musculares. Las proteínas de los peces contienen todos los aminoácidos esenciales y tienen un valor biológico muy alto. La temperatura de coagulación es del orden de los 40°C, lo que repercute en los procesos de cocción y deshidratación industriales.

²⁹⁴ M. Stansby, A. Hall. *Chemical composition of commercially important fish of the USA*. Fish. Ind. Res., 3 (1967) 29-34.

1.2.3 Compuestos Extractables que Contienen Nitrógeno

Los compuestos extractables que contienen nitrógeno pueden definirse como compuestos de naturaleza no proteica, solubles en agua, de bajo peso molecular y que contienen nitrógeno. Esta fracción de **nitrógeno no proteico (NNP)** constituye en los peces teleósteos entre un 9 y un 18% del nitrógeno total.

Los principales componentes de esta fracción son: bases volátiles como el amoníaco y el **óxido de trimetilamina (OTMA)**, creatina, aminoácidos libres, nucleótidos y bases purínicas y, en el caso de peces cartilagosos, urea.

El OTMA constituye una parte característica e importante de la fracción NNP en las especies de agua de mar en cantidades del 1 al 7% del tejido muscular, pero no se encuentra en especies de agua dulce y en organismos terrestres. La fracción de NNP contiene también una cierta cantidad de aminoácidos libres.

1.2.4 Compuestos que Contienen Azufre

El azufre se encuentra en alimentos ricos en proteínas como la carne, pescado, huevos o lácteos. El azufre es un mineral componente esencial de los aminoácidos azufrados, como la metionina y la cisteína. Es un mineral necesario para la formación de colágeno y otros componentes proteicos que forman parte del tejido conectivo, como la queratina que forma parte de la piel, y otros mucopolisacáridos que componen los huesos, cartílagos, tendones y ligamentos.

1.2.5 Vitaminas y Minerales

La cantidad de vitaminas y minerales es específica de la especie. En general la carne de pescado es una buena fuente de vitamina B y en el caso de las especies grasas, también de vitaminas A y D. Respecto a los minerales, la carne de pescado se considera una fuente particularmente valiosa de calcio y fósforo, así como también de hierro y cobre. Los peces de mar tienen un alto contenido en yodo. En la **Tabla 15** se muestra la concentración de algunos constituyentes minerales del músculo del pescado.

Elemento	Valor promedio (mg/100g)	Rango (mg/100g)
Sodio	72	30-134
Potasio	278	19-502
Calcio	79	19-881
Magnesio	38	4,5-452
Fósforo	190	68-550

Tabla 15. Algunos constituyentes minerales del músculo de pescado²⁹⁵

Es interesante señalar que el sodio no está en mayor proporción que en las carnes de mamíferos, ni aun en los pescados de origen marino, y que la proporción de potasio es de dos a tres veces mayor. Este hecho es importante en relación con las enfermedades cardiovasculares.

1.3 CAMBIOS POST-MORTEM Y EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL PESCADO

Una vez que el pez es extraído de su medio natural, muere y se convierte en pescado, en su cuerpo se produce una serie de procesos naturales que conllevan el deterioro del pescado y su afección al consumo. Los procesos que alteran la calidad del pescado se puede clasificar en diversos tipos: **sensoriales**, **autolíticos** y **bacterianos**. Cada uno de estos tipos tiene unos parámetros de medida con los que se cuantifica la calidad del pescado. Durante el transcurso de su deterioro, las condiciones de almacenamiento del pescado serán claves para alargar o acortar el tiempo de vida comercial.

1.3.1 Cambios Sensoriales en el Pescado Fresco Crudo

Los cambios sensoriales son los que percibimos a través de los sentidos, por ejemplo apariencia, olor, textura y sabor.

²⁹⁵ J. Murray, J.R. Burt. *The composition of fish*. Torry Advis. Note, Aberdeen, 38 (1969).

Los primeros cambios sensoriales del pescado durante el almacenamiento están relacionados con la apariencia y la textura. El sabor característico de las especies normalmente se desarrolla durante los dos primeros días de almacenamiento en hielo.

El cambio más evidente es el ataque del *rigor mortis*. Inmediatamente después de la muerte el músculo del pescado está totalmente relajado, la textura flexible y elástica generalmente persiste durante algunas horas y posteriormente el músculo se contrae. Cuando se torna duro y rígido, todo el cuerpo se vuelve inflexible y se dice que el pescado está en *rigor mortis*. Esta condición generalmente se mantiene durante uno o más días y luego se resuelve el rigor. La resolución del *rigor mortis* hace que el músculo se relaje nuevamente y recupere la flexibilidad, pero no la elasticidad previa al rigor.

1.3.1.1 Evaluación por Métodos Sensoriales

La evaluación sensorial del pescado crudo en mercados y sitios de desembarque se efectúa mediante la evaluación de la apariencia, textura y olor. Este es el método más importante de evaluación del pescado.

- **Visión:** apariencia de la piel y el color y aspecto de los ojos.
- **Táctil:** firmeza y elasticidad de la carne.
- **Olor:** de las agallas.

Un conjunto de panelistas debidamente entrenados puede evaluar todos estos atributos sensoriales, por ejemplo: apariencia, textura, olor, color de agallas, etc. Cada atributo se traslada a una escala numérica de un sistema establecida de puntuación demérito²⁹⁶.

Todos los atributos se evalúan por medio de un simple sumatorio de las puntuaciones deméritos y el resultado es un valor de frescura del pescado. Este valor se denomina **Método de Índice de Calidad (QIM- Quality Index Method)**. El QIM se introdujo para el bacalao, sin embargo se puede realizar modificaciones para otras

²⁹⁶ H.A. Bremmer. *Toward practical definition of quality for food science*. Crit. Rev. Food. Sci. Nutr. 40 (2000) 83-90.

especies y muestra una relación lineal con el número de días de almacenamiento en hielo²⁹⁷. Sin embargo, los panelistas entrenados son normalmente caros, necesitan tiempo, y no siempre están disponibles en los diferentes pasos de la cadena logística del pescado. Consecuentemente, para satisfacer la necesidad de medidas de calidad en la industria pesquera, se hacen necesarios métodos instrumentales de medida.

1.3.2 Cambios en la Calidad Comestible

Cuando se requiere un criterio de calidad durante el almacenamiento del pescado refrigerado, se puede llevar a cabo una evaluación sensorial del pescado cocido. Se puede detectar un patrón característico del deterioro del **pescado almacenado en hielo**, el cual puede ser dividido en las cuatro fases siguientes²⁹⁸:

Fase 1: el pescado es muy fresco y tiene un sabor a algas marinas, dulce y delicado. El sabor puede ser muy ligeramente metálico.

Fase 2: Hay una pérdida del olor y del gusto característico. La carne es neutral pero no tiene olores extraños. La textura se mantiene agradable.

Fase 3: Aparecen signos de deterioro y, dependiendo de la especie y del tipo de deterioro (aeróbico o anaeróbico), se producen una serie de compuestos volátiles de olor desagradable. Uno de estos compuestos volátiles puede ser la **trimetilamina (TMA)**. Al inicio de esta fase puede aparecer olores y sabores ligeramente ácidos, afrutados y ligeramente amargos, especialmente en peces grasos. En los últimos estadios de esta fase se desarrollan olores nauseabundos, dulces, amoniacales, sulfurosos y rancios. La textura se torna suave y aguada, o dura y seca.

Fase 4: El pescado puede caracterizarse como deteriorado y pútrido.

Una escala numerada puede ser usada para la evaluación sensorial del pescado cocido según se muestra en la **Figura 91**. La escala está numerada del 0 al 10, donde 10

²⁹⁷ J.B. Luten, E. Martinsdottir. *QIM: European tool for fish freshness evaluation in the fishery chain*, in: *Methods to determine the freshness of fish in research and Industry*. International Institute of Refrigeration, Paris, France, 1997.

²⁹⁸ Hans Henrik Huss *Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros* (FAO) 1997.

indica absoluta frescura, 8 buena calidad y 6 un pescado con sabor neutro (insípido). El nivel de rechazo es 4. Usando la escala según la puntuación señalada, el gráfico adquiere forma de “S” indicando una rápida degradación del pescado durante la primera fase, menor tasa en las fases 2 y 3, y finalmente una alta variación cuando el pescado se descompone.

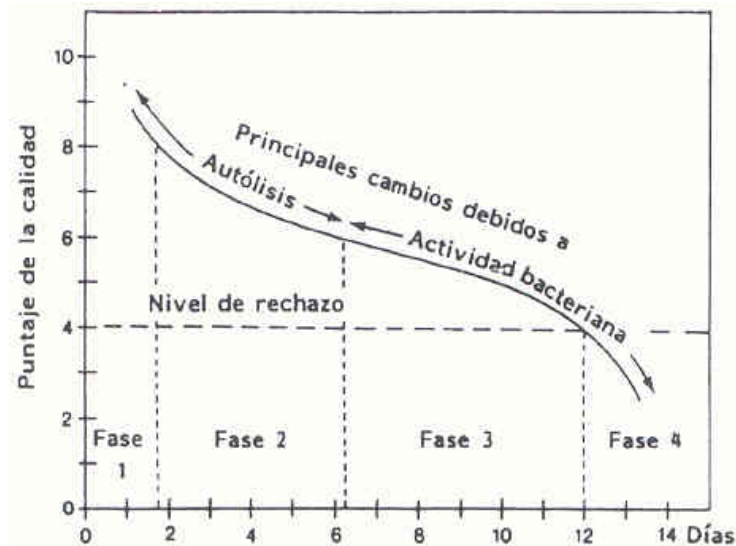


Figura 91. Cambio de la calidad comestible del bacalao en hielo (0°C)²⁹⁹

En la gráfica se indica que los procesos de deterioro tienen dos orígenes, en las primeras fases por cambios autolíticos y en el segundo por la actividad bacteriana.

1.3.3 Cambios Físicos. Propiedades Eléctricas

Las propiedades dieléctricas del tejido muscular cambian marcadamente después de la muerte. La naturaleza de estos cambios es, sin embargo, muy compleja. La disminución de la capacidad eléctrica es muy rápida durante pocas horas, y puede ser debida a una destrucción de la estructura ordenada del agua sobre la superficie de las proteínas. La resistencia disminuye de forma gradual y es atribuido al deterioro de las membranas celulares. Muchos factores pueden influir sobre las propiedades eléctricas, tales como la cantidad de grasa y la temperatura de la muestra. Además, el daño mecánico al tejido así como la congelación conducen a cambios considerables.

²⁹⁹ H. H. Huss. *Konsumfisk – biologi, teknologi, kvalitet og holdbarhed*. Dansk Vet. Tidsskr. 59 (1976) 165.

1.3.3.1 Evaluación de la calidad del pescado por medio de las propiedades eléctricas

Los cambios de las propiedades eléctricas del pescado se traducen en una disminución gradual de la resistencia al paso de la corriente eléctrica, atribuible al deterioro de las membranas celulares³⁰⁰. Se han desarrollado algunos instrumentos: *Torrymeter* (Reino Unido), *Intellectron Fish Tester* (Alemania) y *RT-Freshness Grader* (Islandia) que proporcionan una lectura rápida de la resistencia al paso de la corriente eléctrica y que pueden calibrarse en términos del grado de alteración o de la vida útil que le queda al pescado antes de que sea inadecuado para el consumo humano.³⁰¹ Estos aparatos son pequeños, manejables, se colocan directamente sobre el pescado sin dañar la muestra durante la prueba, dan el resultado de forma inmediata y se correlacionan bien con los métodos sensoriales, cosa que los hace muy útiles en las lonjas, salas de recepción, mercados y otros lugares de control de calidad. Sin embargo, tienen el inconveniente de que no son útiles en pescado fileteado ni congelado³⁰².

1.3.4 Cambios de Parámetros Químicos

Los métodos químicos aportan generalmente, resultados objetivos, fiables y seguros, pero requieren en muchos casos de personal experimentado e instrumentación que, muchas veces tiene un coste elevado. Por ello, actualmente se tiende a desarrollar métodos sencillos y de menor coste que puedan ser aplicables en el análisis rutinario.

El valor de los principales parámetros químicos, como el pH y el potencial redox, así como el control de la descomposición química del pescado, es el aspecto más importante para determinar la calidad del pescado.

³⁰⁰ A. C. Jason, J. C. S. Richards. *The development of an electronic fish freshness meter*. J. Physics E: Scientific Instruments, 8 (1975) 826-80.

³⁰¹ P. Morales, A. I. Haza, Y. Ikken, A. Martínez, B. Sanz, P. E. Hernández, (1996). *Freshness and quality of fish: inspection and evaluation. II Evaluation methods*. Alimentación, equipos y tecnología, 15 (2): 139-147.

³⁰² C. Di Natale, G. Olafsdottir, S. Einarsson, E. Martinelli, R. Paolesse, A. D'Amico. *Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets* Sensors and Actuators B, 77 (2001) 572-578.

1.3.4.1 Cambios en el pH

El pH del tejido muscular vivo es cercano a la neutralidad (pH=7). Posteriormente, dentro de los primeros días después de la muerte y debido a la formación anaerobia post-mortem de ácido láctico, el pH disminuye normalmente a 6,2 – 6,5. Durante los cambios *post-mortem* posteriores, el pH es más o menos constante o aumenta ligeramente debido a la formación de compuestos básicos.³⁰³ Estos valores de pH varían según las especies, el área de pesca y la época del año.

Resulta difícil relacionar un determinado valor de pH con el grado de frescura, ya que el pH final que se alcanza tras la muerte del pescado depende de las reservas glucolíticas de ese momento, algo que es muy variable ya que dependerá del estado nutricional del pescado y del tipo de captura empleada. A pesar de encontrar un aumento significativo del pH durante el deterioro del pescado, se ha propuesto³⁰⁴ que se utilice este parámetro más como una guía de calidad que como un índice propiamente dicho.

1.3.4.2 Cambios en el potencial de óxido-reducción (redox)

El potencial redox es una medida de la tendencia del sistema a suministrar o aceptar electrones. En el pescado recién capturado el potencial redox suele ser positivo en el tejido muscular y permanece prácticamente constante hasta que coincide con el estado organoléptico inaceptable. A partir de aquí el potencial redox disminuye rápidamente y permanece en valores bajos, negativos durante el posterior deterioro. El tiempo en que tarda en descender el valor del potencial redox queda muy influido por la temperatura. En la **Figura 92** se comprueba la variación del potencial redox y del pH del músculo de bacalao a las temperaturas de 0°C y 23°C, comprobando, en el caso del potencial redox, las grandes diferencias entre ambas temperaturas ya que a temperatura de 23°C la caída del potencial redox se produce en el primer y segundo día, mientras que a 0°C la caída de potencial se produce a partir del día 12. En el caso del pH el descenso es menor.

³⁰³ M. R. Pascual-Anderson, (2000). *Microbiología alimentaria. Metodología para alimentos y bebidas*, pp 441. Ed. Díaz de Santos, S. A., 2ª edición. Madrid.

³⁰⁴ C. Ruíz-Capillas, C. Gyllion, W. Horner. (2000). *Determination of volatile basic nitrogen and trimethylamine nitrogen in fish sauce by flow injection analysis*. Eur Food Res Technol, 210 (6): 434-436.

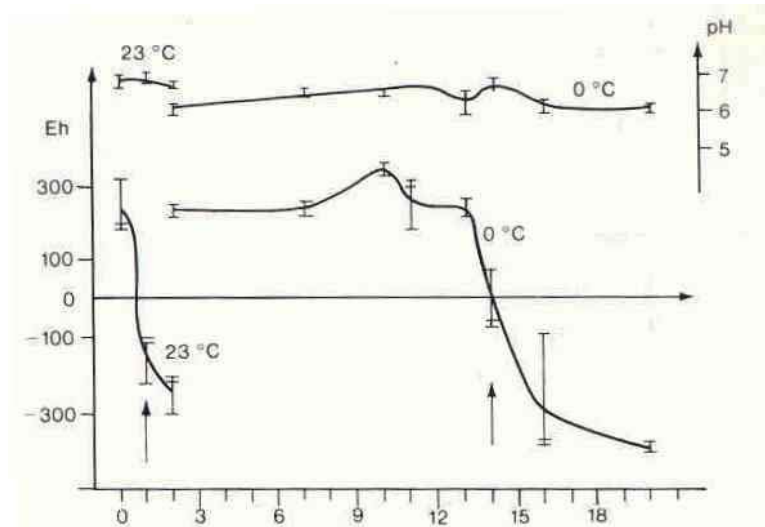


Figura 92. Cambios de pH y potencial redox del músculo del bacalao almacenado a 0°C y 23°C³⁰⁵

Si con el mismo tipo de muestras y a las mismas temperaturas se realizan medidas bioquímicas de validación de compuestos con nitrógeno no proteico como la TMA y OTMA, se producen unos cambios de los valores coincidentes con los momentos en que cambian el valor del potencial redox (**Figura 93**). De acuerdo con ambas figuras, parece existir una fuerte correlación entre potencial redox y la presencia de OTMA. Se ha comprobado que el potencial redox del músculo cae sincrónicamente con la reducción de OTMA a TMA³⁰⁶, aunque en las vísceras del pescado el potencial redox es negativo directamente desde la captura, debido a los contenidos extremadamente bajos de OTMA en estos órganos. También se ha demostrado que en productos como la caballa salada, donde las bacterias reductoras del OTMA están inhibidas y por ello el nivel de OTMA es más o menos constante, el potencial redox no cambia significativamente y permanece positivo³⁰⁷.

³⁰⁵ H. H. Huss, A. Larsen. *The post-mortem changes in the oxidation-reduction potential of fish muscle and internal organs*. Food as an ecological environment for pathogenic and index-organism 79 (1979) 265. ed. K. Sobolenska-Ceronik. Polonia.

³⁰⁶ S. J. Ferguson, J. B. Jackson, A. G. McEwan. *Anaerobic respiration in the Rhodospirillaceae: characterisation of pathways and evaluation of roles in redox balancing during photosynthesis*. FEMS Microbiology Letters, 46, (1987) 117-143.

³⁰⁷ H. H. Huss, A. Larsen. *Changes in the oxidation-reduction (Eh) of smoked and salted fish during storage*. Lebensm.-Wiss. Technol 13 (1980) 40-43.

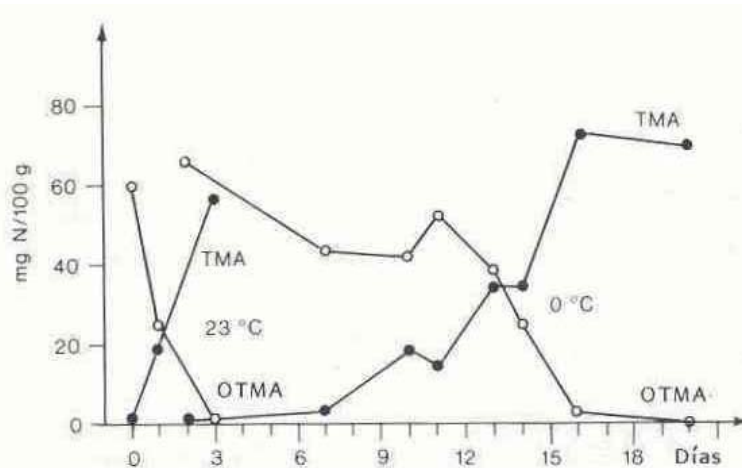


Figura 93. Cambios de TMA y OTMA del músculo del bacalao almacenado a 0°C y 23°C

Debe también señalarse que en los mamíferos, que a diferencia del pez no contiene OTMA, el potencial redox resulta negativo muy poco después de la matanza³⁰⁸. Esto indica que el OTMA es el principal factor que influye en los cambios post-mortem del potencial redox del músculo de peces de agua de mar.

Evaluación del pescado por el potencial redox

Generalmente, las mediciones del potencial redox se realizan utilizando electrodos de platino y electrodos de referencia de calomelanos. La medición del potencial redox no se realiza habitualmente para evaluar la calidad del pescado, pero se buscan métodos sencillos para lograr esta medida.

1.3.5 Cambios Autolíticos

La autólisis es el fenómeno biológico que consiste en la desintegración de algunas células por parte de las enzimas del propio organismo. Cuando un organismo muere se detienen el suministro de oxígeno al tejido celular y la producción de energía se realiza a partir de los nutrientes ingeridos. Las células comienzan una serie de procesos caracterizados por la descomposición del glucógeno (**glucólisis**) y la degradación de los compuestos ricos de energía (**hidratos de carbono**).

³⁰⁸ F. With, L. Leistner. *Redoxpotentiale im Fleischkonserven*. Fleischwirtschaft 4 (1970) 491.

1.3.5.1 Producción de energía en el músculo *post mortem*

En los peces vivos la energía muscular se produce a partir de glucógeno y grasas que son oxidadas (“quemadas”) por las enzimas del tejido en una serie de reacciones las cuales producen finalmente dióxido de carbono (CO₂), agua y **adenosina trifostato (ATP)**, un compuesto orgánico rico en energía. Este tipo de respiración se efectúa en dos etapas: una anaeróbica y otra aeróbica. La última depende de la continua presencia de oxígeno (O₂), solo disponible en el sistema circulatorio.

Cuando el pez muere se encuentra en condiciones de anaerobiosis y el músculo no puede mantener su nivel normal de ATP, y cuando el nivel intracelular alcanza los 1-7 μmoles/g. de tejido el músculo entra en *rigor mortis*. En este momento la glucólisis es la única forma de producción de energía originando una acumulación de ácido láctico que origina una disminución del pH del músculo.

El ATP no es sólo una fuente de energía necesaria para la contracción muscular de los animales vivos, sino que también proporciona plasticidad al músculo.

1.3.5.2 Autólisis y catabolismo de nucleótidos

La resolución del rigor es un proceso que ocasiona el reblandecimiento (relajación) posterior del tejido muscular y coincide con los cambios autolíticos.

De los cambios autolíticos, el primero en ser reconocido es la degradación de compuestos relacionados con el ATP produciéndose procesos de desfosforación y formando secuencialmente: **adenosina difosfato (ADP)**, **adenosina monofosfato (AMP)**, **inosina monofosfato (IMP)**, **inosina (Ino)** e **Hipoxantina (Hx)**. Durante este proceso van apareciendo cambios en su olor y sabor. La inosina es más o menos insípida mientras que la hipoxantina (Hx) imparte un sabor agrio o amargo al pescado en procesos de deterioro³⁰⁹. La pérdida de sabor en la carne del pescado es, por lo tanto, atribuida a la degradación de la IMP³¹⁰.

³⁰⁹ J. Spinelli. J Food Sci, 30: 1063, en Fletcher y col. (1990).

³¹⁰ M. Valle, P. Malle (1998). *Evaluation of fish decomposition by high chromatographic assay ATP degradation products*. JAOAC Int, 81 (3): 571-575.

Los procesos autolíticos descritos se producen de la misma forma en todos los pescados pero la velocidad varía mucho entre especies. Esto hace que la determinación de nucleótidos como la hipoxantina se pueda utilizar para evaluar el grado de frescura.³¹¹

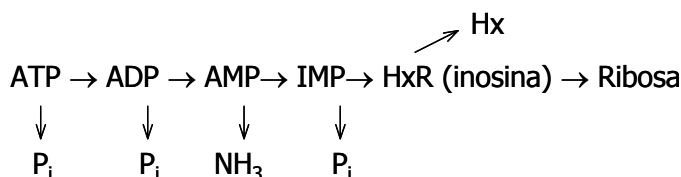


Figura 94. Secuencia de degradación de ATP

1.3.5.3 Evaluación de la calidad del pescado por medio de la medida de la degradación del ATP

En el último paso de la secuencia, participan tanto enzimas autolíticas como enzimas de origen bacteriano. Es por ello que la metabolización de inosina a Hx presenta mayor variabilidad entre especies que las reacciones que le preceden.

La determinación del ATP y sus metabolitos presenta una doble ventaja. Por un lado permite evaluar la pérdida de frescura previa a la proliferación bacteriana. Por otro, la Hx es un metabolito termoestable, con lo que su análisis puede proporcionar información acerca del pescado fresco, refrigerado y en conserva³¹². A partir de las concentraciones de los productos derivados del ATP se introdujo un coeficiente, llamado K, que puede ser indicador de la frescura del pescado³¹³.

$$K(\%) = \frac{(Ino + Hx)}{(ATP + ADP + AMP + IMP + Ino + Hx)} \cdot 100$$

³¹¹ H. H. Huss, *Quality and quality changes in fresh fish*. In Huss, H. H. (Ed.) FAO Fisheries Technical Paper 348, Rome, (1995) pp. 195.

³¹² B. G. Burns, P. J. Ke. *Liquid chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue*. J Assoc. Off. Ana. Cheml, 68 (1985) 444-448.

³¹³ T. Saito, K. Arai, M. Matsuyoshi. *A new method for estimating the freshness of fish*. Bull. Jp. Soc. Sci. Fish, 34 (1959) 749-50

El pescado muy fresco, por lo tanto, tiene un valor de K bajo, que aumenta gradualmente a una velocidad de que depende de la especie.

La concentración de ATP, ADP y AMP decrece muy rápidamente y desaparecen en las primeras 24 horas después de la captura, con lo cual fue propuesto el valor K_1 como índice más simplificado de la frescura del pescado³¹⁴.

$$K_1(\%) = \frac{Ino + Hx}{IMP + Ino + Hx} * 100$$

1.3.6 Cambios Bacteriológicos

Los microorganismos se encuentran en toda la superficie externa del cuerpo (piel y branquias) y en el intestino del pescado vivo y del recién capturado. El número total de microorganismos varía enormemente. Piel 10^2 - 10^7 /g, branquias 10^3 - 10^9 /g.

En el pescado vivo, sano, y en el recientemente capturado, el músculo es estéril y por tanto sólo se encuentra contaminación bacteriana en la superficie externa e interna del pescado. Después de una fase de demora, cuya duración depende principalmente de la temperatura, las bacterias del pescado entran en un crecimiento exponencial y, bajo condiciones aeróbicas, el número total de bacterias alcanza valores de 10^8 - 10^{10} /g de carne o cm^2 de piel cuando el deterioro es manifiesto.

1.3.6.1 Métodos Microbiológicos

La finalidad de los métodos microbiológicos es ofrecer información sobre la calidad higiénica durante la manipulación, elaboración o almacenamiento del producto, así como de la posible presencia de microorganismos de importancia para la salud pública³¹⁵.

³¹⁴ I. Karube, H. Matsuoka, S. Suzuki, E. Watanabe, K. Toyama. *Determination of fish freshness with an enzyme sensor system*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 32 (1) (1984) 314-319.

³¹⁵ P. Morales, A. Haza, Y. Ikken, A. Martinez, B. Sanz, P.E. Hernandez, *Freshness and quality of fish: inspection and evaluation. II Evaluation methods*. Alimentación, equipos y tecnología, 15 (2), (1996). 139-147.

La actividad de los microorganismos es el principal factor que limita la durabilidad del pescado fresco. La legislación española propone como límites máximos, para que el pescado sea apto para el consumo humano, valores de 10^6 ufc/g (unidades formadoras de colonia por gramo) de bacterias mesófilas o 10^3 ufc/g de enterobacterias³¹⁶.

1.3.6.2. Recuento Bacteriano.

A diferencia de los otros métodos, los microbiológicos no dan ninguna información acerca de la frescura o calidad comestible del pescado. La finalidad de estos análisis es dar una imagen de la calidad higiénica del animal, incluyendo el abuso de temperatura e higiene durante la manipulación y el procesamiento.

Un inconveniente de los métodos microbiológicos tradicionales es que normalmente requieren entre 24 horas y 3 días para la obtención de resultados, hecho que limita su utilización. Es por ello, que se han propuesto métodos rápidos, basados generalmente en medidas indirectas de tipo fisicoquímico que permiten ahorrar tiempo en la obtención de resultados.

1.3.7 Nitrógeno Básico Volátil

Tanto la actividad bacteriana, como las modificaciones bioquímicas fruto de la actividad autolítica del pescado dan lugar a una serie de compuestos nitrogenados básicos conocidas en su conjunto como Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT), entre los que destacan el amoníaco, la trimetilamina, (nitrógeno de trimetilamina o NTMA), la dimetilamina (nitrógeno de dimetilamina o NDMA) y la monometilamina, a los que se les considera representativos de la alteración del pescado³¹⁷ La determinación del NBVT presenta una elevada correlación con el grado organoléptico de aceptación del

³¹⁶ MSC, Ministerio de Sanidad y Consumo (1991). Real Decreto 1521/1991. *Orden del 2 de agosto de 1991 por la que se aprueban las normas microbiológicas, los límites de contenido en metales pesados y los métodos analíticos para la determinación de metales pesados para los productos de la pesca y de la acuicultura*, Boletín Oficial del Estado, 195: 27513-27515.

³¹⁷ T. A. Hollingworth, M.M. Wekell, J. J. Sullivan, J. D. Torkelson, H. R. Throm. *Chemical indicators of decomposition for raw surimi and flaked artificial crab*. J Food Sci, 55 (1990) 349-352.

pescado y se aplica en ensayos de rutina debido a que puede ser un método relativamente sencillo de aplicar y barato³¹⁸.

El componente mayoritario de la fracción del NBVT es el NTMA, compuesto originado por la reducción bacteriana del óxido de trimetilamina (OTMA) y al que se considera el responsable del característico “olor desagradable” del pescado.

1.3.8 Aminas Biógenas

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados de carácter básico y de bajo peso molecular, presentes en animales, plantas y microorganismos como consecuencia de procesos metabólicos³¹⁹. Bajo la definición de aminas biógenas se agrupan diversos compuestos que tienen en común su origen biótico y la presencia de, al menos, un grupo amino.

Las aminas biógenas se pueden encontrar en una amplia gama de alimentos, tanto de origen animal como vegetal. Debido a ello, inicialmente se consideró que todas las aminas biógenas eran componentes naturales de éstos. Al estar presentes en medios biológicos muy diversos, es difícil establecer un mecanismo de formación común para todas ellas. Se distingue claramente entre dos grupos de aminas, en función de si su origen es biogénico o natural (fisiológico):

Aminas naturales, de origen fisiológico. Se forman como consecuencia de los procesos metabólicos celulares normales de los seres vivos. Por tanto, su presencia en los alimentos sería de origen endógeno.

Aminas biógenas, se forman por la descarboxilación microbiana de los aminoácidos precursores.

³¹⁸ J. J. Connell. *Control of fish quality*. Ed. Fishing News. Ltd, Surry, Reino Unido, (1995), pp. 235.

³¹⁹ B. Brink, C. Damick, C Joosten. *HML Int J Food Microbiol*, 11 (1990) 73–84.

Para realizar la clasificación de las aminas biógenas más frecuentes en los alimentos, en base a su estructura química se establece tres grandes grupos³²⁰:

Aminas aromáticas: histamina, feniletilamina, tiramina, octopamina, dopamina, serotonina y triptamina.

Diaminas alifáticas: putrescina y cadaverina.

Poliaminas alifáticas: agmatina, espermina y espermidina.

En el pescado se acepta que el origen de contenidos elevados de aminas biógenas es fruto de la actividad aminoácido descarboxilasa que presentan algunos microorganismos, y es por ello que su determinación se ha propuesto para reflejar el deterioro del pescado. Entre otros aspectos, el interés de la determinación de las aminas biógenas se centra en la necesidad de controlar el contenido de algunas de ellas (como la histamina) ya que se han descrito problemas toxicológicos relacionados con el consumo de pescado que presentaba contenidos elevados de estas sustancias³²¹.

2 LINEAS DE INVESTIGACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN CALIDAD DEL PESCADO CON MÉTODOS RÁPIDOS

Las investigaciones para determinar la calidad del pescado han seguido diversas líneas, por un lado las que intentan medir los distintos parámetros químicos, biológicos y microbianos que se han expuesto en el punto 1.3 de este capítulo y que permiten determinar la calidad del pescado de la manera más exacta y detallada posible. Estos métodos son precisos, pero suelen necesitar instrumental complejo y caro, el proceso de análisis es lento y necesita personal especializado.

³²⁰ S. Bardócz. *Polyamines in food and their consequences for quality and human health*. Trends Food Sci Technol 6, (1995), 341-346.

³²¹ A. Mariné-Font, M.C. Vidal-Carou, M. Izquierdo-Pulido, M.T. Veciana-Nogués, T. Hernández-Jover. *Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse*. Ann Fals Exp Chim, 88, (1995), 119-140.

Otra manera de evaluar la calidad del pescado es por medio de panelistas humanos que cuantifican los atributos sensoriales. Se evalúa y cuantifica el aspecto de diversas partes del pescado (carne, ojos, branquias, piel, etc) percibiendo para cada parte cualidades como su apariencia, color, textura y olor. Con estas observaciones se obtiene un resultado numérico final que equivale a la frescura del pescado denominado **QIM** (*Quality Index Method*), Para aplicar este método de trabajo se precisa de panelistas humanos, bien preparados y entrenados, con todos los inconvenientes que conlleva esta circunstancia (subjetividad, fatiga sensorial, heterogeneidad, costo económico, etc). La introducción de instrumentos artificiales que imitan los sentidos humanos permiten obtener resultados similares a los juicios humanos. De este modo se ha desarrollado el denominado Índice Artificial de Calidad (*Artificial Quality Index- AQI*) que pretende sustituir cada uno de los sentidos humanos con su correspondiente instrumento artificial. Así se aplican colorímetros, analizadores de textura y narices electrónicas. Además se complementan las medidas con pruebas de medida de impedancia eléctrica, espectroscopia y análisis de imagen.

2.1 PROYETO EUROPEO DE INVESTIGACIÓN *MUSTEC*

La Unión Europea ha puesto en marcha diversos proyectos de investigación encaminados a encontrar métodos objetivos y uniformes para determinar la calidad del pescado como una combinación de distintos tipos de métodos³²².

El Proyecto de investigación *MUSTEC* (*Multisensor Techniques for monitoring the quality of fish*. FAIR 98-4076), financiado por la Unión Europea, ha desarrollado técnicas para controlar la frescura del pescado, con el objeto de ofrecer a los consumidores una mejora de la conservación del producto.

El organismo español participante en el proyecto *MUSTEC* es el Instituto de Frío del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

³²² G. Olafsdottir, E. Martinsdóttir, J. Oehlenschläger, P. Dalgaard, B. Jensen, I. Undeland, I.M. Mackie, G. Henahan, J. Nielsen, H. Nilsen. *Methods to evaluate fish freshness in research and industry*. Trends in Food Science & Tehnology, 8 (1997) 258-265.

Los investigadores del MUSTEC han desarrollado instrumentos para medir los cuatro principales atributos del pescado:

Textura: Mediante instrumentos de compresión del cuerpo del pescado se mide su firmeza y elasticidad. Estos parámetros varían antes y durante el *rigor mortis* y durante varios días de almacenamiento refrigerado.

Componentes volátiles: El olor está fuertemente asociado con la frescura. Una nariz electrónica captura los gases volátiles permitiendo el reconocimiento de la frescura del pescado.

Impedancia Eléctrica: Esta cualidad depende de la ruptura del músculo del pescado por deterioro autolítico y correlaciona bastante bien con la frescura del pescado fresco entero.

Métodos ópticos (color, análisis de espectro e imagen): El color y el espectro de transmisión visible cambian con la frescura del pescado. La apariencia y brillo de la piel, el color de las agallas y la aspereza de las fibras proteínicas en la superficie de corte de los filetes de pescado, cuantificadas por análisis de imágenes también se correlacionan con la frescura.

Con todo el conjunto de datos obtenidos y valorados de forma proporcional se obtiene un valor de la frescura del pescado denominado **Índice Artificial de Calidad** (AQI -*Artificial Quality Index*)³²³ y que se pueden resumir en la **Figura 95**

³²³ G. Olafsdottir, P. Nesvadba, C. Di Natale, M. Careche, J. Oehlenschläger, R. Tryggvadóttir, R. Schubring, M. Kroeger, K. Heia, M. Esaiassen, A. Macagnano, B. Jorgensen. *Multisensor for fish quality determination*. Trends in Food Science and Technology, 15 (2004), 86-93.

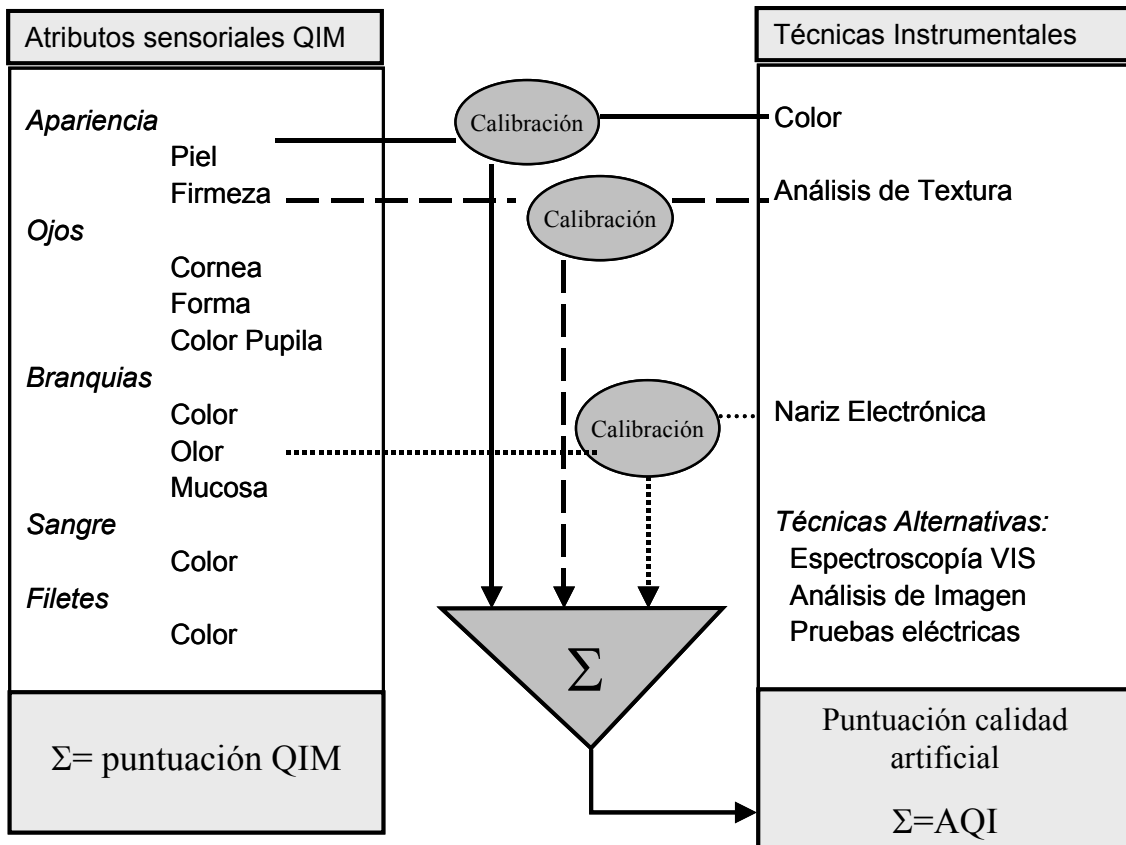


Figura 95. Proceso de evaluación sensorial pescado

En la figura se puede comprobar el paralelismo entre los métodos sensoriales para el análisis de la frescura del pescado que aportan una puntuación para obtener el índice QIM (*Artificial Quality Index*) y las técnicas instrumentales que permiten obtener el índice de calidad artificial (AQI). También se puede comprobar la equivalencia entre los métodos de uno y otro sistema, de forma que la salida de los instrumentos de AQI pueden calibrarse con su correspondiente puntuación QIM.

La combinación de los resultados de diversos instrumentos y la aplicación de las técnicas de análisis multivariante han permitido crear un modelo predictivo de PLS para determinar los valores de QIM. La aplicación se realizó para determinar la frescura de diversos ejemplares de sardinas con distinto tiempo de almacenamiento³²⁴.

³²⁴ A. Macagnano, M. Careche, A. Herrero, R. Paolesse, E. Martinelli, G. Pennaza, P. Carmona, A. D'Amico, C. Di Natale. *A model to predict fish quality from instrumental features*. Sensors and Actuators B, 111 (2005) 293-298.

También puede observarse en la **Figura 95** que **no existen sistemas con lenguas electrónicas para el cálculo del AQI**, probablemente porque estos sistemas no están todavía suficientemente desarrollados. Pero podría ser interesante su incorporación para el cálculo de este índice porque puede ofrecer una información relacionada con el sabor del pescado. De los métodos utilizados para el cálculo del AQI, el más parecido a la lengua electrónica es la nariz electrónica, por lo que puede servir de base para el desarrollo de las lenguas electrónicas. Por ello, puede ser interesante el conocimiento de los desarrollos de la nariz electrónica aplicadas a la determinación de la frescura del pescado.

2.2 MEDIDA DE VOLÁTILES EN EL PESCADO

La medida de volátiles tiene la ventaja de permitir la realización de un análisis no destructivo de la muestra. En el caso del pescado, ya se ha destacado (punto 1.3.7) que hay ciertos elementos volátiles como TMA que intervienen de una forma directa en el proceso de deterioro del pescado. Por este motivo, se han realizado múltiples investigaciones para la detección y medida de volátiles.

La detección de los elementos volátiles procedentes del pescado se ha realizado por diversos medios, como son: detectores cromatográficos³²⁵, espectroscopia con infrarrojos,³²⁶ espectroscopia fluorescente³²⁷, o electrodos resistivos a los que se les suelen aplicar una membrana para convertirlos en más selectivos a un determinado gas. Las investigaciones en este campo van encaminadas a la búsqueda de membranas adecuadas para la mejor detección de los volátiles del pescado. De esta forma, se han

³²⁵ A. Béné, A. Hayman, E. Reynard, J.L. Luisier, J.C. Villettaz. *A new method for the rapid determination of volatile substance: the SPME-direct method. Part II. Determination of the freshness of fish.* Sensors and Actuators B, 72 (2001) 204-207.

³²⁶ N. Boknaes, K. Jensen, C. Andersen, H. Martens. *Freshness assessment of thawed and chilled cod fillets packed in modified atmosphere using near-infrared spectroscopy.* Lebensm. Wiss. Technol. 35 (2002) 628-634.

³²⁷ E. Dufour, J.P. Frencia, E. Kane. *Development of a rapid method based on front-face fluorescence spectroscopy for the monitoring of fish freshness.* Food Research International, 36 (2003) 415-423.

presentado una matriz de electrodos con diversas membranas de tipo Langmuir-Blodgett para la detección de TMA³²⁸.

Otros métodos utilizados para la detección de volátiles procedentes son los piezoeléctricos³²⁹ o los que responden por medio del cambio de color³³⁰.

2.2.1 Aplicación de Técnicas Multivariante para el Control de la Frescura del Pescado. Narices Electrónicas

Para obtener una evaluación global de la calidad del pescado valor se han aplicado sensores no específicos y utilizando métodos multivariante,³³¹ obtenido sistemas de narices electrónicas que realizan una discriminación de muestras de pescado a diversos días de su muerte a partir de los datos procedentes de diversos instrumentos y medidas sensoriales. Se han presentados diversas experiencias para la obtención de narices electrónicas para la evaluación de pescado. Por ejemplo, por medio de sensores comerciales (Figaro) de óxido de estaño y aplicando análisis PCA se ha presentado un sistema de nariz electrónica para distinguir muestras de merluza fresca respecto a otra deteriorada³³².

Es de destacar la comparación de dos sistemas de narices electrónicas para determinar la frescura de filetes de bacalao³³³, por una lado el grupo de investigación de la Universidad “*Tor Vergata*” de Roma ha utilizado su conocido sistema *Libranose*, que utiliza sensores resonantes cubiertos con metaloporfirinas, y por otro lado el sistema *FreshSense* desarrollado por la compañía *Element-Bodvaki* (Islandia) formado por

³²⁸ R. de Saja, J. Souto, M.L. Rodríguez-Méndez, J.A. de Saja. *Array of lutetium bisphthalocyanine sensors for the detection of trimethylamine*. Materials Science & Engineering C, 8-9 (1999) 565-568.

³²⁹ C. Zhao, Y. Pan, L. Ma, Z. Tang, G. Zhao, L. Wang. *Assay of fish freshness using trimethylamine vapor probe based on a sensitive membrane on piezoelectric quartz crystal*. Sensors and Actuators B, 81 (2002) 218-202.

³³⁰ A. Pacquit, K. Lau, H. MacLaughlin, J. Frisby, B. Quilty, D. Diamond. *Development of a volatile amine sensor for the monitoring of fish spoilage*. Talanta, 69 (2006) 515-520.

³³¹ G. Parisi, O. Franci, B. Poli. *Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (Dicentrarchus labrax) during shelf life*. Aquaculture 214 (2002) 153-167.

³³² M. O’Connell, G. Valdora, G. Peltzer, R. Martín Negri. *A practical approach for fish freshness determination using a portable electronic nose*. Sensors and Actuators B, 80 (2001) 149-154.

³³³ C. Di Natale G. Olafsdottir, S. Einarsson, E. Martinelli, R. Paolesse, A. D’Amico. *Comparison and integration of different electronic noses for freshness evaluation of cod-fish fillets*. Sensors and Actuators B, 77 (2001) 572-578.

sensores electroquímicos orientado a determinados gases: CO, H₂S, NO, SO₂ y NH₃. La conclusión, después de diversas medidas, es que el sistema *Libranose* alcanza una alta resolución durante las primeras etapas de la evolución, mientras que la *FreshSense* alcanza mejor resolución al final del proceso. Si se mezclan los resultados de ambos sistemas se obtiene un sistema de gran precisión.

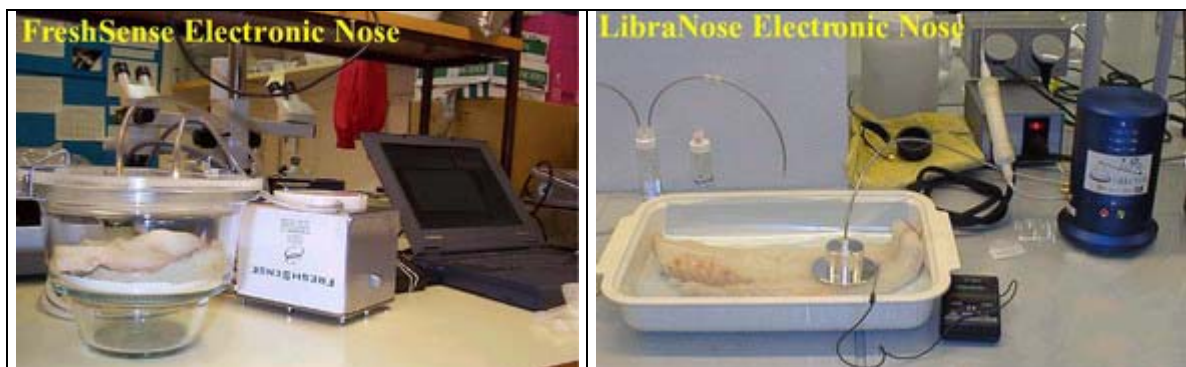


Figura 96. Dos sistemas de nariz electrónica aplicados a la evaluación del pescado

Otros sistemas de nariz electrónica para monitorizar la frescura del pescado utilizan una matriz de electrodos resistivos MOS (Semiconductor metal – oxido) y redes neuronales.³³⁴ La nariz electrónica ha sido combinada con otros parámetros, como las propiedades dieléctricas (TDR) para obtener un sistema para la evaluación de muestras de bacalao³³⁵.

Por medio de sistema comercial de detección de olor presentado por *Cosmos Instrument* (Japón) se ha realizado una comparación con la medida de las propiedades dieléctricas (*Torrymeter*) y junto con medidas químicas han servido para la evaluación de la calidad de diversas especies de pescados de agua dulce que han sido corroboradas con un análisis organoléptico³³⁶.

³³⁴ J. Hammond, B. Marquis, R. Michaels, B. Oickle, B. Segee, J. Vetelino, A. Bushway, M. Camire, K. Davis-Dentici. *A semiconductor metal-oxide array for monitoring fish freshness*. *Sensors and Actuators B*, 84 (2002) 113-123.

³³⁵ M. Kent, J. Oehlenschlager, S. Mierke-Klemeyer, M. Manthey-Karl, R. Knöchel, F. Daschner, O. Schimmer. *A new multivariate approach to the problem of fish quality estimation*. *Food Chemistry*, 87 (2004) 531-535.

³³⁶ A. Gelman V. Drabkin, L. Glatman. *A rapid non-destructive method for fish quality control by determination of smell intensity*. *J. Sci. Food Agric*, 83 (2003) 580-585.

2.3 ANÁLISIS DE CALIDAD DEL PESCADO POR MÉTODOS POTENCIOMÉTRICOS

La medida de volátiles siempre conlleva la dificultad de concentrar el gas a medir en un recinto apropiado y muchas veces trabajar con temperaturas elevadas para el adecuado funcionamiento de los sensores resistivos. Por estos motivos, se ha considerado de interés el uso de métodos de medida con electrodos potenciométricos, donde se mide el potencial eléctrico entre un electrodo activo y otro electrodo de referencia, que se encuentran en un medio conductor, y de esta forma se puede obtener un sistema de lengua electrónica. Las técnicas potenciométricas se han utilizado ampliamente en aplicaciones de control de bebidas, pero poco a alimentos sólidos (pero con amplia proporción de agua), como son las carnes y el pescado.

Para el control de calidad de productos cárnicos, se han presentado diversas experiencias con este tipo de electrodos, por ejemplo para determinar cloritos y nitratos en productos derivados del cerdo³³⁷ o para determinar la frescura del cerdo³³⁸. En este último caso, la frescura del cerdo es evaluada por medio de electrodos sólidos que detectan los elementos responsables de la etapa inicial del proceso de putrefacción del cerdo; los electrodos utilizados son Pt, CuS y Ag₂S y por medio de técnicas de análisis multivariante, encuentran una correlación entre el potencial de los electrodos y el recuento bacteriano.

La utilización de este tipo de electrodos potenciométricos para determinar la frescura del pescado apenas se ha desarrollado. Se han aplicado electrodos de óxido de tungsteno para la determinación de la TMA utilizando técnicas de difusión de gas por inyección de flujo³³⁹, y como lengua electrónica la única información encontrada es la

³³⁷ R. Pérez-Olmos, R. Herrero, J. L. F. C. Lima, M. C. B. S. Montenegro. *Sequential potentiometric determination of chloride and nitrate in meat products*. Food Chemistry, 59 (1997) 305-311.

³³⁸ N. Kaneki, T. Miura, K. Shimada, H. Tanaka, S. Ito, K. Hotori, C. Akasaka, S. Ohkubo, Y. Asano. *Measurement of pork freshness using potentiometric sensor*. Talanta, 62 (2004) 217-221.

³³⁹ N. Adhoum, L. Monser, S. Sadok, A. El-Abed, G.M. Greenway, R.F. Uglow. *Flow injection potentiometric detection of trimethylamine in seafood using tungsten oxide electrode*. Analytica Chimica Acta, 478 (2003) 53-58.

realizada con electrodos de vidrio de calcogenuro y PVC para discriminar muestras de bacalao congelado, refrigerado y a temperatura ambiente³⁴⁰.

La escasa experiencia en investigaciones con electrodos potenciométricos para determinar la frescura del pescado es uno de los motivos que ha llevado a desarrollar la presente tesis doctoral. A lo largo del resto del presente capítulo se presentan las experiencias con electrodos metálicos o de óxidos metálicos aplicando técnicas potenciométricas para determinar la frescura del pescado.

2.4 ELECTRODOS METÁLICOS PARA EL CONTROL DE LA FRESCURA DEL PESCADO

Los electrodos metálicos se han aplicado para la discriminación de elementos líquidos de características químicas sencillas. A la hora de aplicarlos para el análisis de sistemas complejos como el pescado es conveniente relacionar los fenómenos que pueden detectar estos electrodos con los procesos físicos y bioquímicos que se producen en el proceso de degradación del pescado.

Los electrodos compuestos por metales nobles (oro, plata, platino) constituyen un sensor redox (electrodo de orden 0) y se ha indicado en este capítulo (punto 1.3.4.2) que el pescado sufre una variación considerable del potencial redox a lo largo del proceso de conservación y que esta variación viene muy afectada por la temperatura. De esta forma, el potencial generado por esos electrodos podría ser indicador del estado de conservación del pescado.

El electrodo de RuO₂ actúa como indicador del pH, y el valor del pH sufre una ligera variación a lo largo del proceso de degradación del pescado. Por tanto, este electrodo puede participar en el sistema de electrodos que determine la calidad del pescado, aunque se supone que con poca resolución.

³⁴⁰ A. Legin, A. Rudnitskaya, B. Selenev, Y. Blasov. *Recognition of liquid and flesh food using an "electronic tongue"*. *International of Food and Technology*, 37 (2002) 375-385.

El carbón es absorbente de la materia orgánica, puede también incorporarse al sistema de electrodos, pero su comportamiento es indefinido porque durante todo el proceso va a estar en un medio con materia orgánica.

Otro fenómeno de interés en el proceso de descomposición del pescado es el comportamiento de los compuestos orgánicos con azufre. Las proteínas se descomponen en sus correspondientes aminoácidos, los cuales pueden formar cadenas moleculares que se enlazan por medio del átomo de azufre a la superficie de algunos metales, sobretodo el oro, formando un sistema de Monocapas Auto-Ensambladas (SAM- *Self-Assembled Monolayers*)³⁴¹. Estas cadenas producen modificaciones de las propiedades de la superficie, generando un potencial característico que puede ser proporcional a la concentración superficial de la SAM³⁴².

Las SAMs se pueden formar de forma espontánea, se considera su arranque práctico con el descubrimiento de la relación de disulfuros o alcalinotioles sobre superficie de oro.³⁴³ A partir de entonces se ha producido un gran aumento de la investigación sobre SAM debido a su relativamente sencilla construcción y manipulación y por la ayuda en el desarrollo de nuevos biomateriales.

Se han presentado numerosos trabajos de investigación relacionados con la formación de SAMs de aminoácidos sulfurados como la cisteína sobre superficie de oro³⁴⁴, comprobando que modifican las condiciones eléctricas. Este fenómeno es el que hace suponer que los aminoácidos sulfurados que aparecen en los procesos autolíticos durante el deterioro del pescado formen una SAM con los electrodos de oro, modificando el potencial generado.

³⁴¹ R. Possari, R. F. Carvalhal, R. K. Mendes, L. T. Kubota. *Electrochemical detection of cysteine in a flow system based on reductive desorption of thiols from gold* Analytica Chimica Acta, 575 (2006) 172-179.

³⁴² S. Flink, F. van Veggel, D. Reinhoudt. *Sensor Functionalities in Self-Assembled Monolayers*. Advanced Materials, 12, (2000) 1315-1328.

³⁴³ R. G. Nuzzo, D. L. Allara. *J. Am. Chem. Soc.* 105(13), (1983) 4481-4483.

³⁴⁴ R. Smith, P. Lewis, P. Weiss. *Patterning self-assembled monolayers*. Progress in Surface Science, 75 (2004) 1-68.

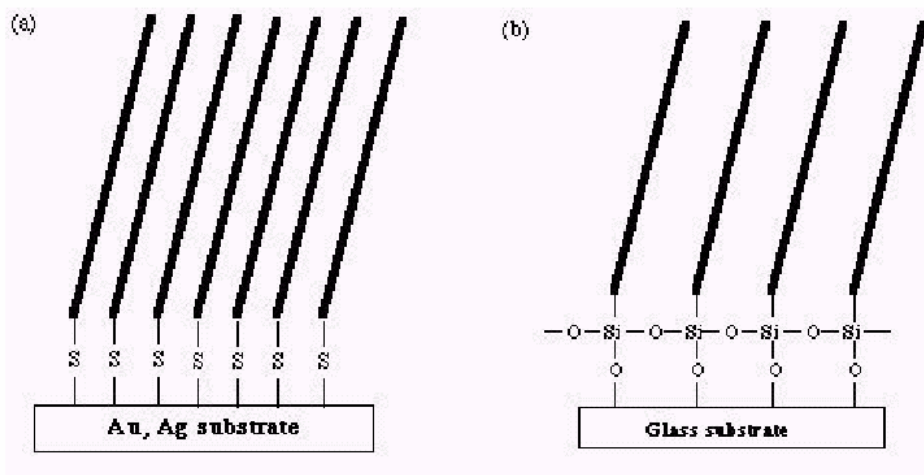


Figura 97. SAM sobre superficie de oro, plata (a) y vidrio (b)

Con los precedentes que se han descrito en esta primera parte del capítulo se plantea el desarrollo de un sistema de lengua electrónica potenciométrica con electrodos metálicos y óxidos metálicos para determinar la frescura del pescado. Las experiencias, resultados y conclusiones se exponen en los restantes puntos de este capítulo.

3 EXPERIENCIAS

Durante la introducción de este capítulo se han presentado las características físicas, químicas y biológicas de los peces vivos, el deterioro en el pescado, los distintos métodos de evaluación de la frescura de pescado y las líneas de investigación para determinar la calidad del pescado por medio de narices y lenguas electrónicas. En esta segunda parte del capítulo se presentan las experiencias y resultados que se han realizado, primero con disoluciones de referencia y posteriormente con pescado real.

3.1 ESTUDIO DE LOS SENSORES EN DISOLUCIONES DE REFERENCIA

En experiencias preliminares con electrodos metálicos sobre pescado se comprobó que existe una variación del potencial de los electrodos a lo largo del tiempo de almacenamiento del pescado. Esta variación de potencial se asume que es causada por las variaciones de la conservación del pescado sobre la superficie de los electrodos. Para asegurar esta relación causa-efecto, se realizaron diversas experiencias con los mismos

electrodos pero sobre disoluciones que simulaban algunas de las características del pescado, fundamentalmente: pH, potencial redox y salinidad.

Los electrodos elegidos fueron de los siguientes materiales: oro, plata, carbón en forma de grafito, cobre y níquel. Se eligieron estos materiales porque fueron los que obtuvieron un mejor resultado con otros tipos de muestras. Los electrodos de oro y plata estaban formados por alambre de 0,8 mm, el cobre por un alambre de 1mm, el carbón por una varilla de grafito de calibre de 8 mm y níquel mediante una chapa de aproximadamente 2 cm².

Las experiencias realizadas fueron medidas con las siguientes muestras:

- Patrones de pH (pH9, pH7 y pH4).
- Patrón de potencial redox.
- Calibrado con cisteína de los electrodos de oro, plata y cobre.
- Calibrado de la salinidad.

3.1.1 Estandarización pH

Para determinar la respuesta de cada uno de los electrodos al pH, se realizaron una serie de medidas con disoluciones calibradas a pH4, pH7 y pH9.

Cada disolución patrón estaba formada por 15 ml del correspondiente tampón de pH más 135 ml de agua destilada. Para cada electrodo se realizaron cuatro medidas con cada una de las disoluciones y se calculó el valor medio de cada pH para cada electrodo. Los resultados de esta experiencia se representan en la **Figura 98**.

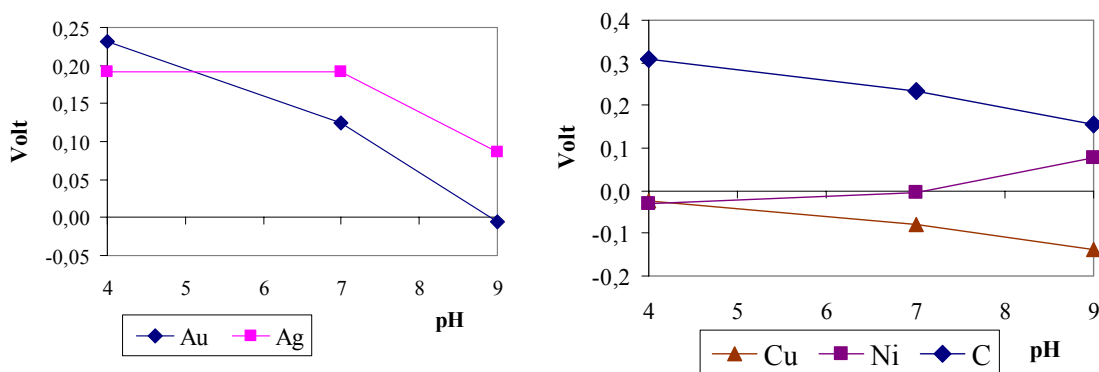


Figura 98. Resultados de calibración electrodo a pH

Se puede observar la variación del potencial de los electrodos con el pH. En la mayoría de los electrodos existe un descenso moderado del potencial al aumentar el pH, por ejemplo, en el caso del oro de 200 mV, la plata, el cobre y el carbón de unos 100 mV, pero el electrodo de níquel sufre un ligero aumento de potencial.

Los datos de la línea de tendencia de los tres valores de pH indican que la mayor pendiente corresponde con el oro con 46 mV/pH y un con buen ajuste (0,97). Es decir tiene un comportamiento casi *Nernstiano* (59 mV/pH).

Metal	Pendiente	Corte eje x	Ajuste (R ²)
Au	-0,0465	0,4270	0,9715
Ag	-0,019	0,286	0,643
Cu	-0,0228	0,0706	0,986
C	-0,0303	0,436	0,9831
Ni	0,0209	- 0,1256	0,8444

Tabla 16, Ajuste resultados calibración pH

3.1.2 Caracterización al Potencial Redox

Como se ha indicado en la introducción de este capítulo, el deterioro de la calidad del pescado tiene clara repercusión en el potencial del potencial redox, debido a los procesos de oxidación en el músculo del pescado. Por este motivo es interesante saber cuál es el comportamiento de los electrodos cuando existe una variación del potencial redox.

Para caracterizar los electrodos al potencial redox se tomó como referencia una disolución de hidroquinona (C₆H₆O₂). Esta sustancia procede de la quinona que se combina con el oxígeno del aire formado la hidroquinona. Esta combinación es reversible y al final hay una mezcla de los dos elementos que genera un potencial muy estable a un pH determinado. Pero si se modifica el pH, se produce una variación del potencial redox, de forma lineal entre el pH. Es decir que produciendo una variación de pH a esta disolución se puede saber cual es la variación del potencial redox.

Para hacer la experiencia se prepararon tres disoluciones de hidroquinona con pH diferente: pH4, pH7 y pH9. Cada disolución está formada por 135 ml de agua destilada, 1,5 g de Hidroquinona y 15 ml tampón pH4, pH7 y pH9 respectivamente.

Las medidas se realizaron según protocolo de medidas anteriores y los resultados de las medidas se muestran en la **Figura 99**. En esta figura se puede observar un descenso generalizado del potencial con el pH y que a pH7 todos los potenciales están muy cerca de cero voltios.

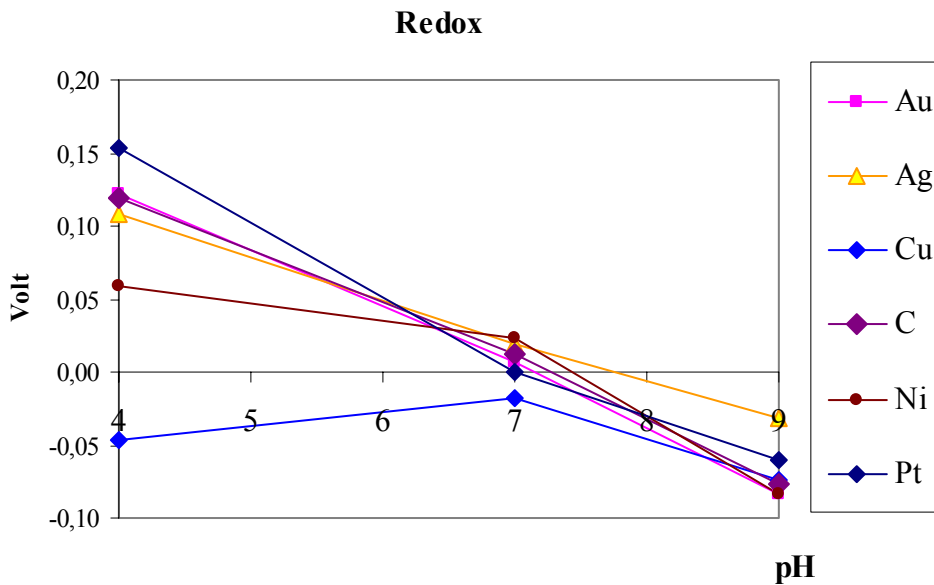


Figura 99. Calibrado de electrodos a Redox

En la **Figura 99** se observa que la mayoría de los electrodos sufren un descenso del potencial con el pH, pero a pH 7 el potencial es muy homogéneo y cercano a cero mientras que a pH4 la variación de potenciales es grande. Para determinar con mayor detalle el comportamiento se vuelve a representar una tabla con los datos de las líneas de ajuste, donde se puede observar que el oro también posee la mayor pendiente y muy buen ajuste lineal, los otros dos metales nobles (Ag y Pt) también poseen buen ajuste lineal, con lo cual significa que son electrodos sensibles al potencial redox.

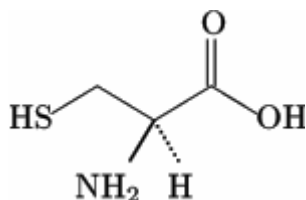
Metal	Pendiente	Corte eje x	Ajuste (R ²)
Au	-0.0411	0.2889	0.9975
Ag	-0.0279	0.2178	0.9981
Pt	-0.0435	0.3205	0.9833

Cu	-0.0044	-0.0171	0.1491
C	-0.0388	0.277	0.996
Ni	-0.0272	0.1808	0.852

Tabla 17. Ajuste resultados calibración redox

3.1.3 Calibrado con Cisteína

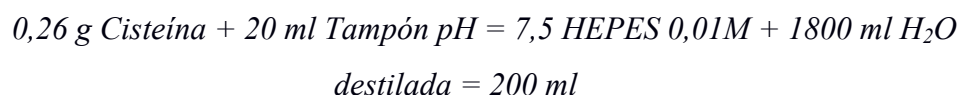
El tercer tipo de caracterización de los electrodos consistió en conocer su respuesta ante un compuesto orgánico presente en los tejidos del músculo del pescado y cuya concentración varía al deteriorarse el tejido del músculo del pescado. El compuesto orgánico elegido fue la cisteína (Cys) que es un aminoácido sulfurado componente ordinario de las proteínas animales y vegetales. Su fórmula química es:



La cisteína contiene un grupo sulfhídrico (-SH) que es hidrofóbico y muy reactivo. La cisteína es un factor de crecimiento esencial para algunos microorganismos que no pueden efectuar su biosíntesis. Durante el proceso de deterioro del pescado se produce una rotura de las proteínas en sus respectivos aminoácidos, que quedan liberados. En el caso de la cisteína, el grupo sulfhídrico puede formar una monocapa auto-ensamblada (SAM) con el oro que puede ocasionar una variación del potencial de los electrodos.

Preparación del patrón final de cisteína:

Se realizó un patrón tamponado a pH=7,5 de una disolución de **1 mM** de cisteína. El método fue el siguiente:



De esta forma la concentración de Cisteína es:

$$\frac{0,26 \text{ g} / 121 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}}{0,2 \text{ L}} = 0,001074 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$$

Esta disolución patrón concentrada se añade, gota a gota, a una disolución base formada por: 135 ml de H₂O destilada + 15 ml de Tampón HEPES 0,01M = 150 mL.

De las primeras medidas con diversos electrodos se obtuvieron los resultados que reflejan la **Figura 100**.

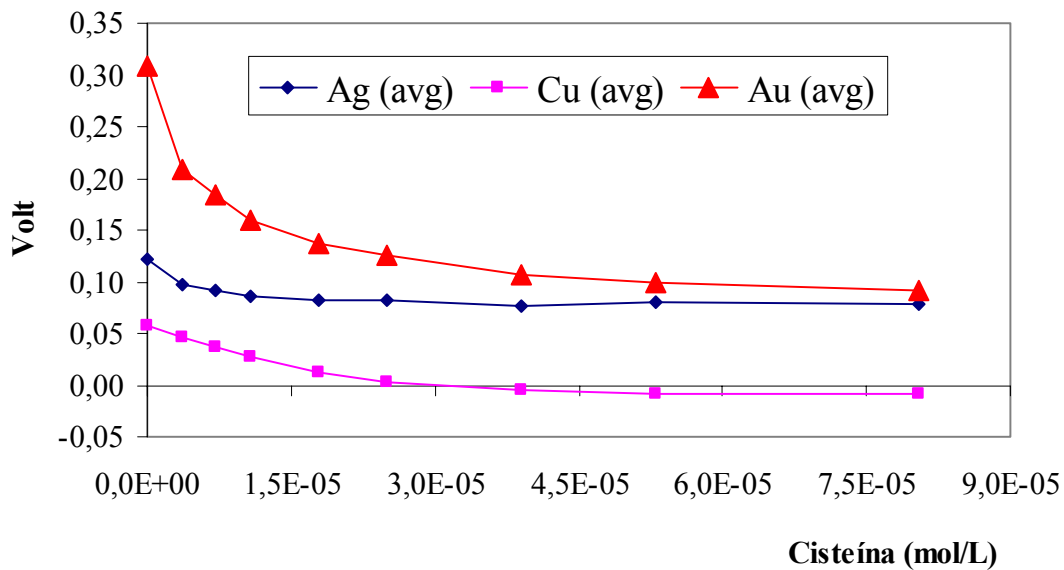


Figura 100. Medidas con disoluciones con diversa concentración de Cisteína

En la figura se comprueba que el electrodo de oro posee una gran sensibilidad a la presencia de cisteína en concentraciones bajas, este hecho puede considerarse de gran interés. Se realizaron medidas con concentraciones inferiores de cisteína (1 M^{-4}) para poder afinar mejor la relación entre concentración de cisteína y potencial del oro, variando la concentración por el método de gota a gota. Los resultados se presentan en la **Figura 101** en escala antilogarítmica (potencial del electrodo de oro y el antilogaritmo de la concentración de cisteína).

En la gráfica se puede observar el comportamiento casi *Nernstiano* del electrodo de oro, con una pendiente de 61 mV/pX y un óptimo ajuste lineal (0,9895).

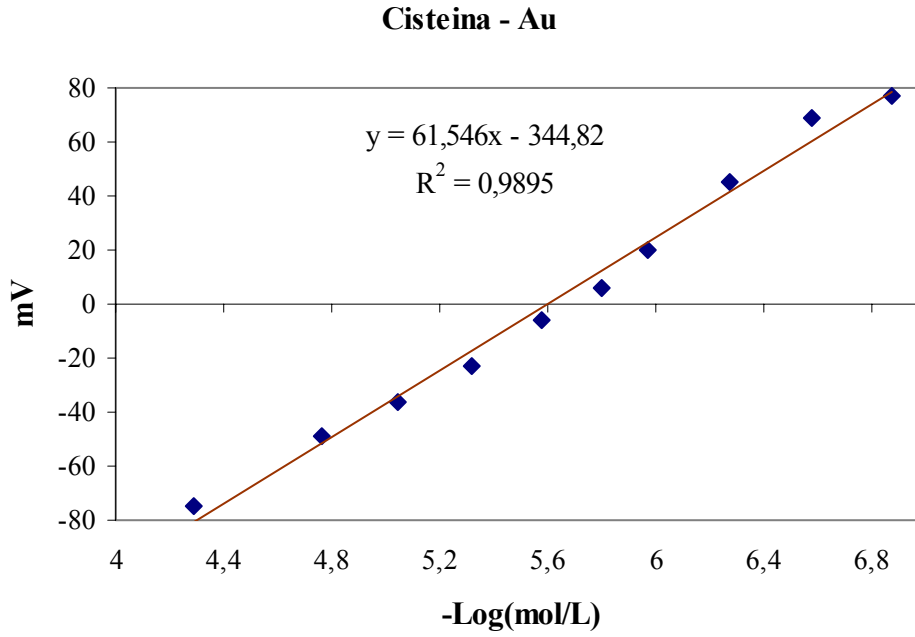


Figura 101 Respuesta electrodo de oro a cisteína

3.1.4 Normalización de la Salinidad

Como en las medidas con el pescado los electrodos están en un entorno típicamente salino, es aconsejable saber como es la respuesta de los electrodos a distintas concentraciones de sal. Para ello se prepara una disolución de salmuera formada por 4,5 g de KCl en 20 mL de H₂O (15Mol/L), la cual se echaba gota a gota sobre una base de 115 mL de agua destilada más 15 ml de Tampón HEPES pH 8,1. Los resultados con electrodos de oro muestran una clara tendencia descendiente, tal como indica la **Figura 102**.

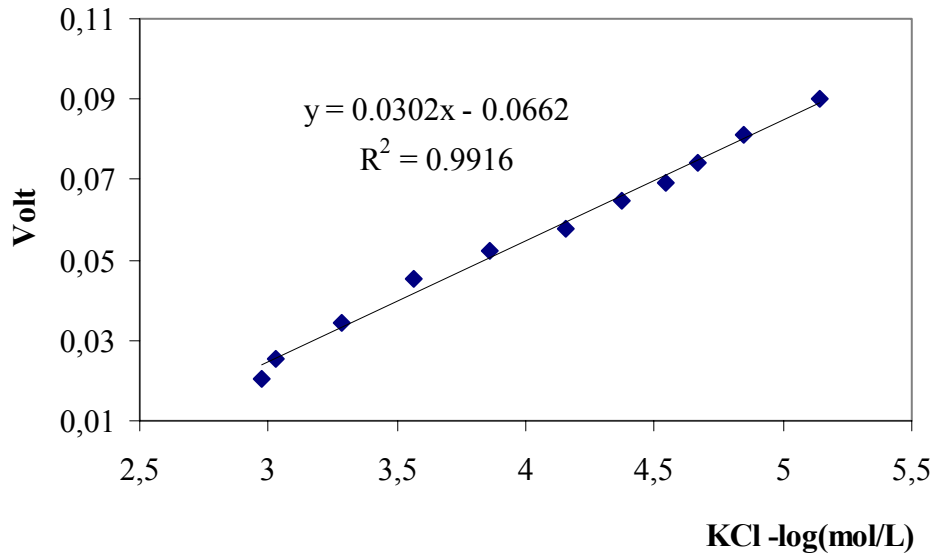


Figura 102. Análisis de la salinidad del electrodo de oro

Finalmente se realizó una variación de la concentración de cisteína sobre la disolución salina, cuyo resultado se representa en la **Figura 103** y donde se comprueba que posee un comportamiento similar a la disolución no salina pero la recta de ajuste posee una pendiente menor.

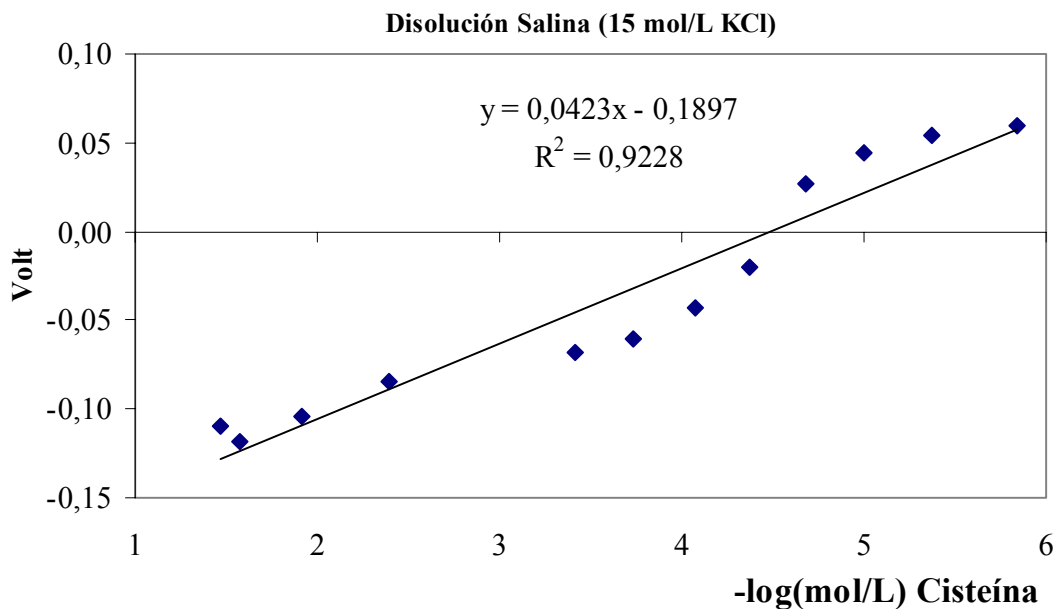


Figura 103. Variación de cisteína en disolución salina

3.1.5 Conclusión de las Experiencias con Disoluciones de Referencia

Variando los parámetros de pH y potencial redox, que determinan importantes condiciones químicas, se ha analizado la variación del potencial de electrodos de distinto material y se ha comprobado la gran sensibilidad de la mayoría de ellos a estos parámetros, destacando los materiales nobles, sobretodo el oro que posee un comportamiento casi *nernstiano*. Es decir, los electrodos de metales nobles poseen una sensibilidad cruzada a diversos parámetros químicos. Este fenómeno les hacen muy útiles para los sistemas de lenguas electrónicas porque poseen buena sensibilidad aunque poca especificidad. Además, el oro posee una gran sensibilidad a compuestos orgánicos con azufre (cisteína), posiblemente por la formación de monocapa auto-ensamblada (SAM) en la superficie del oro. Este fenómeno puede ser muy útil para detectar modificaciones de compuestos orgánicos, como los que surgen en el proceso de descomposición del pescado.

4 ANÁLISIS CON PESCADO

Las experiencias consistieron en medidas sobre el pescado con los electrodos potenciométricos y además, en algunos casos, la realización de análisis bioquímicos y microbiológicos, habituales en el control de la frescura del pescado, para así comparar los resultados de ambos métodos de medida. Para realizar las comparaciones se aplican métodos de regresión lineal, tanto sencillos como múltiples. Para realizar estos cálculos se utiliza el programa de cálculo estadístico *Statgraphics*.

4.1 SENSORES DE MEDIDA

Para realizar las medidas potenciométricas se aplicaron dos tipos de sensores: en primer lugar una placa con varios sensores construidos en tecnología de capa gruesa, y en segundo lugar un sistema formado por diversos electrodos de punción de electrodos metálicos u óxidos. En el primer caso, se aprovechó el sistema de electrodos que ya se había utilizado en otras aplicaciones con líquidos, pero en este caso se incrustaba la placa entre el músculo del pescado. En el segundo caso se desarrollaron electrodos punzantes para obtener un mejor contacto entre el electrodo y el tejido del músculo del pescado.

4.1.1 Multielectrodo en Tecnología de Capa Gruesa (*Thick-Film*)

El sistema multielectrodo está formado por 16 electrodos construidos en tecnología de capa gruesa (*Thick-film*). El sistema consiste de una base aislante formada por una placa de alúmina de dimensiones 2"x1" y de espesor 0,3 mm. Sobre esta placa se depositó una capa conductora que sirve como soporte del electrodo y de transmisión de la señal hacia el exterior. La distribución del plano lo hace disponible para 18 electrodos distribuidos en las dos caras de la placa, 9 electrodos en cada lado, en forma de matriz. De estas 18 bases, 16 se utilizaron para depositar las pastas activas de los electrodos. Las otras dos bases, las centrales de cada cara, permanecieron vacías, reservadas para una posible inclusión de un electrodo de referencia en tecnología de capa gruesa. Para realizar los electrodos activos se utilizaron 8 tipos de pastas comerciales, cada una con un elemento activo distintivo: platino (Pt), oro (Au), plata (Ag), grafito (C), plata-paladio (Pd), plata-cloruro de plata (Ag/AgCl), cobre (Cu) y RuO₂ de resistividad 100Ω/cuadro (Ru100). Por último, se aplicó una capa aislante que tiene la misión de aislante eléctrico de las pistas conductoras y protección de todo el sistema frente a los agentes externos. El esquema de la distribución de los electrodos en las dos caras de la placa se representa en la **Figura 104** y las características de las pastas se reflejan en la **Tabla 18**. El método de construcción de esta placa es similar al utilizado en la construcción de multielectrodo de otras experiencias y cuyos detalles de construcción se presenta en el Anexo I de la presente memoria.

Elemento Activo	Fabricante pasta	Modelo	Tª Quemado (°C)
RuO ₂ (100Ω/sq)	R8931	HERAEUS	700
Cu	C7257	HERAEUS	850
Ag/Pd	C4248	HERAEUS	850
Ag	C1075S	HERAEUS	850
Ag/Pt	C1076S	HERAEUS	850
C	C2000802D2	GEM	175
Au	G40427D1	GEM	850
AgCl	C61003P7	GEM	80
Pasta Protectora	IP020	HEREAUS	80 (2h)
Pasta Conductor	C4081T	HEREAUS	800

Tabla 18. Características de las pastas utilizadas en la construcción del multielectrodo

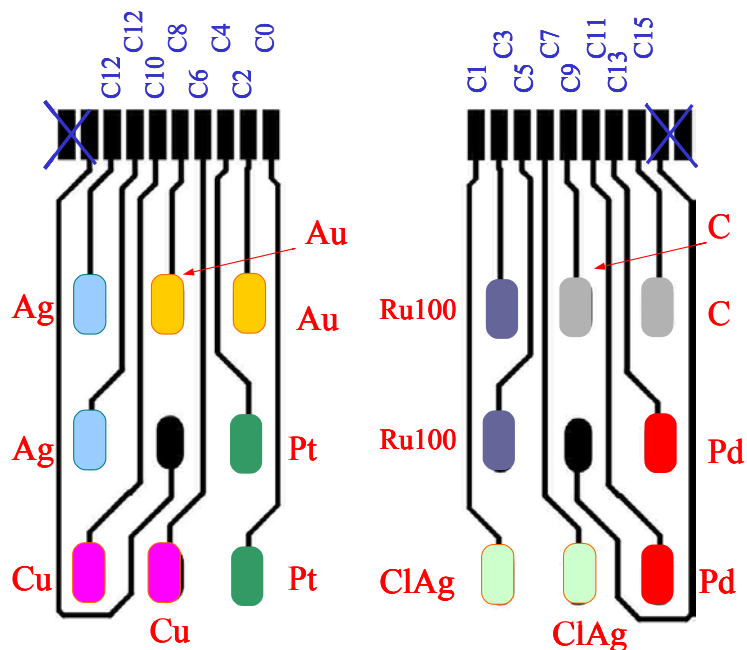


Figura 104. Distribución de sensores en la placa multielectrodo.

Los motivos para elegir estos elementos activos fueron su posible sensibilidad a algún parámetro químico de interés. Así como se indicó en el punto 2.4 de este capítulo, el óxido de rutenio tiene una respuesta proporcional al pH³⁴⁵, y el pH es uno de los parámetros que varían en el proceso de deterioro del pescado. Los metales nobles (Au, Ag, Pt) sirven como indicadores del potencial redox, que también es otro parámetro que queda afectado en el proceso. El paladio no tiene un comportamiento bien definido o conocido, pero es lógico que el electrodo de Ag/Pd tenga un comportamiento similar a los metales nobles por su también contenido de plata. El carbón en forma de grafito suele ser absorbente de la materia orgánica y también al potencial redox. El AgCl puede ser sensible a la presencia de cloruros que también sufren una modificación a lo largo del deterioro del pescado.

A través de un conector de cable plano, las señales procedentes del multielectrodo se llevan al sistema electrónico de acondicionamiento de la señal y de aquí, a la placa de adquisición de datos del ordenador con su correspondiente programa informático para la

³⁴⁵ J. K. Atkinson, A.W.J. Cranny. *An investigation of the performance characteristics and operational lifetime of multi-element thick film sensor arrays used in the determination of water quality parameters.* Sensors and Actuators B, 54, (1999), 215-231.

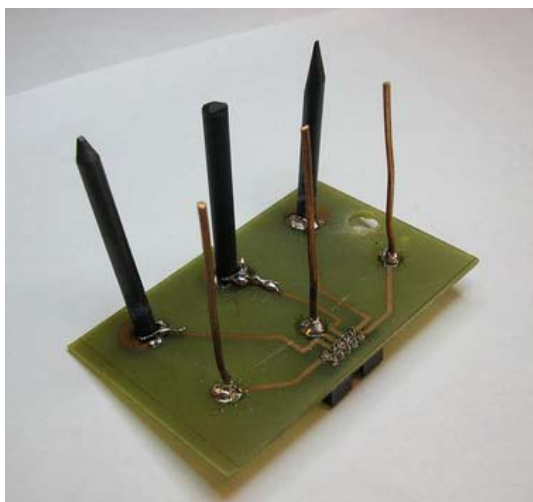
adquisición, monitorización y almacenamiento de datos. Los detalles sobre ambos sistemas, así como el método de medida se detallan en el Anexo II de la presente memoria.

La placa multielectrodo se incorpora entre dos filetes de pescado y se presiona la parte superior con un electrodo de calomelanos, que sirve de electrodo de referencia. El conjunto de electrodos se introduce en un recipiente cerrado que se conserva en un frigorífico a la temperatura de 4°C.

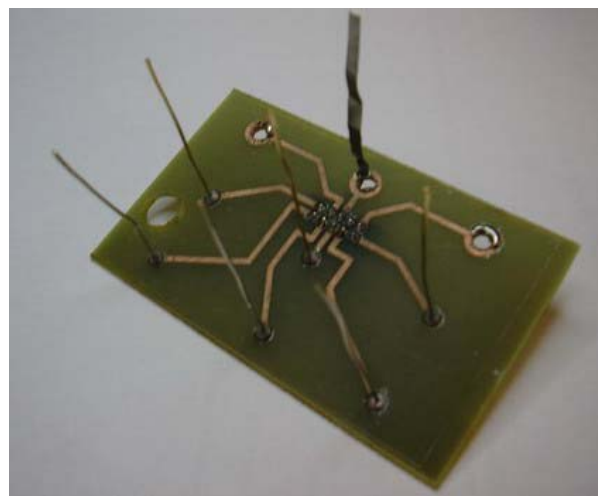
4.1.2 Sistema de Medida con Electrodo Punzantes

El segundo sistema de sensores está formado por un conjunto de electrodos punzantes, en forma de varillas conectadas a una placa de circuito impreso, para así llevar todos los electrodos a un conector de cable plano, y de aquí al sistema de acondicionamiento de la señal.

El diseño de las placas de circuito impreso permite su inserción en la tapa de una caja que contiene las muestras de pescado. Se construyeron varios sistemas multielectrodo para diversos tipos de experiencias. En la **Figura 105** se muestran dos de las placas, una formada por 3 electrodos de oro, 3 electrodos de plata, y uno níquel y otra placa con 3 electrodos de cobre y 3 electrodos de carbón. Para conseguir una mejor punción de los electrodos en el tejido del pescado se realizó un acabado del extremo en forma de punta, sobretodo los de calibre más grueso como el grafito.



Electrodos Cu y C



Electrodos Au, Ag y Ni

Figura 105. Multisensores metálicos

4.1.3 Sistema Triplicado de Adquisición de Datos

Las últimas experiencias se plantearon para poder obtener la mayor cantidad posible de datos, para así poder realizar adecuadamente los análisis estadísticos. Por este motivo, cada experiencia se realizó por triplicado, por medio de tres cajas con sus respectivas muestras de pescado y el conjunto de electrodos de medida y de referencia. El sistema electrónico para la adquisición de señales tuvo que sufrir una serie de modificaciones para acoger a una cantidad considerable de electrodos. La placa de adquisición de datos solo admite 16 canales, por lo que el sistema de acondicionamiento de la señal se le incluyó una placa para el multiplexado de la señal de tres a una, es decir, el sistema va adquiriendo una muestra de cada caja de forma alternativa y rotatoria. Como la toma de muestras se realiza a intervalos de tiempo largos, no hubo problemas en la sincronía y velocidad de multiplexación. En la **Figura 106** se observa el conjunto de medida por triplicado

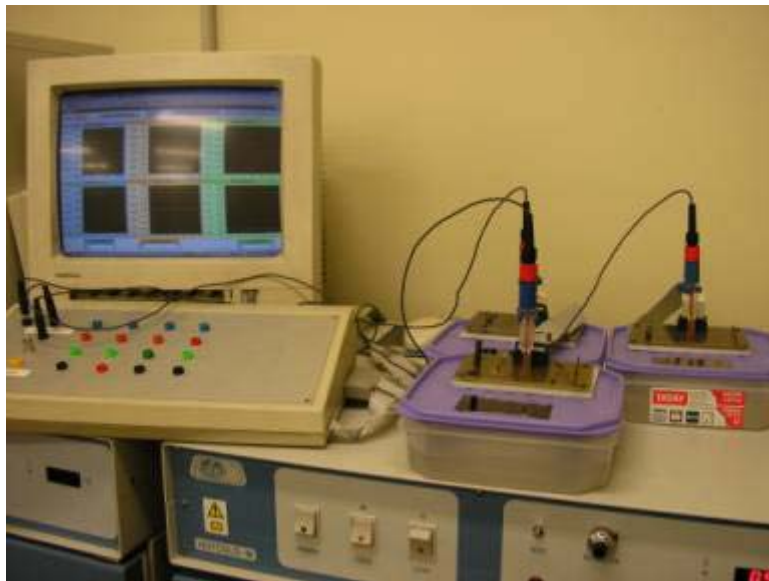


Figura 106. Sistema de medida continua triplicado

Las modificaciones para las medidas en triplicado de las muestras también afectaron al programa de adquisición, monitorización y almacenamiento de datos VEE-Pro. En la **Figura 107** se muestra el aspecto de la pantalla del ordenador en el proceso de medida en triplicado, con ventanas para las tres cajas (A, B y C) con dos multisensores cada una.

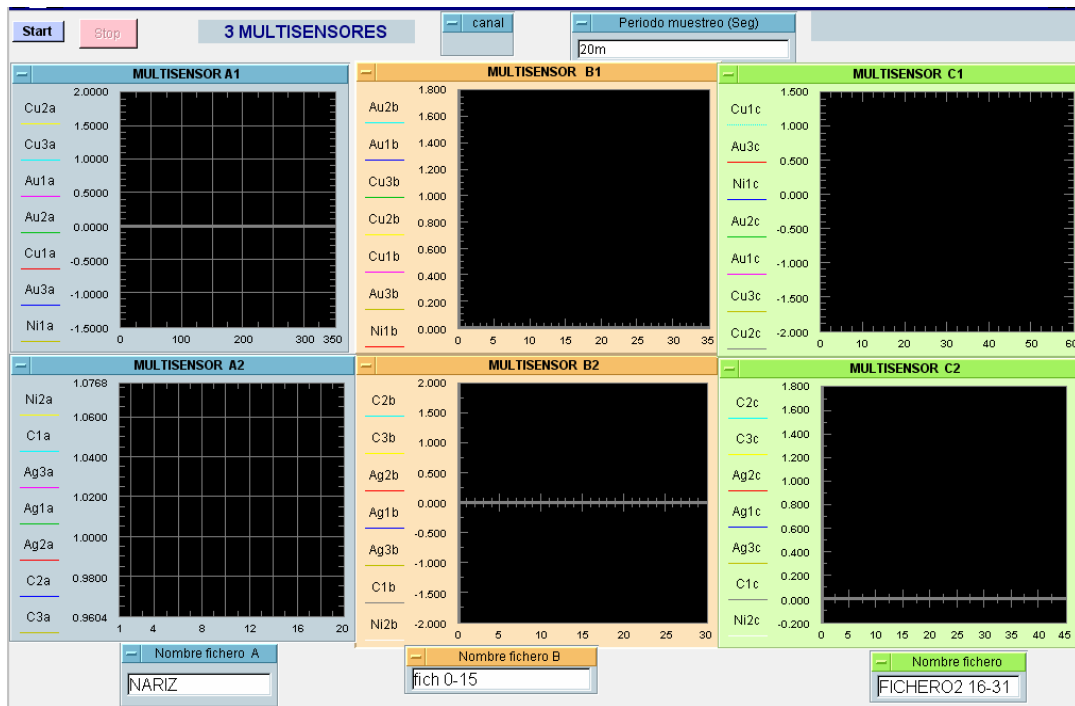


Figura 107. Aspecto de la pantalla con medidas triplicadas

4.1.4 Muestras de Pescado y Protocolo de Medida

Las experiencias con pescado se realizaron con ejemplares frescos de **Dorada** (*Sparus Auratus*) obtenidos en comercio local. La dorada es una especie que se suele criar en piscifactorías (en España la producción fue de 8500 Tm en el año 2000), con alimentación controlada consiguiendo que todos los ejemplares tengan características similares. Cada pescado fue limpiado, eviscerado, desprovisto de espinas y cortado en filetes sobre una caja para poder incorporar los electrodos de medidas.



Figura 108. Dorada (*Sparus Auratus*)

4.1.4.1 Muestras enteras y trituradas

Las experiencias se realizaron con dos tipos de muestras: **entera** y **trituradas**. Las primeras experiencias se realizaron con muestras de filetes enteros de pescado, que corresponde con una medida práctica real, ya que en una posible aplicación industrial o comercial el sistema de electrodos se pincharía sobre muestras enteras.

En las primeras experiencias se sospechaba que la señal generada por los electrodos podía venir afectada por el lugar del músculo del pescado donde se aplica los electrodos ya que las piezas no eran completamente homogéneas. Por este motivo, y para conseguir una punción más cómoda de los electrodos, los filetes de pescado se trituraron obteniendo una pasta homogénea. Las últimas experiencias se realizaron con pescado triturado.

4.1.4.2 Medidas en forma continua y discreta

Las medidas se realizaron con dos métodos de toma de datos: **continuo** y **discreto**. El primer método consiste en aplicar los electrodos a la muestra de pescado, introducirlos en las cajas con los electrodos y cables y todo ello en el interior del frigorífico, poner en marcha el sistema de medida y dejarlo sin tocarlo durante un determinado número de días (de 8 a 15 días), tiempo que coincide con el máximo permitido para el consumo. Durante este tiempo el sistema de medida realiza, de forma automática, un muestreo de forma continua, en periodos de tiempo prefijados por el programa informático de adquisición de datos (normalmente de 5 a 15 minutos).

El segundo método (discreto) consiste en realizar una sesión de medidas cada día laborable, sacar las muestras del frigorífico y realizar medidas con muestreo cada 5 segundos, durante un tiempo que corresponda con el equilibrio electroquímico de los electrodos y que solía ser de 8 a 10 minutos. Es decir de forma similar a las realizadas en experiencias con otros tipos de muestras. Las medidas se realizan en tres ocasiones, por lo que se ha de cumplir un protocolo de medida y de limpieza de electrodos bastante riguroso. Cada vez que se termina una medida se limpian los electrodos con agua oxigenada, posteriormente con agua destilada y terminando con secado de electrodos

4.1.4.3 Medidas Bioquímicas

En algunas experiencias, además de las medidas con electrodos potenciométricos, se realizaron medidas de tipo químico y biológico para así, realizar una comparación de ambos tipos de resultados y determinar si existe alguna relación entre las experiencias. La cuantificación se realiza por ajuste lineal de los datos, tanto de forma simple, con un solo electrodo, como compuesta con los datos varios electrodos. Las experiencias bioquímicas se realizaron en el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la UPV.

5 EXPERIENCIAS CON ELECTRODOS EN TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA

Las primeras experiencias con pescado real se realizaron con filetes enteros (sin triturar) y utilizando el sistema de electrodos construidos con tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*), realizando las medidas en modo continuo. El objetivo inicial de la experiencia es comprobar el comportamiento cualitativo con pescado refrigerado a 4°C de cada tipo de electrodo en función del tiempo de almacenamiento. Para ello, se toman los datos de las medidas de cada uno de los electrodos, clasificados por materiales y representados en gráficas del potencial en función del tiempo.

5.1.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA EXPERIENCIA

La primera experiencia se realizó tomando medidas de forma continua cada 5 minutos durante 15 días. Los resultados fueron muy aceptables; en algunos casos, como en los electrodos de metales nobles, con comportamiento muy claro, y en otros electrodos el resultado no fue tan claro, posiblemente por falta de sensibilidad del material a los efectos del deterioro del pescado o por un defectuoso contacto físico entre la muestra y la superficie del electrodo.

Los resultados gráficos de la experiencia se muestran en **Figura 109** por pares según el tipo de material activo del electrodo. En estas figuras destacan los resultados de los electrodos de metales nobles como platino, oro y plata, que muestran un claro y continuo descenso del potencial eléctrico con el paso del tiempo. Este comportamiento es bastante similar al representado en la **Figura 92**, lo que indica que puede producirse

un descenso del potencial redox con el deterioro del pescado, que es detectado por los metales nobles. En el caso de los electrodos de oro, uno de ellos, Au(a) posee un comportamiento muy similar con el resto de metales nobles, pero el otro electrodo Au(b) tiene un comportamiento menos evidente, probablemente por un **mal contacto** del electrodo con la muestra de pescado. Llama también la atención las sucesivas etapas con la señal en descenso y en plano.

El electrodo de cobre también posee un comportamiento similar al de los metales nobles, pero está menos claro su causa porque en los primeros días es más errático, posiblemente sea una deriva.

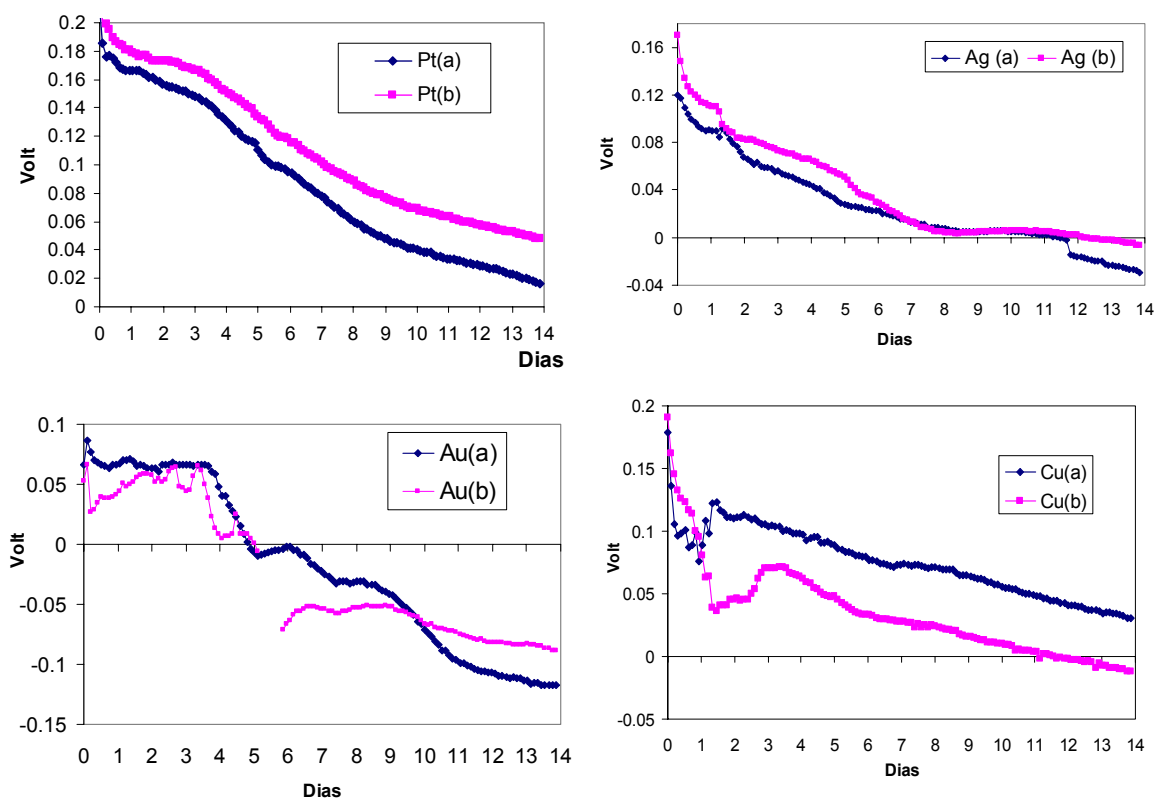


Figura 109. Respuesta de los electrodos en tecnología de capa gruesa

Los resultados de los restantes electrodos (Pd, C, ClAg y Ru) ofrecen menos claridad, ya sea porque no sean sensibles a los cambios de la muestra o porque no existió un buen contacto físico entre electrodo y muestra.

5.2 MEDIDAS POTENCIMÉTRICAS, VOLÁTILES Y EXPERIENCIAS QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS.

Tras los resultados de la primera experiencia, se realizó una segunda con el mismo multielectrodo y en circunstancias similares aunque con un número menor de días (8). La experiencia estuvo complementada con medidas de los volátiles que emanan del pescado utilizando un sistema de nariz electrónica y por análisis de tipo químico y biológico. Con esta combinación de medidas se busca una relación entre los resultados de los distintos sistemas de medida para así establecer si las variaciones del potencial de algunos de los sensores están relacionadas con algunas de las modificaciones que sufre el pescado a lo largo del tiempo de almacenamiento.

Los resultados de las medidas potenciométricas fueron similares a la primera experiencia, con descensos del potencial en la mayoría de los electrodos, de forma más clara y progresiva en los metales nobles.

5.2.1 Medidas de Volátiles

Uno de los mejores indicadores de la frescura del pescado es el fuerte olor que emana cuando se encuentra deteriorado. Por este motivo, se planteó en esta segunda experiencia el intento de realizar medidas de volátiles durante el tiempo de almacenamiento del pescado. Para ello, se puso en marcha un sistema de medida similar al utilizado para el análisis de vinos (capítulo 6). Es decir, se dispuso de varios electrodos potenciométricos (vidrio, grafito y platino) más un electrodo de referencia de calomelanos. Todos estos electrodos se introdujeron en una funda de tela de poliéster con distintos departamentos para introducir un electrodo en cada uno de ellos, de forma que estuvieran bien ceñidos a la tela y evitando el contacto eléctrico entre ellos. El sistema se humedecía con agua destilada para crear una unidad electroquímica. Las medidas se realizaron cada día, a partir del segundo, introduciendo el conjunto de medida en el interior del recipiente y dejando el tiempo suficiente hasta que la medida estaba estabilizada (20 a 30 minutos). En la **Figura 110** se muestra el resultado de estas medidas de los tres electrodos, donde se puede observar un aumento de los valores de potencial durante los primeros días y un descenso a lo largo de los últimos días.

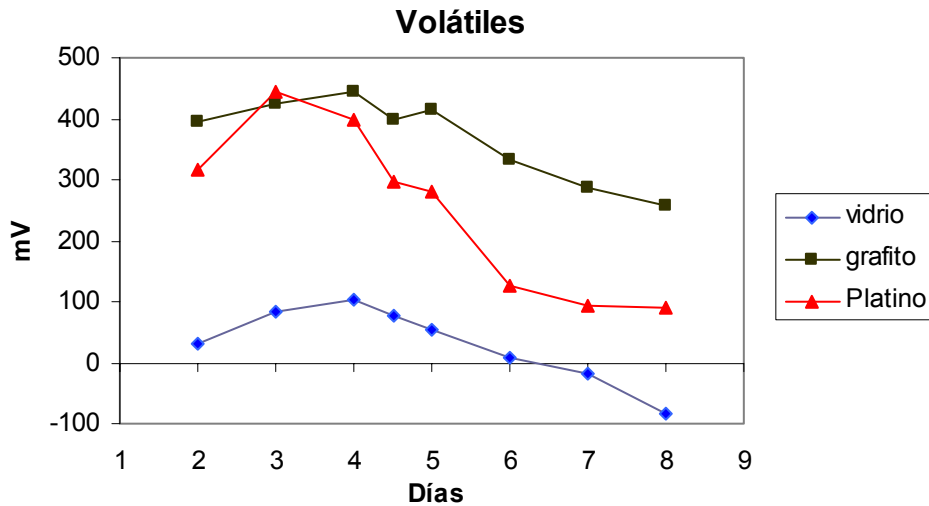


Figura 110. Resultados de la medida de volátiles

5.2.2 Medidas Biológicas

Los análisis químicos y biológicos que se realizaron fueron los siguientes:

- Variación del pH.
- Evolución del contenido en Nitrógeno Básico Volátil Total (NBVT).
- Formación de aminas biogénicas.

5.2.2.1 Variación del pH

En la **Figura 111-a** se presenta la evolución del pH. En ella se comprueba la escasa variación durante los primeros días y el salto a partir del séptimo día. En la dorada, valores bajos (5.8-5.9) de pH al comienzo del periodo de almacenamiento reflejan el buen estado nutricional del pescado. El pH bajo de los primeros días es debido a la transformación del glucógeno presente en el músculo en ácido láctico. La subida del pH a partir del día 7 se debe a la producción de metabolitos bacterianos alcalinos y coincide con el aumento del NBVT³⁴⁶.

³⁴⁶ V.R. Kyrana, V.P. Lougovois, D.S. Valsamis. *Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (Sparus aurata) stored in ice*. International Journal of Food Science and Technology, 32 (1997) 339-347.

5.2.2.2 Contenido Total de Nitrógeno Básico Volátil (NBVT)

La evolución del contenido del total de Nitrógeno Básico Volátil (NBVT), (mg de Nitrógeno por 100 g de dorada) a 4°C se determinó mediante destilación por arrastre de vapor³⁴⁷ y sus resultados se representan en la **Figura 111-b**, en la que cada uno de los puntos es la media de tres determinaciones con su correspondiente desviación estándar. Partiendo de un valor en la muestra fresca (día 0) de 8,28 mg/100 g de pescado, se observa el aumento progresivo en todas las muestras en función del tiempo, no existiendo diferencias significativas hasta el día 8. A partir de este momento se observa un incremento importante, alcanzando el día 12 un valor de 29,94 mg/100 g. Este resultado es similar al obtenido por otros autores en otras especies³⁴⁸.

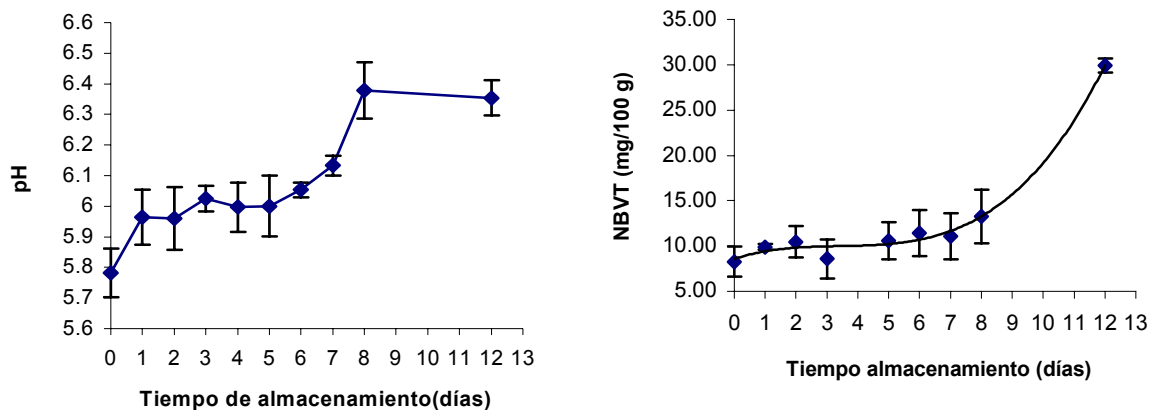


Figura 111. Evolución del pH y NBVT

En las medidas de pH y NBVT relacionadas con la calidad de la dorada en condiciones de almacenamiento óptimo se distinguen claramente dos etapas, la primera fase, “de buena calidad”, se extendía hasta el 7º día de depósito en hielo; mientras que la segunda fase, “de calidad aceptable”, podía llegar hasta el día 12. Como la calidad de la dorada, a partir de los parámetros pH y NBVT y recuentos microbiológicos, es buena

³⁴⁷ G. Bugeño. *Salado-ahumado de salmón (Salmo Salar) por impregnación a vacío. Influencia del envasado en la calidad.* (1999). Tesis doctoral. Universidad politécnica de Valencia.

³⁴⁸ D. Taliadourou, V. Papadopoulou, E. Domvridou, I. N Savvaidis, M. G. Kontominas. *Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (Dicentrarchus labrax) stored in ice.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 83 (2003) 1373 – 1379.

sólo hasta el día 8, los siguientes análisis (aminas biógenas y volátiles) se centraron únicamente en los primeros 8 días.

5.2.2.3 Aminas Biogénicas

La identificación y cuantificación de aminas biogénicas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución, La **Figura 112** representa la evolución de las aminas biogénicas durante los 8 días de almacenamiento. La **tiramina** (0.89 mg/kg) y la **histamina** (0.71 mg/kg) poseen las concentraciones iniciales más altas. La **cadaverina** y la **triptamina** presentaron valores algo más bajos, de 0.59 mg/kg y 0.46 mg/kg respectivamente. El contenido en aminas biogénicas en pescado fresco varía mucho dependiendo de la especie, aunque en general suele ser muy bajo si las condiciones de refrigeración han sido adecuadas (menor de 4°C)³⁴⁹.

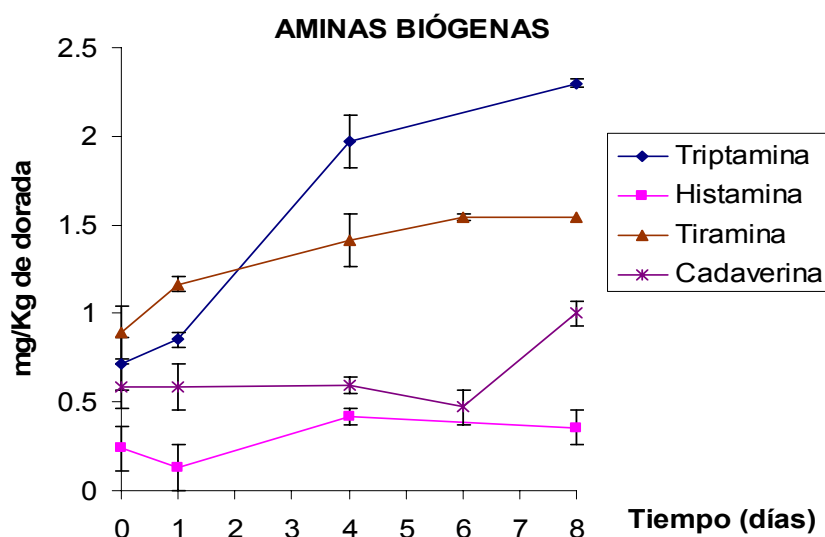


Figura 112. Evolución de aminas biógenas durante 8 días de almacenamiento.

En general, un elevado contenido en aminoácidos y una elevada actividad bacteriana desembocan en un rápido aumento de aminas biógenas³⁵⁰.

³⁴⁹ I. Escriche, J.A. Serra, *Toxicología en procesos industriales alimentarios*. (2001). Ed. Servicios de publicaciones de la Universidad Politécnica de Valencia. Ref. 2001.856.2001.

³⁵⁰ [http:// www.cfsan.fda.gov/](http://www.cfsan.fda.gov/)

5.2.3 Comparación de los Resultados de la Lengua Electrónica y Análisis Químicos

Una vez mostrados los resultados de los electrodos potenciométricos y de los análisis químicos y biológicos, la siguiente etapa consiste en la realización de un análisis comparativo entre ambos tipos de medidas y comprobar si existe alguna correlación entre los distintos parámetros medidos y cual es su cuantificación.

La comparación se realiza por medio de análisis de regresión entre ambos tipos de datos. Los análisis estadísticos se han realizado con el programa STATGRAPHICS Plus 4.1.

5.2.3.1 Relación pH – Electrodo de Ru

Las medidas del potencial promedio los electrodos de rutenio (Ru1 y Ru2) para cada uno de los días de medida se muestran en la **Figura 113**. En esta figura, también se representa la variación del promedio del pH.

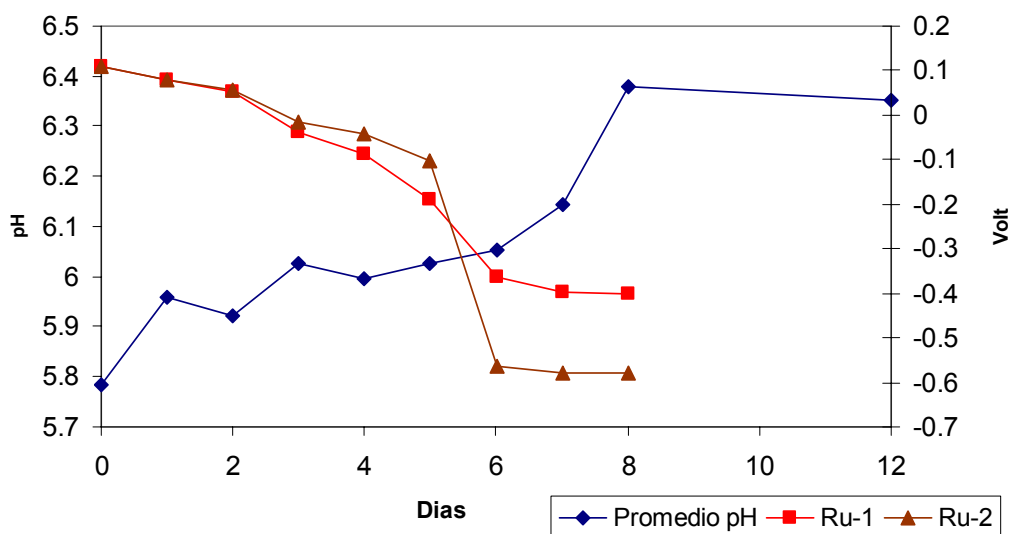


Figura 113. Señal del electrodo de RuO₂ / evolución del pH

Se puede comprobar visualmente que existe una cierta relación entre ambos tipos de medida porque el pH sufre un aumento al cabo del séptimo día y el potencial de los electrodos sufren un descenso acusado del potencial aunque en fechas algo más tempranas (sexto día). Para cuantificar la relación entre ambos tipos de medidas se

realiza una **regresión lineal**, tanto simple como múltiple que se representa en la tabla **Tabla 19**.

Ecuación de ajuste	R ²
Ru1 = 6,23335 - 1,05612*pH	64,0783%.
Ru2 = 8,68779 - 1,47055*pH	58,4818%

Tabla 19. Relación entre medidas de electrodos de RuO₂ y medidas de pH

En las ecuaciones de ajuste se comprueba la relación inversa del pH con respecto al Ru por el signo negativo del coeficiente. El ajuste de las ecuaciones (R²) no es muy bueno debido fundamentalmente al desfase de tiempo de los cambios de valor. Es de señalar que la variación del pH aunque clara no es muy grande por lo que es difícil captarla con sensores potenciométricos no específicos. Por otro lado, justamente en esta experiencia, se produjo durante el experimento un fuerte descenso del potencial de algunos de los electrodos, entre ellos los de Ru, cuya causa no está clara pero que podría ser una deriva.

5.2.3.2 Relación Aminas Biogénicas – Electrodo de Ag

Con respecto a las aminas biogénicas, parece observarse igualmente, una relación entre su incremento y el descenso de la señal de los dos electrodos de plata (Ag1 y Ag2)

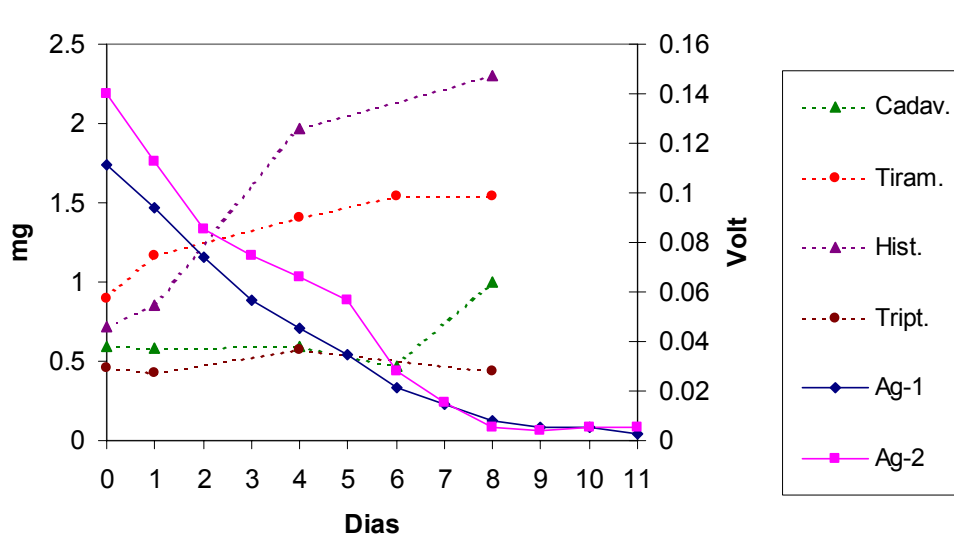


Figura 114. Señal electrodo de Ag/ Concentración de aminas.

Para cuantificar la relación entre ambos tipos de medidas se realiza un ajuste lineal, se representa en la siguiente tabla. En primer lugar se presenta el ajuste simple entre cada una de las cuatro aminos analizadas y cada uno de los dos electrodos de plata (Ag1 y Ag2). Las concentraciones de las aminos están expresadas en forma de logaritmo de la concentración, de esta forma se equiparan a la ecuación de Nernst.

Ecuación de ajuste	R ² (%)
Ag1 = 0,00744793 - 0,335381*logCadav	66,2136
Ag1 = 0,0846568 - 0,180173*logHistam .	95,0562
Ag1 = 0,101939 - 0,418639*logTiram	88,2408
Ag1 = 0,0208015 - 0,134655*logTriptam.	2,52185
Ag2 = 0,0049542 - 0,444891*logCadav.	74,4747
Ag2 = 0,105089 - 0,218278*logHistam.	89,1769
Ag2 = 0,127088 - 0,519155*logTiram	86,7394
Ag2 = 0,064916 - 0,0493057*logTriptam	0,216124

Tabla 20. Correlación lineal simple entre medidas de electrodos de Ag y medidas de aminos biogénicas

En la tabla Tabla 20 se comprueba el buen ajuste de las aminos histamina y tiramina con los potenciales de los electrodos de plata (Ag(a) y Ag(b)), el regular ajuste con la cadaverina y el mal ajuste con la tiramina. Este último caso es debido a la poca variabilidad de los valores de esta amina. La Tabla 21 representa las características de ajuste con dos aminos, donde se comprueba que se alcanza un ajuste desde el 65% al 99%.

Ecuación de ajuste	R ² (%)
Ag1 = 0,151969 - 0,196429*logHistam + 0,20055*logTriptam	99,6292
Ag2 = 0,230974 - 0,248679*logHistam + 0,375063*logTriptam	99,8592
Ag1 = 0,112676 - 0,422119*logTiram + 0,0319217*logTriptam	65,1292
Ag2 = 0,181768 - 0,536875*logTiram + 0,162556*logTriptam	66,9625
Ag1 = 0,0886695 - 0,145991*logHistam - 0,0876967*logTiram	86,521
Ag2 = 0,114657 - 0,136767*logHistam - 0,209122*logTiram	72,4466
Ag1 = 0,060237 - 0,119616*logCadav - 0,144189*logHistam	99,0618
Ag2 = 0,06118 - 0,215079*logCadav - 0,153576*logHistam	96,2422

Tabla 21. Correlación lineal compuesta entre medidas de electrodos de Ag y medidas de dos aminos biogénicas

Los ajustes con tres variables alcanzan precisiones elevadas, destacando la que excluye la triptamina que alcanza una precisión del casi 100%. (Tabla 22). No es posible realizar un ajuste con las cuatro variables (4 aminas) porque no hay suficientes datos para realizar el análisis.

Ecuación de ajuste
Ag1 = 0,0639174 - 0,117982*logCadav - 0,116172*logHistam -0,073140*logTiram
Ag2 = 0,070393 - 0,210988*logCadav - 0,0834425*logHistam -0,183091*logTiram

Tabla 22. Correlación lineal compuesta entre medidas de electrodos de Ag y medidas de tres aminas biogénicas

5.2.3.3 Relación NBVT – Electrodo de Medidas Volátiles

Por último se relaciona las medidas de Nitrógeno Básico Total Volátil con las medidas de los electrodos potenciométricos (vidrio, platino y grafito), que formaban el sistema de lengua electrónica. En la Tabla 23 se muestra la correlación entre cada uno de los electrodos con el NBVT, y donde en esta ocasión el índice de correlación es bajo, inferior al 50%, debido en parte a dificultades de instalación del sistema de medida que debe ser mejorado.

Ecuación de ajuste	R2 (%)
Vidrio = -27,082*NBVT + 314,93	49,30
Platino = -29,725*NBVT + 680,04	47,98
Grafito = -56,259*NBVT + 843,26	42,01

Tabla 23. Correlación lineal simple entre medidas de electrodos de volátiles y NBVT

6 EXPERIENCIAS CON ELECTRODOS PUNZANTES

En las dos primeras experiencias anteriores quedó suficientemente claro la relación entre el potencial de los electrodos y el estado de conservación del pescado, pero persistían algunos problemas de procedimiento, fundamentalmente debidos al contacto físico entre los electrodos y el músculo del pescado, que en ocasiones no era perfecto. Por este motivo se realizó una segunda tanda de experiencias, pero en lugar de usar el multielectrodo en tecnología de capa gruesa se utilizaron electrodos punzantes de

metales y elementos simples similares a los del multielectrodo, pero de la forma más pura posible (Apartado 4.1.2). Se realizaron varias experiencias.

6.1 MEDIDAS EN REFRIGERACIÓN CON PESCADO ENTERO

En la primera experiencia de este tipo se utilizaron electrodos de oro, plata, cobre, carbono, níquel y aluminio, en los cuatro primeros materiales por duplicado. Los electrodos se insertaron sobre el músculo del filete entero de pescado. Las muestras se conservaron en refrigeración a una temperatura de 5° C. Las medidas se realizaron en modo continuo a lo largo de 15 días, siguiendo el mismo protocolo que las experiencias anteriores.

Resultados. En la (Figura 115) se muestran las gráficas de variación de potencial de cada uno de los electrodos con el paso del tiempo. En ellas se puede destacar que los potenciales de los electrodos de oro y plata tienen un comportamiento bastante similar entre sí durante los 4 o 5 primeros días no tienen muestran cambios significativos, si acaso un leve ascenso del potencial, pero a partir de entonces se produce un descenso significativo. Los valores absolutos son diferentes a los electrodos en tecnología en capa gruesa porque la tensión siempre es negativa. El salto máximo de tensión es: Au(a)=0,297V, Au(b)=0,264V, Ag(a)= 0,217V, Ag(b)=0,199V.

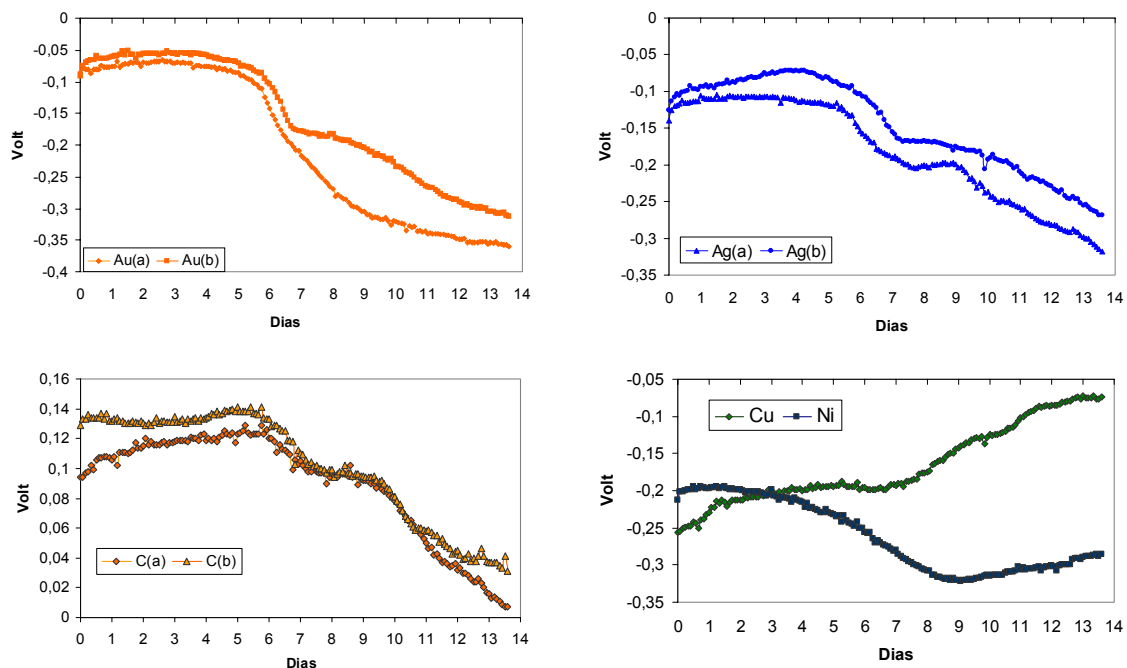


Figura 115. Respuesta de las medidas con electrodos punzantes

Los electrodos de grafito (C(a) y C(b)) también respondieron con una señal descendente pero con valores absolutos positivos. El descenso se realiza en dos etapas una a partir del día 5 y otro a partir del día 9. Los márgenes de variación de la tensión son: C(a)=0,129V, C(b)=0,141V.

El electrodo de cobre respondió con una señal ascendente a lo largo del tiempo, el níquel primero descendente y luego ligeramente ascendente y el aluminio no parecía que sea sensible en esta experiencia. Los márgenes de variación Cu = 0,184V, Ni = 0,128V

6.2 MEDIDAS A TEMPERATURA AMBIENTE (25°C) CON PESCADO ENTERO

Como las medidas en modo continuo se realizan manteniendo el electrodo durante un contacto prolongado y continuo con la muestra de pescado, es probable que la variación de potencial de los electrodos pueda venir afectada por a una deriva del electrodo. Para disminuir esta posible deriva se planteó un experimento donde el electrodo estuviera en contacto continuo pero durante menos tiempo. Para ello se realizó la experiencia a temperatura elevada (25°C) para así acelerar los procesos de descomposición bioquímica del pescado.

Los resultados de esta experiencia con los electrodos de plata y oro se muestran en la **Figura 116**. En ella se ha trazado el valor medio de tres electrodos y se comprueba con gran claridad que los electrodos de oro poseen un descenso de potencial relativamente constante mientras que los electrodos de plata mantienen un potencial constante durante las primeras horas, pero a partir de las 25 horas la caída de potencial es clara y tajante. Esta variación de potencial coincidió y fue proporcional con la aparición del característico olor a pescado deteriorado. Las diferencias del descenso de potencial con respecto a la temperatura coinciden con las gráficas de variación del potencial redox que se mostraron en la **Figura 92**.

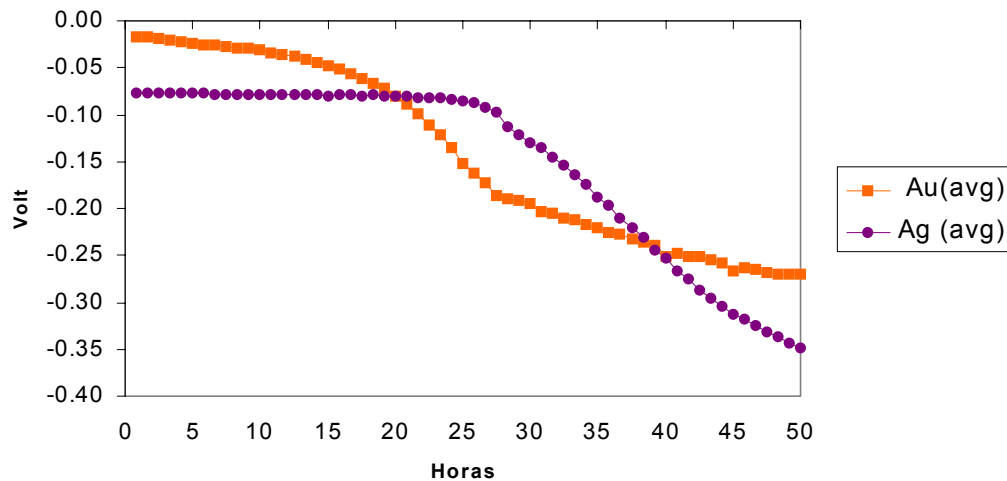


Figura 116. Resultados a temperatura de 25°C

6.3 MEDIDAS CON PESADO ENTERO Y TRITURADO

En los experimentos con pescado entero se busca una representación real ante un posible sistema portátil de control de calidad de pescado, pero en las experiencias previas surgieron algunos inconvenientes por la falta de un buen contacto entre los electrodos y el músculo del pescado; y además surgía la duda de si el potencial puede variar según el punto de punción del electrodo en el pescado. Para solventar estas dudas, se realizó una tercera experiencia con dos tipos de presentación del pescado: **entero** y **triturado**. Para ello, se utilizaron dos recipientes, uno con filetes de pescado entero y otro triturado, para realizar experiencia de comparación en el mismo tiempo y utilizado el mismo tipo y número de electrodos. Los electrodos utilizados fueron de Au, Ag, Ni y C. Las medidas se realizaron durante 14 días.

Resultados

En los electrodos de oro y de plata los resultados de ambas formas de presentación fueron similares durante los primeros días, pero en los últimos días se observa un descenso más pronunciado del potencial de las muestras de pescado triturado, debido probablemente a que en el proceso de trituración se produce rotura de las células que pueden favorecer los procesos de autólisis.

En el caso del níquel se repite la peculiar variación de la señal potenciométrica, durante el primer día casi plano, en los días siguientes se produce un descenso y en los

últimos días un ligero ascenso. Los electrodos de carbón poseen una respuesta similar a la del oro.

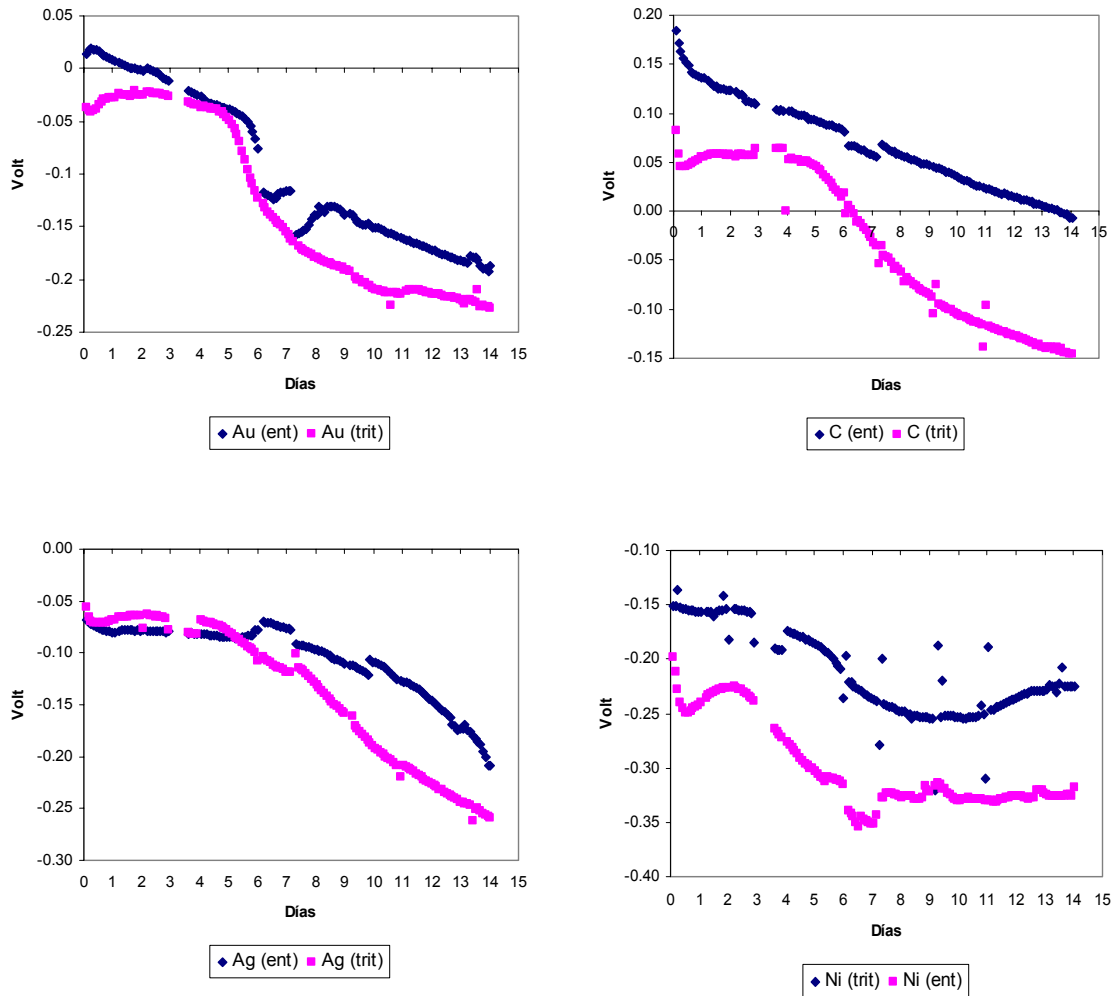


Figura 117. Diferencias de respuesta entre pescado entero y triturado

7 EXPERIENCIAS CON MEDIDAS EN MODO DISCRETO

Aunque en las experiencias anteriores se ha comprobado que la variación del potencial de los electrodos con el paso del tiempo es clara y repetitiva, sobretodo de oro y plata, queda la posibilidad de que ese comportamiento sea debido a una deriva del potencial de los electrodos ya que la exposición de la superficie del electrodo al tejido del pescado es continuada y durante varios días.

Para eliminar esta posibilidad se realizaron las siguientes experiencias con medidas en modo **discreto**, es decir medidas que se realizaban una tanda cada día, sacando los recipientes del refrigerador para realizar las medidas durante el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio electroquímico.

7.1 EXPERIENCIA CON PESCADO ENTERO

La primera experiencia con medidas en modo continuo se realizó sobre muestras de pescado entero. Los electrodos utilizados fueron un total de 12 de los siguientes materiales Au (3), Ag (2), Ni (1), Cu (3) y C (3). Las medidas se realizaron en 10 días durante un periodo de 15 días, concretamente los días: 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 12 y 15. Cada día se realizaba tres medidas, aunque en algunas ocasiones fueron dos.

De cada medida y de cada uno de los electrodos se obtiene dato, el número total de medidas fueron 23. Del total de medidas se obtiene una matriz de datos, que en este caso tiene 12 columnas y 23 filas. Con esta matriz se pretende una discriminación de las medidas según el día de la medida.

7.1.1 ANÁLISIS MULTIVARIANTE.

Para lograr la clasificación de los datos de la matriz según el día de la medida se aplican técnicas de análisis multivariante para el reconocimiento de patrones. La técnica empleada en esta experiencia son las redes neuronales artificiales de tipo *Perceptron*. Con ellas se pretende realizar los cálculos necesarios para lograr un sistema que clasifique los datos según un grupo de días de forma óptima.

7.1.1.1 Configuración de la Red Neuronal de tipo *Perceptron*

La red neuronal más utilizada es del tipo *Perceptron* (MLP) “feed-forward” formada por diversas neuronas distribuidas en capas. En nuestro caso, se utiliza una capa de salida con 3 neuronas, para cada una de las tres posibilidades de evaluación del pescado, 6 entradas para cada uno de los electrodos y una capa oculta formada en principio por un número indeterminado de neuronas (n). Las entradas son las combinaciones de los diferentes electrodos, mientras que la salida ideal es una codificación “uno a tres” en la que la clasificación correcta se denota por un uno y las dos clases inactivas por un cero. Cada neurona posee una función de transferencia de

tipo logsig. La materialización de las redes neuronales se realiza por medio del sistema informático *MATLAB* y su programa anexo *Neuronal Network Toolbox*.

Para entrenar y validar la red neuronal se utiliza el método “leave-one-out”, utilizando como entradas la matriz de las 23 medidas por 12 electrodos. Este método permite que las mismas medidas sirvan tanto para el entrenamiento como para la evaluación, y consiste en tomar todas las medidas disponibles menos un vector (12 electrodos) para el realizar el entrenamiento y el vector restante para la evaluación. Esta tarea se repite cambiando el vector de medidas que se dejó para la evaluación, de esta forma se realizan tantas evaluaciones como medidas hay disponibles y se comprueba si cada evaluación coincide con la salida teórica.

La red neuronal ideal en nuestro caso, es aquella que tenga tantas salidas como días de medidas, es decir 10. Pero como el número de medidas por día es muy reducido (2 ó 3), es evidente que el entrenamiento y validación de este número tan elevado de salidas tendría muy poca fiabilidad. Por este motivo, se procede a agrupar las medidas en tres grupo de días. El primero, denominado *A* corresponde con las medidas de los días 1, 2, 3, 4 y 5; el segundo (*B*) de las medidas de los días 7 y 8 y el tercer grupo (*C*) de las medidas de los días 10, 12 y 15. El objetivo es clasificar cada una de las medidas como *A*, *B* o *C*. Cada grupo corresponde, aproximadamente, con tres estados de conservación del pescado: apto (*A*), dudoso (*B*) y no apto (*C*). Para alcanzar esta clasificación se utiliza una red neuronal con tres neuronas en la capa de salida como muestra la **Figura 118**.

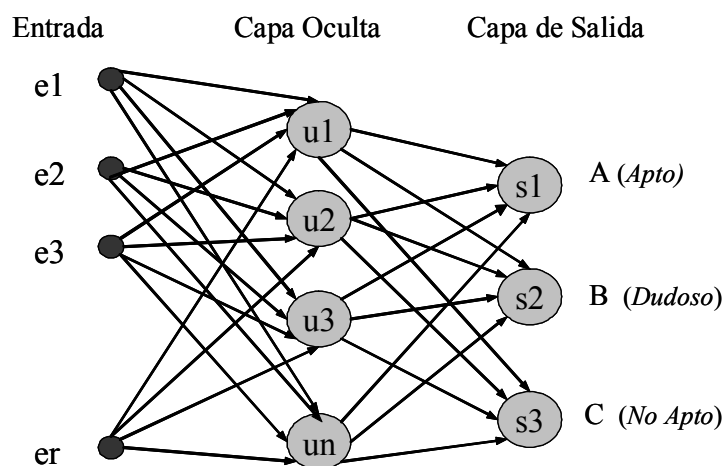


Figura 118. Red Neuronal Artificial

La salida ideal es una codificación “uno de tres” en la que la clasificación correcta se indica con un 1 las dos clases inactivas por un 0. Así, por ejemplo, una señal ideal $A=1, B=0, C=0$ indicaría que la clasificación correcta para esta medida sería pescado en los 4 primeros días (apto). Idealmente no puede haber un resultado distinto de un 1 y dos 0, pero en la realidad de la red neuronal si que surgen casos anómalos. Por este motivo la tabla indica los valores correctos de cada uno de los grupos y el total G, así como la tasa de éxito total.

Con las medidas en modo discreto se realiza una clasificación según el número de días de almacenamiento. Para ello se utiliza una red neuronal con capa de salida de función de transferencia de tipo *logsig* que genera un resultado analógico entre cero y uno, pero no lineal. Se realizó una aproximación de los resultados de forma que valores superiores a 0,5 se asignen el valor 1 y los inferiores a 0. La función de transferencia de las neuronas de la capa oculta es en principio también del tipo *logsig*.

7.1.1.2 Resultados de la Red Neuronal de tipo *Perceptron*

En un primer análisis se tomaron los resultados de todos los electrodos (12) que corresponden con los materiales de oro, plata, níquel, cobre y carbono. La salida ideal es una codificación “uno de tres” en la que la clasificación correcta se indica con un no las dos clases inactivas por un cero. El análisis neuronal se realizó indicando el número de éxito en dada una de las clases y en el total. En la Tabla 24 se indica los resultados variando el número de neuronas de la capa oculta, donde se puede comprobar que se obtiene los mejores resultados con 15 o 20 neuronas y alcanzando un éxito total del 91,3%.

<i>Neuronas Ocultas</i>	<i>A/12</i>	<i>B/5</i>	<i>C/6</i>	<i>Total/23</i>	<i>% OK</i>
3	11	3	6	19/23	82,60%
6	12	5	5	20/23	86,95%
9	12	5	5	20/23	86,95%
12	11	5	6	20/23	86,95%
15	11	5	5	21/23	91,30%
20	12	5	6	21/23	91,30%
25	11	5	4	20/23	86,95%

Tabla 24. Resultados de la clasificación con todos los electrodos (13)

Otro parámetro que puede variarse en la red neuronal es el número de entradas. Se realizaron distintas combinaciones de entradas eliminando uno o varios materiales, comprobando que los mejores resultados se obtienen con solos los datos de los electrodos de oro y plata, en total 5 electrodos. En la Tabla 25 se representa los resultados con diversos números de neuronas con sólo los resultados de estos dos metales, se comprueba que el mejor resultado se obtiene con 6 neuronas ocultas, logrando un éxito del 100%. Es decir, una vez más, se comprueba que los electrodos de oro y plata por si solos registran los mejores resultados.

<i>Neuronas Ocultas</i>	<i>A/12</i>	<i>B/5</i>	<i>C/6</i>	<i>Total/23</i>	<i>% OK</i>
3	11	4	6	19	82,60%
4	12	4	6	20	86,95%
5	11	5	6	21	91,30%
6	12	5	6	23	100%
8	12	5	6	22	95,65%
9	11	5	5	20	86,95%
12	11	5	6	22	95,65%
15	12	4	6	22	95,65%
18	12	5	5	19	82,60%

Tabla 25. Resultados de la clasificación con electrodos de oro y plata (5)

7.1.1.3 Aplicación de Red Fuzzy Artmap

Para intentar mejorar los resultados de la clasificación que ha realizado la red neuronal de tipo *Perceptron*, se utiliza otro tipo red neuronal denominado Fuzzy ARTMAP. Estas redes están formadas por redes Fuzzy ART y relacionadas entre sí de forma que se consigue un aprendizaje supervisado y cuyas características son detalladas en el capítulo 3 de la presente memoria.

Al igual que la red anterior, esta red posee 3 salidas, que corresponden los tres posibles estados del pescado: Apto, No apto y Dudoso, de forma que cada experiencia debe activar una de las salidas a nivel a 1 y las otras 2 salidas con nivel 0. Para estimar el índice de éxito en la identificación de las muestras con el clasificador de tipo Fuzzy ARTMAP se ha creado una validación de cruce con el método de validación cruzada de

orden uno (*leave-one-out*). Para realizar este análisis se han realizado funciones macros de MATLAB (.m) que implantan los algoritmos de ARTMAP.

Se han utilizado los datos de los dos análisis anteriores con redes ARTMAP, en el primer caso con 12 entradas y en el segundo con 5, obteniendo en ambos casos una **tasa de éxito del 100%** y con un coste computacional mucho menor. Lo que confirma que este método es óptimo, sobre todo en los análisis con pocos datos

La conclusión de los análisis de los datos de esta experiencia es que se puede obtener un sistema de red neuronal artificial para la clasificación de las medidas en tres bloques. El número de entradas ideal es 5, que corresponde a los datos de los electrodos de oro y plata, el número óptimo de neuronas de la capa oculta es de 6 y la función de transferencia de las neuronas de salida es de tipo *logsig*.

7.2 MEDIDAS EN MODO DISCRETO CON PESCADO TRITURADO. ANÁLISIS BIOQUÍMICOS

La última experiencia realizada con pescado tenía pretensiones de ser definitiva, por este motivo se realiza un número considerable de análisis de los datos. Por un lado se realizó medidas potenciométricas en modo discreto con solo dos tipos de electrodos: oro y plata, Ya que en la experiencia anterior se ha comprobado con la red neuronal que sólo con ellos se obtienen mejores resultados que uniendo con junto a otro electrodos. Para lograr una mejor homogenización de las muestras a experimentar, se tomaron varios ejemplares de pescado (dorada) y se trituraron formando una pasta que se distribuyó en tres cajas. Para realizar las medidas se construyó un sistema de medida especial para el caso, formado por tres recipientes con idénticos conjuntos de electrodos (3 electrodos de oro, 3 de plata), según se detalla en el punto **4.1.3** de este capítulo. Además de las medidas potenciométricas, cada día se tomaban muestras de las tres cajas para realizar medidas químicas y biológicas. Las medidas potenciométricas se desarrollaron durante 10 días, pero las experiencias biológicas solo hubo posibilidad de realizarlos durante 7 días.

7.2.1 Resultados Medidas de Electroodos

De cada una de las experiencias se toma un dato por cada uno de los electrodos, de esta forma se obtiene cada día 9 datos de medidas para los electrodos de oro, plata, carbón y cobre y 3 de níquel. Se realiza la media aritmética de los datos de cada día, obteniendo de esta forma un dato por cada día, así como la desviación típica de las 9 medidas que se han utilizado para el cálculo de cada punto. La representación de estos datos de los electrodos de oro y plata se realiza en la **Figura 119**, en ella se observa, una vez más, una tendencia descendente de potencial eléctrico, que en este caso no puede ser achacado a derivas. El oro empieza desde un potencial más elevado pero posee un pendiente mayor que la de la plata.

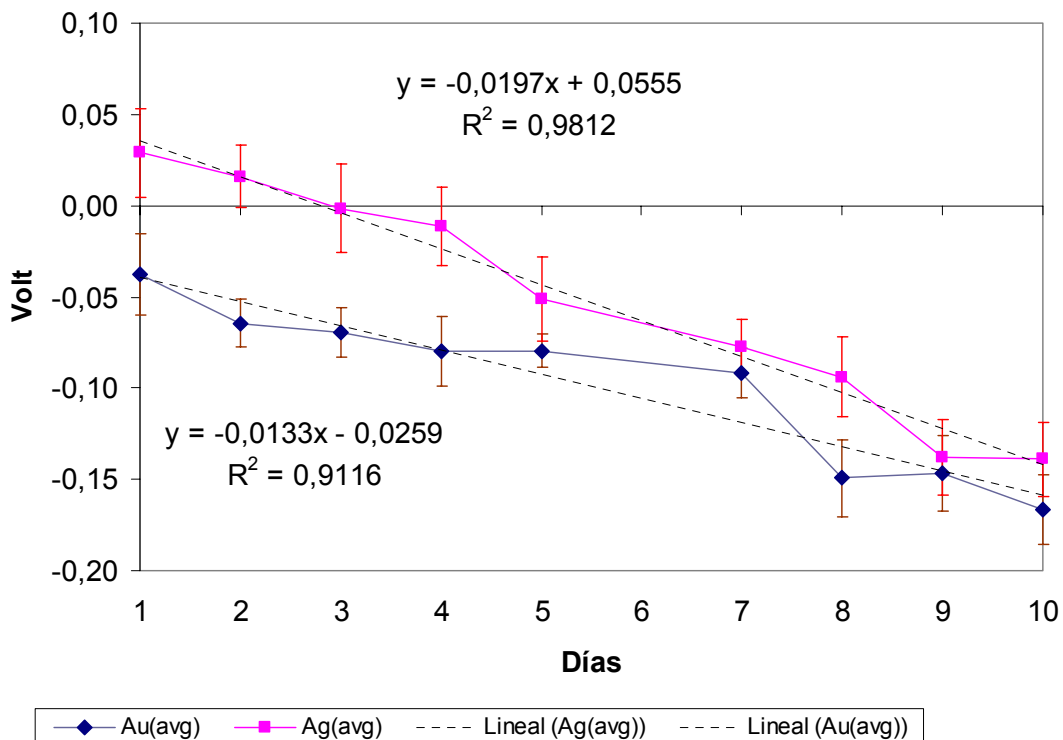


Figura 119. Resultados de los electrodos de oro y plata en las medidas discretas

7.2.2 Análisis Multivariante

Para obtener mayores conclusiones de las medidas potenciométricas de los electrodos se realizan diversos tipos de análisis multivariante. En primer un análisis no supervisado como PCA, y posteriormente de redes neuronales artificiales.

7.2.2.1 Análisis PCA

Para comprobar la relación entre todos los electrodos de oro y plata con respecto al tiempo, se realiza un Análisis de Parámetros Principales (PCA) con 27 medidas de 9 electrodos. La **Figura 120** representa la proyección sobre los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), en ella se comprueba que existe una distribución de la posición de las medidas a lo largo del eje X, los primeros días están en la parte izquierda y los últimos días a la derecha. Aunque no se puede realizar agrupaciones de las medidas de todos los días, si se observa una clara diferencia de las medidas de últimos días respecto a los primeros. En esta gráfica también es de destacar el gran porcentaje de información que aglutina el primer parámetro PC1 (92,28%). Este fenómeno era evidente viendo las gráficas de la variación del potencial de los electrodos respecto al tiempo, porque todos los electrodos tienen una variación descendiente.

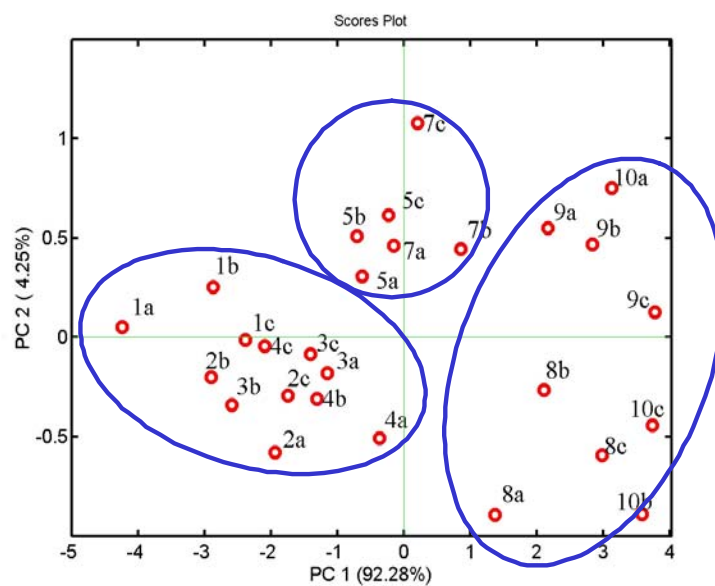


Figura 120. Representación análisis PCA

Si se representa el diagrama de los pesos del análisis PCA se puede comprobar la gran correlación entre todos los electrodos, aunque de forma más clara en los electrodos de plata que los de oro.

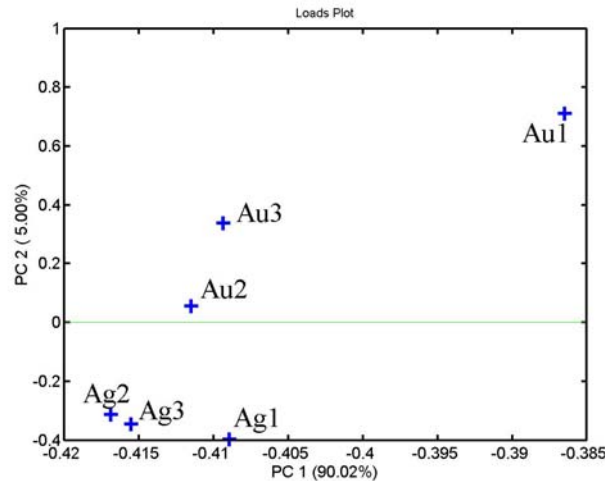


Figura 121. Pesos de cada electrodo en los valores de PC1 y PC2

Relacionando los resultados del análisis PCA con las líneas de variación del potencial del oro con el de la plata se puede observar que existen tres zonas: la primera, correspondiente con la agrupación de los datos de los primeros días (1, 2, 3 y 4) y donde el potencial del oro es claramente superior al de la plata y que se puede considerar que el pescado está fresco y **apto** para el consumo, Una segunda etapa correspondiente a la agrupación de los días intermedios (5 y 7) y donde el potencial de los electrodos de oro y de plata está muy cerca, en el cual el pescado se puede considerar en condiciones **dudosas** para el consumo, Y por último, la etapa correspondiente a la agrupación de los últimos días (8, 9 y 10) donde se puede coniderar que el pescado como **no apto** para el consumo. Con estos resultados podemos realizar un sistema de lengua electrónica que, por medio de varios electrodos de oro y de plata, se obtenga una evaluación cualitativa del pescado entre Apto, No apto y Dudoso³⁵¹.

7.2.2.2 Análisis FuzzyART

Para completar el análisis no supervisado se aplican algoritmos Fuzzy ART a las medidas para comprobar si se agrupan por semejanza. Este tipo de análisis se puede considerar como un tipo de PCA sistemático (capítulo 4). La implementación de este análisis se realiza por un algoritmo con el programa *MATLAB* con unos parámetros de

³⁵¹ B. Iliev, M. Lindquist, L. Robertsson, P. Wide. *A fuzzy technique for food and water quality assessment with an electronic tongue*. Fuzzy sets and systems, 157, (2006), 1155-1168

entrada (grupos) y otros de salida (correspondientes elementos). La rigidez a la hora de formar grupos viene determinado por un parámetro ρ que varía de 1 a 0. De forma que con valores de ρ cercanos a 0 el algoritmo tiende a realizar un solo grupo con todas las medidas y con valores cercanos a 1 tiende a crear un grupo para cada medida.

En nuestro caso, se probaron diversos valores para ρ y se comprobó que hasta $\rho=0,89$ solo se obtiene dos grupo, a partir de $\rho=0,93$ se obtiene cuatro o más grupos y con $\rho=0,91$ se obtiene la clasificación más parecida con tres grupos de días.

Clase	Medidas
1	d1a, d2a, d3a, d4a - d1b, d2b, d3b, d4b - d1c, d2c, d3d, d4d
2	d5a, d7a, d8a - d9a, d5b, d7b, d8b - d5c, d7c
3	d10a - d9b, d10b - d8c, d9c, d10c

Tabla 26. Clasificación FuzzyART de las medidas de pescado

En la Tabla 26 se muestra los resultados de la clasificación FuzzyART. En ella, cada medida está definida por una etiqueta que es específica el día de almacenamiento y el lote (a, b, c). Se puede comprobar que hay cierta confusión con los datos entre las clases 2 y 3, porque por ejemplo en la clase 3 incorpora una medida del lote a, dos del b y tres del c.

7.2.2.3 Aplicación de Redes Neuronales de tipo Perceptron

Al igual que en la experiencia anterior se aplican técnicas supervisada de reconocimiento de patrones, con redes neuronales artificiales de tipo *Perceptron*. Se aplica una red con tres salidas de función de transferencia de tipo *logsig*, 6 entradas (los 6 electrodos). Para las etapas de entrenamiento y validación se emplea la técnica “leave-one-out”. En el análisis se varía el número de neuronas de la capa oculta, los resultados de las tasas de éxito de cada una de las salidas así como las totales se muestran en la Tabla 27. En ella se observa que el número óptimo de neuronas es de 5 o 7, logrando en estos casos una tasa de éxito de la clasificación total del 88,88%.

Neuronas Ocultas	A/12	B/6	C/9	Total/27	% OK
1	10	0	8	16	59,25%
2	12	3	7	22	81,48%

3	9	4	8	20	74,07%
4	11	3	9	23	85,18%
5	12	4	9	24	88,88%
6	11	4	8	23	85,18%
7	12	4	8	24	88,88%
8	11	4	7	22	81,48%
9	12	3	6	20	74,07%
10	11	5	9	23	85,18%

Tabla 27. Aciertos de la red neuronal perceptron

7.2.2.4 Aplicación de Red Fuzzy Artmap

Al igual que en la experiencia anterior, en este caso también se realiza un análisis con redes de tipo Fuzzy ARTMAP utilizando los mismos datos que con la red neuronal de tipo Perceptron. Al igual que la red anterior, esta red posee 6 entradas correspondiente a los 6 electrodos y 3 salidas, que corresponden los tres posibles estados del pescado: Apto, No apto y Dudoso, de forma que cada experiencia debe activar una de las salidas a nivel a 1 y las otras 2 salidas con nivel 0. Para estimar el índice de éxito en la identificación de las muestras con el clasificador de tipo Fuzzy ARTMAP se ha creado una validación de cruce con el método de validación cruzada de orden uno (*leave-one-out*). Con este método y con las medidas obtenidas con la lengua electrónica se obtiene los resultados reflejados en la **Tabla 28**, donde se obtiene una **tasa de éxito del 85,18%**.

A/12	B/6	C/9	Total/27	% OK
11	4	8	23	85,18%

Tabla 28. Aciertos con la red ARTMAP

En este caso se obtiene unos resultados similares entre la red Perceptron y Artmap. Es decir estamos exigiendo a ambas redes neuronales un grado de discriminación muy exigente que no pueden lograr con los datos disponibles.

7.2.3 Resultados de Medidas Biológicas con Pescado Triturado

De forma similar a las primeras experiencias con pescado entero, se realizaron análisis químicos y biológicos con pescado triturado. Para ello se tomaban muestras

cada día de experiencia. Estos análisis también se realizaron con instrumental y por personal del Departamento de Tecnología de los Alimentos de la UPV, o por laboratorios asociados. Los análisis realizados fueron los siguientes:

- Recuento microorganismos,
- Medida del pH
- Determinación de cloruros,
- Análisis de nucleótidos (IMP, inosina e hypoxantina).

7.2.3.1 Recuento Microorganismos y Medida de pH

La **Figura 122-b** muestran el valor del recuento de microorganismos aeróbios mesófilos obtenido de unidades formadoras de colonia por gramo de músculo. Como se puede observar en dicha figura el número de microorganismos va aumentando progresivamente hasta el cuarto día, donde se alcanza una estabilidad y prácticamente se mantiene constante la población microbiana. Este hecho coincide con los cambios bioquímicos que se producen en el pescado en cuanto a pH y nucleótidos.

El valor de aceptabilidad de la calidad microbiológica en el pescado depende del tipo de materia prima y de los tratamientos de conservación que vaya a recibir. La dorada es un pescado con un valor comercial elevado en fresco. Para este tipo de pescados un recuento de bacterias aeróbias mesófilas superior a 10^7 ufc/g no tiene la calidad higiénico-sanitaria suficiente para ser consumido,³⁵² por lo que a partir del tercer día la muestra no cumpliría con los límites establecidos ya que para este día el recuento de bacterias aeróbias mesófilas alcanzó un nivel de $2,2 \times 10^7$ ufc/g. Se debe constatar que el estudio se realizó en el mes de julio con una temperatura ambiente elevada que puede influir en la aceleración de los procesos de degradación y el crecimiento microbiano durante el transporte de la materia prima y las tomas de muestra. Además, como la materia prima fue triturada para su estudio implica que los recuentos fueran más elevados a lo que cabría esperar ya que el contacto de los microorganismos presentes en

³⁵² ICMSF (International Commission on Microbial Specifications for Foods) 1986. *Microorganisms in Foods. 2. Sampling for microbiological analysis: Principles and specific applications*. 2nd ed. Blackwell Scientific Publications.

la piel con el músculo del pescado se aceleró con el triturado, en lugar de producirse una difusión hacia el interior como es habitual.

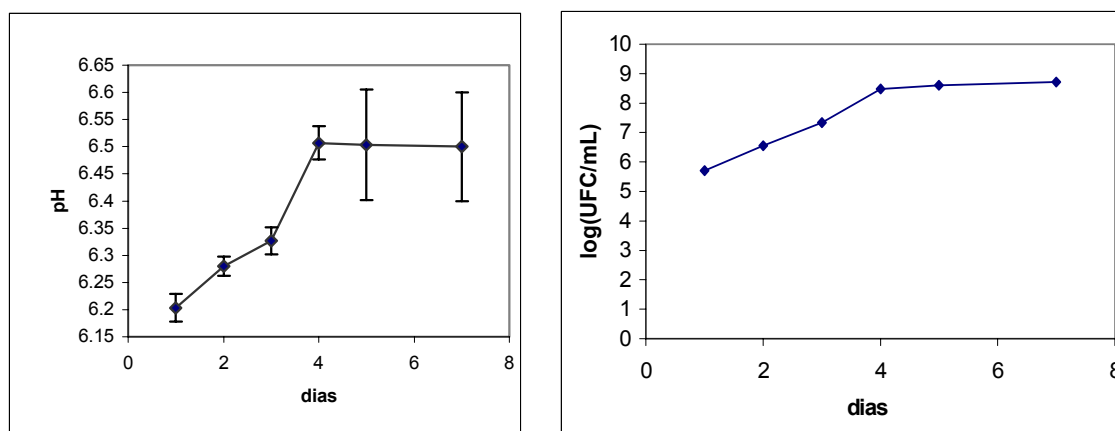


Figura 122. Evolución de pH y el recuento de microorganismos totales aeróbios mesófilos

En cuanto la evolución del pH, se puede observar en la **Figura 122-a** la tendencia de la curva, primero un aumento ligero, en el cuarto día (en este caso) un aumento de 0,18 y posterior a este aumento una estabilidad está en consonancia con la pauta de comportamiento en experiencias con este pescado³⁵³ almacenado en hielo. La subida del pH a partir del día 4 se debe a la producción de metabolitos bacterianos alcalinos, coincidiendo con la estabilización del crecimiento bacteriano y con el punto de inflexión de las curvas de nucleótidos. El número de microorganismos va aumentando progresivamente hasta el cuarto día, donde se alcanza una estabilidad y prácticamente se mantiene constante la población microbiana. Este hecho coincide con los cambios bioquímicos que se producen en el pescado en cuanto a pH y nucleótidos.

7.2.3.2 Evolución del Contenido en Cloruros

La determinación de cloruros en la materia prima se realizó el primer y el último día del periodo de almacenamiento. Las medidas realizadas no mostraron diferencias significativas en la concentración de cloruros para ambos tiempos de toma de muestra. El valor promedio de la fracción másica de cloruros (\pm desviación estándar) para el

³⁵³ V. R. Kyrana, V. P. Lougovois, D. S. Valsamis. (1997). *Assessment of shelf-life of maricultured gilthead sea bream (Sparus aurata) stored in ice*. International Journal of Food Science and Technology, 32: 339-347).

primer y el último día de almacenamiento fue de $0,009\pm 0,0009$ y $0,010\pm 0,0006$ respectivamente, con lo cual podemos concluir que la influencia de la concentración en cloruros sobre las medidas registradas en los electrodos fue constante a lo largo del tiempo de almacenamiento estudiado.

7.2.3.3 Análisis de Nucleótidos

El análisis de IMP, Inosina e Hipoxantina se basa en el estudio de la variación en concentración de éstos en función del tiempo como se muestra en la figura 3. La evolución de los tres analitos es la esperada³⁵⁴.

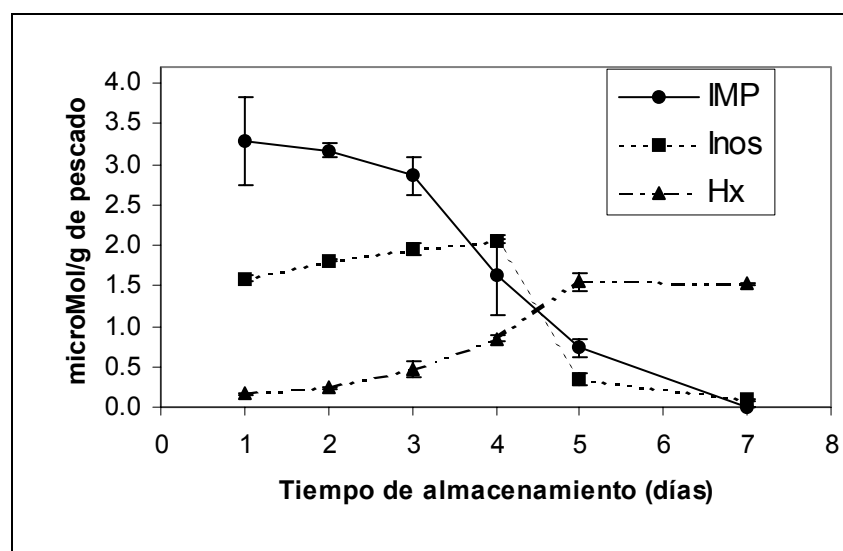


Figura 123. Evolución de IMP, Inosina e Hipoxantina en la muestra durante el tiempo de almacenamiento a 4°C.

A partir de los distintos valores obtenidos del análisis de los nucleótidos se obtiene el índice de frescura K1, cuya variación a lo largo del tiempo se representa en la **Figura 124**. En los dos primeros días se mantiene sin cambios significativos (34,84-39,10). A partir del tercer día (45,33) comienza un aumento estadísticamente progresivo hasta el quinto día (78,55). Del estudio del valor K1 se puede concluir que para la degradación de los nucleótidos los cambios de frescura y calidad suceden entre el tercer y quinto día. A mayor K1, menor frescura a partir del tercer día comienza el descenso de la frescura y disminuye constantemente hasta el último día, que alcanza su valor máximo al desaparecer por completo el IMP.

³⁵⁴ T. A. Gill. *Objective analysis of seafood quality*. Food Rev. Int., 6 (1990) 681-714.

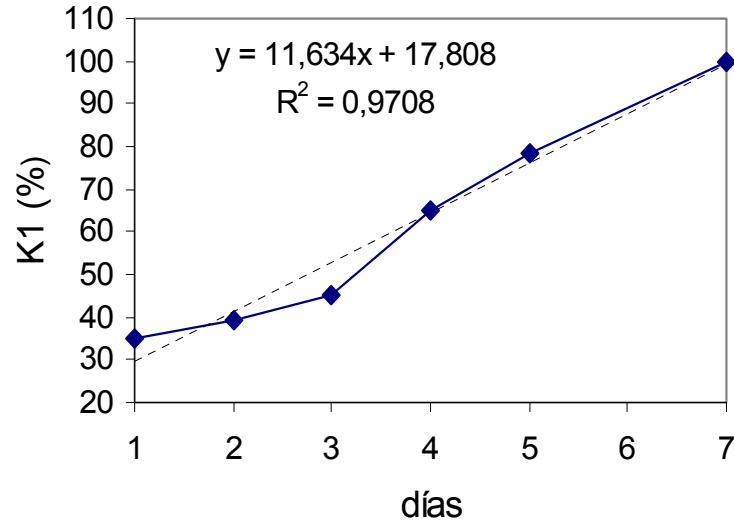
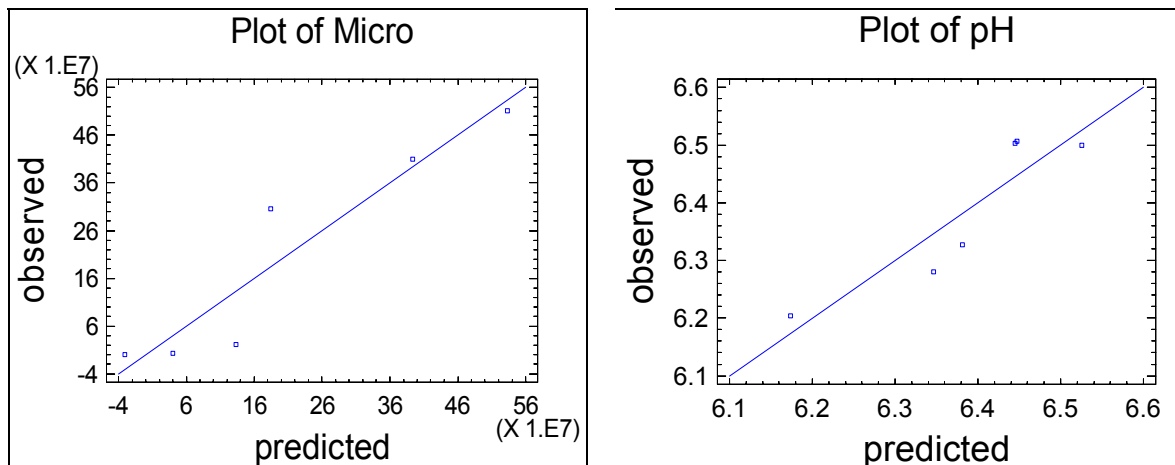


Figura 124. Evolución de K1 en la muestra durante el tiempo de almacenamiento a 4°C.

7.2.4 Correlación de los datos Bioquímicos con los Potenciométricos

Con los resultados con los dos métodos de medida del pescado se buscó una correlación entre ellos. Para ello se utilizaron los resultados del oro y plata porque son los que obtuvieron mejor correlación con los datos experimentales de los análisis químicos y microbiológicos. En la **Figura 125** se observa la correlación que muestra los datos del potencial registrados para los electrodos de oro y plata, con los datos obtenidos analíticamente para el pH, recuento microbiano, IMP y K1 con la finalidad de intentar relacionar las señales eléctricas con los parámetros analizados, mediante el tratamiento de los datos por mínimos cuadrados.



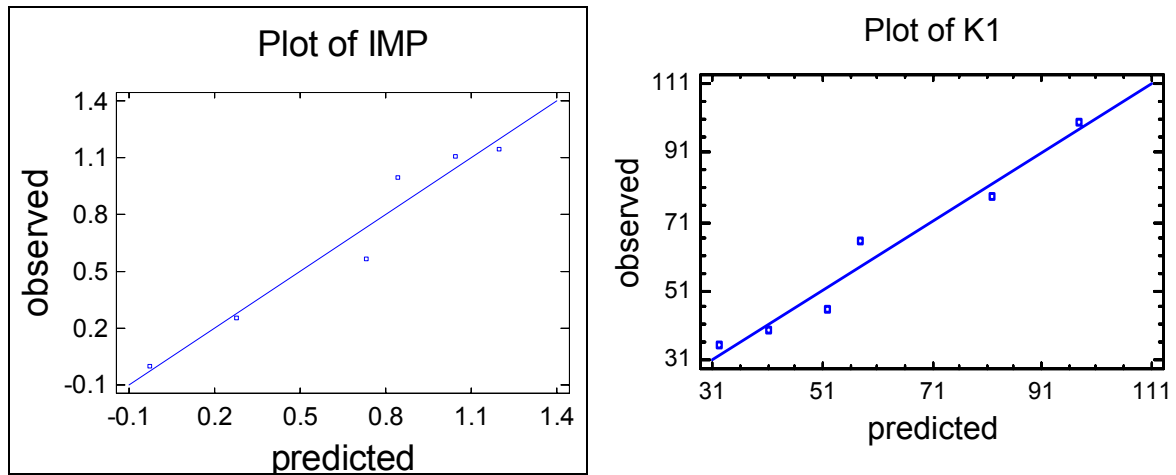


Figura 125. Correlación de los valores de pH, micro IMP, K1 con respecto a los valores de potencial de los electrodos de oro y plata

Tipo Análisis	Fórmula ajuste con Au y Ag	R ²
Micro	Micro = 1.23211E8 - 5.29164E9*Au	0.885
pH	pH = 5.92697 - 6.52398*Ag	0,82
Nucleótidos	Hx= 0.150476-3.938·Au	0.935
	IMP= 0.863814+11.5051·Au	0.950
	Ino= -0.14998-5.7432·Ag+4.73342·Au	0.943
K1	K1= 47,583-45,6372*Ag-597,961*Au	0.964

Tabla 29. Valores ajustes entre análisis biológicos y lengua electrónica

Como se observa en la tabla el ajuste se realizó en algunos casos con las medidas del oro, en otros con los electrodos de plata y alguno con los valores de los dos metales. En general hay un buen ajuste, excepto con el pH porque el potencial de estos materiales está poco relacionado con el pH, en lo nucleótidos se observa un índice ajuste similar de los tres componentes pero mejor con IMP que es el representado en la figura y por último, destaca el buen un ajuste de K1 con valor de R²=0,964, con lo cual se obtiene con la combinación de los electrodos de oro y plata una buena correlación con K1 que corresponde con una evaluación global de la frescura del pescado.

Estos resultados demuestran que estos electrodos podrían ser útiles para detectar las variaciones de calidad, medidas por métodos químicos y microbiológicos, que sufre el pescado en su proceso de descomposición. Sin embargo resulta necesario realizar más experiencias y estudios para obtener resultados concluyentes.

8 CONCLUSIONES

De las distintas experiencias para el control de la frescura del pescado, y en las condiciones en que se realizaron las experiencias, se desprenden las siguientes conclusiones:

Se han utilizado electrodos en forma de varilla de los siguientes materiales: oro, plata, cobre, carbón y níquel. De estos electrodos, los que mejor comportamiento y repetibilidad presentan son los de oro y de plata. Combinando la información de estos electrodos se podría construir un sistema que permita obtener de una forma rápida, cómoda, sencilla y económica la calidad de una pieza de pescado (en este caso dorada) Por medio de una red neuronal, apropiadamente entrenada se podría obtener un clasificador de la calidad del pescado a partir de los valores de las medidas con los electrodos y con tres posibles salidas: Apto, Dudoso y No apto (capítulo 10)

Capítulo 8. Experiencias. Análisis con Carne

En este capítulo se presentan las experiencias y los resultados realizados por el sistema de lengua electrónica tomando como muestras piezas de carne de cerdo. Se realizaron dos tipos de experiencias, primero con piezas de lomo fresco de cerdo para poder discriminar las muestras según el tiempo de almacenamiento, y después con piezas de lomo curado con sal, pero en lugar de utilizar como elemento de salazón únicamente cloruro sódico también utilizando otros tipos de sales a fin de crear un producto curado apto para personas hipertensas.

La carne de los animales mamíferos está formada por sustancias orgánicas complejas cuya estructura sufre modificaciones físicas, químicas y biológicas con el paso del tiempo, por lo que es de suponer que este parámetro afectará al valor de la señal de los sensores potenciométricos. Es decir, debe poseer un comportamiento equivalente al pescado cuyas experiencias se presentan en el capítulo 7 de la memoria. Pero la carne tiene un deterioro más lento y menos evidente que el pescado, por lo que también es de suponer que las modificaciones serán más difíciles y menos precisas de detectar con los sistemas de lenguas electrónicas potenciométricas.

En cuanto a la carne curada, la utilización de distintos tipos de sales puede ocasionar una modificación de las señales potenciométricas. En el capítulo 5 se comprobó la discriminación de diferentes disoluciones según el tipo de anión y catión de la sal disuelta, pero en el caso de la carne curada, debido a su escaso contenido en agua hace más dificultosa la medida con celdas potenciométricas, por lo que también posiblemente será difícil la discriminación de las muestras.

1 ANTECEDENTES DE ANÁLISIS DE CARNE CON LENGUAS ELECTRÓNICAS

La aplicación de las lenguas electrónica en el análisis de la carne tiene como precedente el uso de las narices electrónicas como sistemas de medida de gases con sensores no específicos. El análisis de los alimentos fue una de las principales aplicaciones de las narices electrónicas debido a que casi todos ellos desprenden olores que determinan características sobre su calidad³⁵⁵. Se han presentado diversos sensores de gases, basados fundamentalmente en dispositivos MOS, aplicados a para discriminación de productos cárnicos³⁵⁶. Este tipo de dispositivos, con ayuda de redes neuronales, permite la discriminación distintos tipos de carne³⁵⁷, pero el reconocimiento del tiempo de almacenamiento fue más problemático. Otro tipo de sensores utilizados para narices electrónicas y aplicadas a la calidad de la carne son los basados en polímeros conductores³⁵⁸.

Los sistemas de lenguas electrónicas aplicadas a la carne tienen un desarrollo todavía escaso. El punto de partida son sensores que se aplican directamente a la carne, como los biosensores. Así se han presentado investigaciones que utilizan sensores con putrescina oxidasa para estimar el deterioro bacteriano y xantina oxidasa para determinar el progreso del envejecimiento³⁵⁹. A partir de estos sensores, se han desarrollado un sensor para la demanda de oxígeno biológico (sensor BOD), que consiste de un sensor de oxígeno y una membrana microbiológica aplicado para la determinación de aminoácidos producidos en la carne durante el proceso de

³⁵⁵ E. Schaller, J. Bosset, F. Escher. *'Electronic Noses' and their Application to Food*. Academic Lebensm. Wiss Technol, 31 (1998) 305-316.

³⁵⁶ V. Vernat-Rossi, C. Garcia, C. Talon, R. Denoyer, J.L. Berdagué. *Rapid discrimination of meat products and bacterial strains using semiconductor gas sensors*. Sensors and Actuators B, 37 (1996) 43-48.

³⁵⁷ F. Winqvist, E.G. Hornsten, H. Sundgren, I. Lundstrom. *Performance of an electronic nose for quality estimation of ground meat*. Measurement Science Technology, 4 (1993) 1493-1500.

³⁵⁸ V. Shiers, P. Farnell, W. Blackburn, D. Kilcast. *Comparison of electronic nose, sensory panel and microbiological analysis for the detection of spoilage in modified-atmosphere-packed minced beef*. Leatherhead report ,734, (1996).

³⁵⁹ Y. Yano, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube. *Direct evaluation of meat spoilage and the progress of aging using biosensors*. Analytica Chimica Acta, 320 (1996) 269-276.

envejecimiento³⁶⁰. Al mismo tiempo, el número de bacterias en la carne fue determinado por métodos convencionales de recuento colonial y los valores obtenidos se correlacionaron con las señales del sensor, concluyendo que el método sensor es una técnica sencilla para monitorizar la frescura de la carne en los estados iniciales de su envejecimiento.

La aplicación de la potenciometría con electrodos metálicos se ha utilizado fundamentalmente en medios líquidos con disoluciones iónicas, como pueden ser aguas naturales. También se ha utilizado en otros medios acuosos, incluido el control de calidad de la carne.³⁶¹ En este caso, la frescura del cerdo es evaluada por medio de electrodos sólidos que detectan los elementos responsables de la etapa inicial del proceso de putrefacción del cerdo. Los electrodos utilizados son Pt, CuS y Ag₂S. Con las medidas obtenidas y por medio de técnicas de análisis multivariante encuentra una correlación entre el recuento bacteriano y el potencial de los electrodos.

2 DETECCIÓN DEL DETERIORO DE LOMO FRESCO DE CERDO

El objetivo de la primera parte de la experiencia con carne es su discriminación, según los días que están almacenados, de diversas piezas de lomo fresco de cerdo cuando se encuentra almacenada bajo refrigeración. De esta forma se pretende lograr un sistema que detecte el natural deterioro que sufre la carne cuando se encuentra almacenada. Es decir un sensor que actúe de forma rápida, sencilla y económica para comprobar la frescura de la carne de cerdo.

Para conseguir los objetivos propuestos se ha realizado el diseño, la construcción, las medidas y el análisis de resultados de un sistema de lengua electrónica. Este sistema está formado por una matriz de varios electrodos metálicos para analizar la capacidad de detectar el paso del tiempo y el correspondiente deterioro de las muestras de carne. Las medidas son realizadas sobre lonchas de lomo fresco de cerdo.

³⁶⁰ Y. Yano, M. Numata, H Hachiya, S. Ito, T. Masadome, S. Ohkubo, Y. Asano, T. Imato. *Application of a microbial sensor to the quality control of meat freshness*. Talanta, 54 (2001) 255-262.

³⁶¹ N. Kaneki, T. Miura, K. Shimada, H. Tanaka, S. Ito, K. Hotori, C. Akasaka, S. Ohkubo, Y. Asano. *Measurement of pork freshness using potentiometric sensor*. Talanta, 62 (2004) 217-221.

2.1.1 Sistema de Medida

El sistema de lengua electrónica que se va a utilizar en esta investigación corresponde al conjunto de bloques que se presenta en el Anexo II de la presente memoria, pero modificado para acondicionarlo a la naturaleza de las muestras a analizar y a los electrodos utilizados. Los cambios más significativos se refieren al sistema multielectrodo que ha sido construido específicamente para esta experiencia.

2.1.2 Sensores

Para realizar las medidas se ha construido un sistema de sensores formado por un multielectrodo con 10 electrodos de materiales diversos. La longitud de cada electrodo es de unos 3cm y de grosor variable según el material. Los materiales utilizados para los electrodos quedan resumidos en la siguiente tabla

Nº Electrodo	Material
2	Cobre
2	Oro
2	Plata
2	Plomo
1	Carbón
1	Zinc

Los electrodos se soldaron a una placa de circuito impreso que sirve de soporte a todo el sistema y, mediante un conector adecuado, lleva las señales que ha captado a un sistema de acondicionamiento de la señal. Por medio de un orificio central en la placa se incorpora un electrodo de referencia de Calomelanos.

2.2 EXPERIENCIAS

El experimento consiste en realizar medidas durante un periodo de dos semanas con lonchas de lomo fresco. El tiempo de dos semanas es el que suele corresponder con el máximo de almacenamiento de la carne de cerdo fresco a la temperatura de 4°C. Se realizaron medidas en los diez días laborales de dos semanas. Cada día se repetía la experiencia **tres veces**, para así determinar su repetibilidad.

El proceso de medida consiste en pinchar, con el conjunto de electrodos activos y el electrodo de referencia, la muestra de lomo en forma de loncha. Una vez que el sistema

de medida esta preparado, se toman medidas en intervalos de 5 segundos durante aproximadamente 10 minutos, para así esperar a que se alcance el valor estacionario del potencial de los electrodos. Los datos con las medidas se almacenan automáticamente en el ordenador en un fichero de tipo ASCII. Después de cada medida todos los electrodos se limpiaban con agua destilada y etanol, secándose cuidadosamente para dejar el sistema en condiciones para realizar otra medida. Para realizar la experiencia se tomaron medidas los días 1, 2, 3, 4, 7, 9 10, 11 y 14. Es decir un total 10 días con medidas en un plazo de 14 días Un aspecto del proceso de medida se muestra en la **Figura 126.**

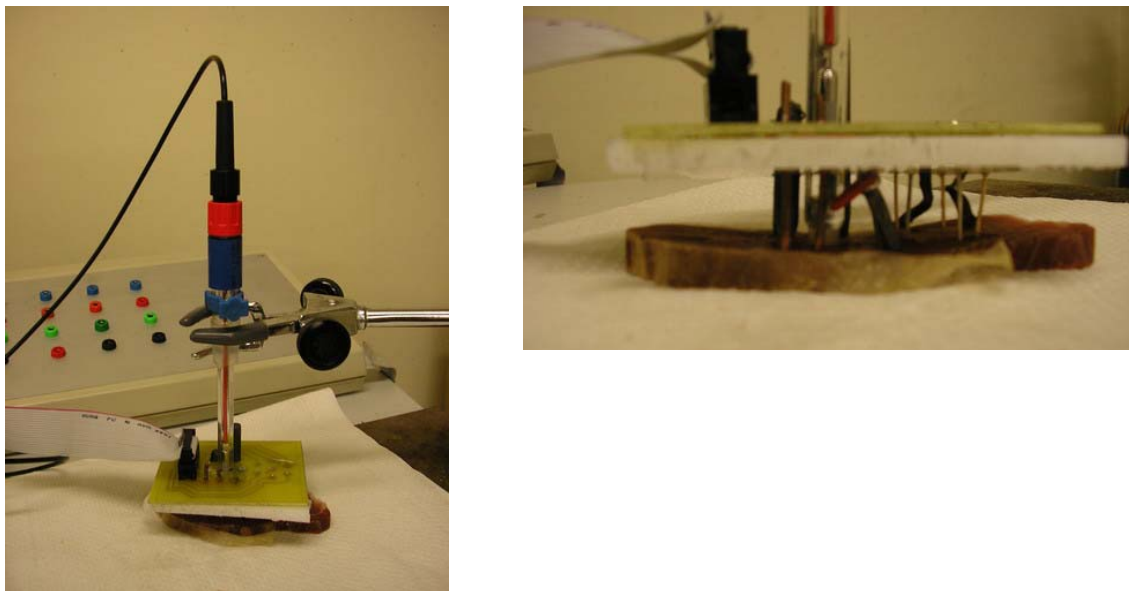


Figura 126. Detalles de las experiencias

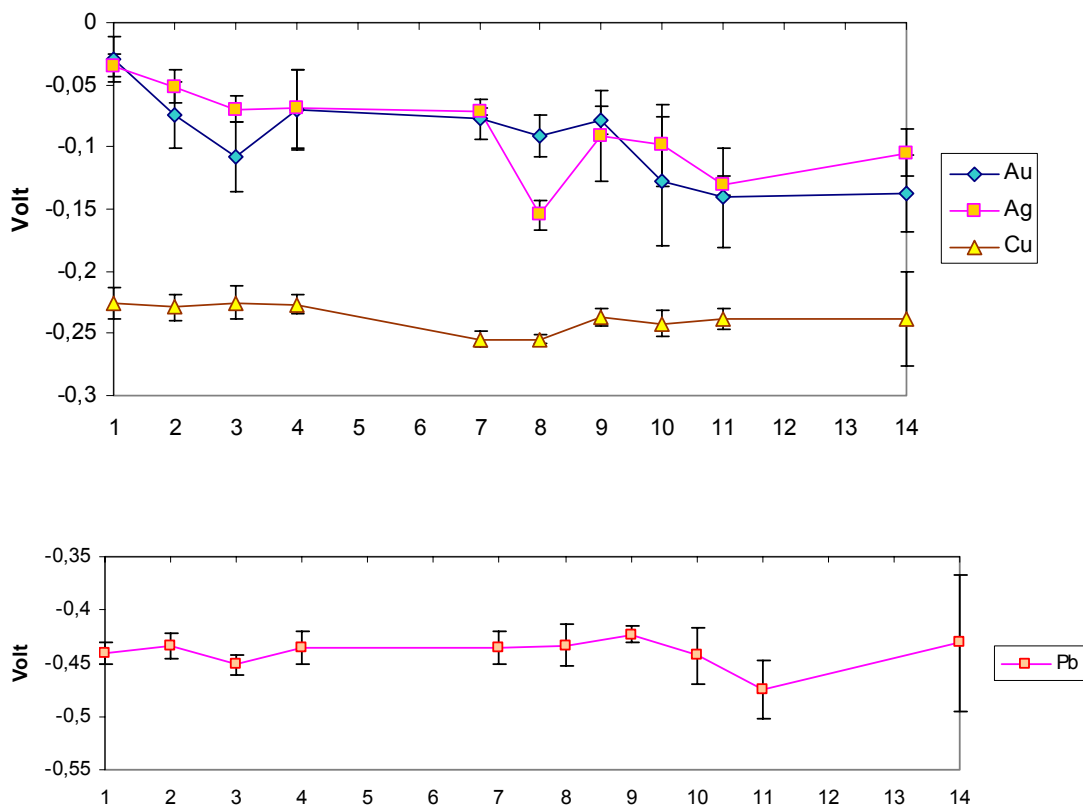
Además de las medidas con lomo, y en prevención de que los electrodos sufrieran una deriva de su potencial a lo largo del tiempo, se realizaron medidas de calibración del sistema al inicio de las medidas de cada día. La calibración consistió en realizar medidas con una disolución acuosa patrón, formada por tampón HEPES pH 7,5 disuelto al 10% con agua destilada y con 0,5 g de KCl. Las medidas con la muestra de calibración se realizaron siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras de lomo.

2.3 RESULTADOS

Los resultados de cada experiencia consisten en un dato para cada electrodo. El valor de este dato se determina mediante la media aritmética de los últimos diez muestreos, de esta forma se amortiguan posibles influencias del ruido eléctrico o variaciones aleatorias de las medidas. Con los datos de todas las experiencias se confecciona una matriz de resultados. La matriz está formada por 14 columnas, correspondientes a cada uno de los electrodos y por 30 filas (3 medidas por día durante 10 días).

2.3.1 Resultados de las Gráficas Temporales

En las gráficas siguientes se representa el potencial a lo largo del tiempo de los electrodos seleccionados. Como el margen de la variación del potencial depende del tipo de material, se han representado por grupos de materiales. En líneas generales, no se observa una variación muy continua del potencial de los electrodos ya que existen algunos casos de valores anómalos. A partir de las gráficas es difícil obtener conclusiones y para ello es necesario el uso de las técnicas de análisis multivariante.



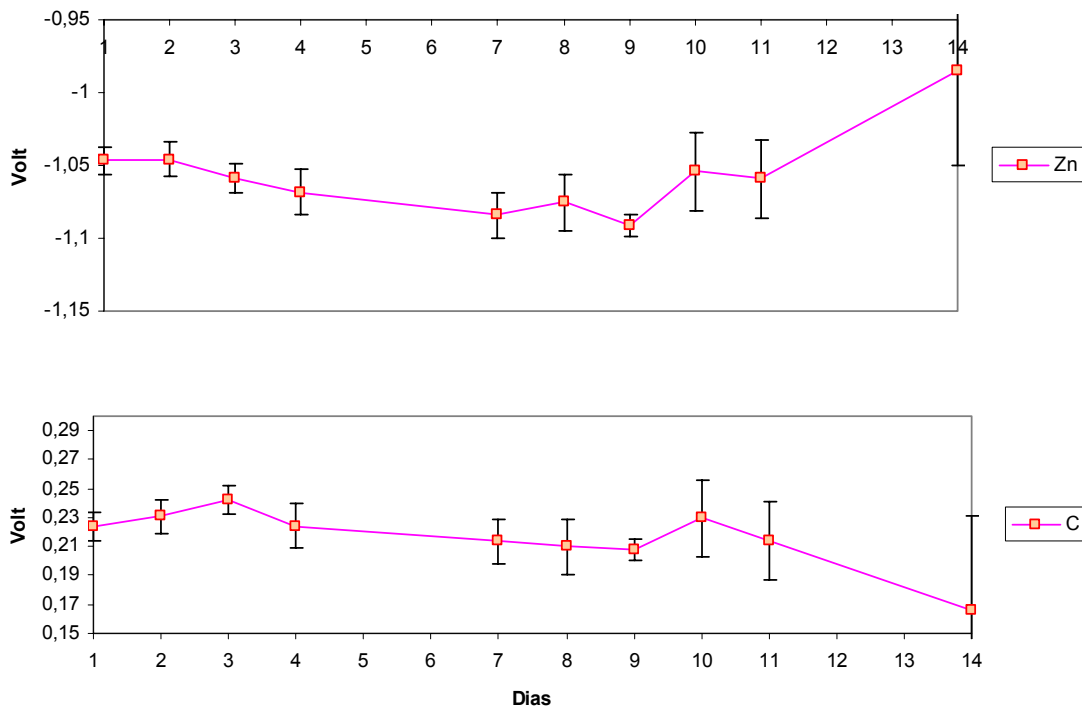


Figura 127. Variación del potencial de cada electrodo a lo largo del tiempo

2.3.2 Análisis Multivariante.

Con los datos de los diez electrodos seleccionados se está en disposición de realizar un análisis el Análisis de Componentes Principales (PCA) para comprobar si existen de forma espontánea agrupaciones entre las medidas. Se toma la matriz de 10 columnas y 30 filas y se realiza el análisis con el programa *MATLAB* y el programa anexo *PLS_Toolbox 2.0*. En la **Figura 128** se muestra la gráfica con la representación de los *scores* de los dos primeros Componentes Principales (PC1 y PC2). En la gráfica se puede comprobar que las medidas se distribuyen a lo ancho de la gráfica formando grupos de tres medidas de cada día, Es decir, con las medidas de los electrodos se logra una discriminación de las medidas según el día de almacenamiento. Además, el eje PC1 tiene una correlación aproximada con el tiempo, porque las medidas correspondientes a los primeros días se encuentran en la parte izquierda de la gráfica mientras que las de los últimos días están a la derecha, aunque también existen medidas de algunos días no corresponden a esa distribución.

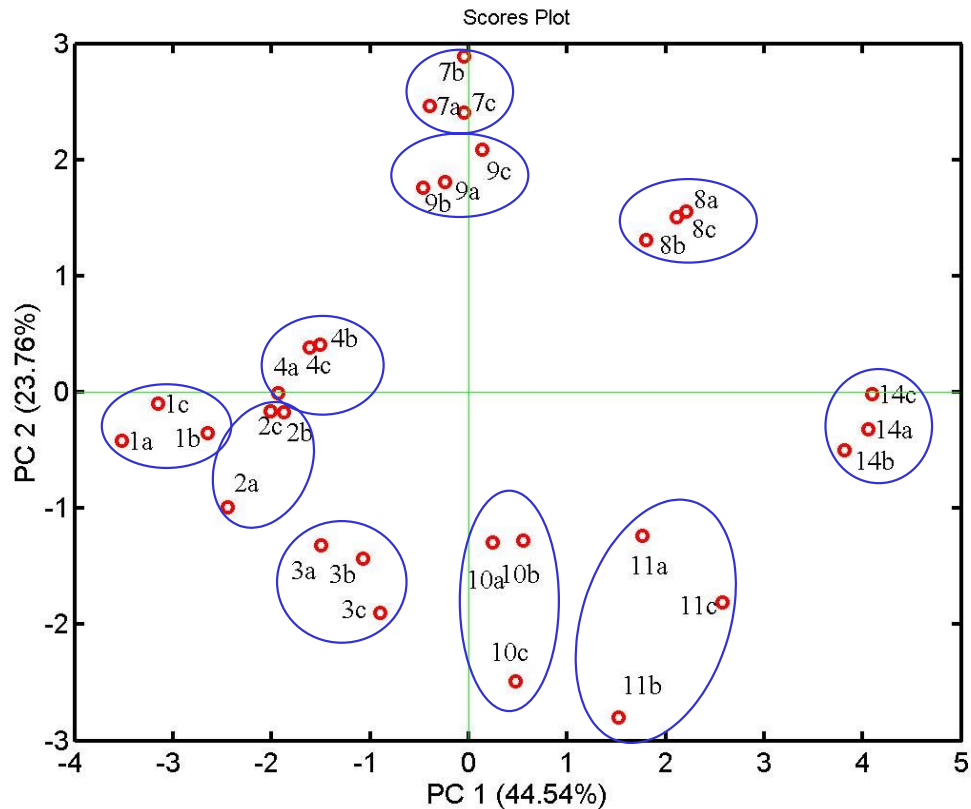


Figura 128. Resultados análisis PCA

Otro dato que se desprende de la gráfica es que la información que abarca los dos primeros parámetros principales corresponden al 68,30% de la información total que aportan los 10 electrodos (PC1=44,54% y PC2=23,76%). Este porcentaje no es demasiado grande, lo que significa que hay poca correlación entre la información que aportan los distintos electrodos. Existe aproximadamente un 32% de la información que no está reflejada en la gráfica bidimensional. Si se representa una gráfica tridimensional con los tres primeros parámetros principales, entonces se abarca un total del 78% de la información. El resultado corresponde con la **Figura 129**, y en ella se comprueba que las medidas de algunos días, que en la gráfica bidimensional aparecían muy juntos y que corresponden a días no consecutivos, el parámetro PC3 marca las diferencias. Este es el caso de los días 7 y 9, y de los días 2 y 4. De ahí que esta gráfica tridimensional ofrezca una mejor discriminación de las medidas de cada día.

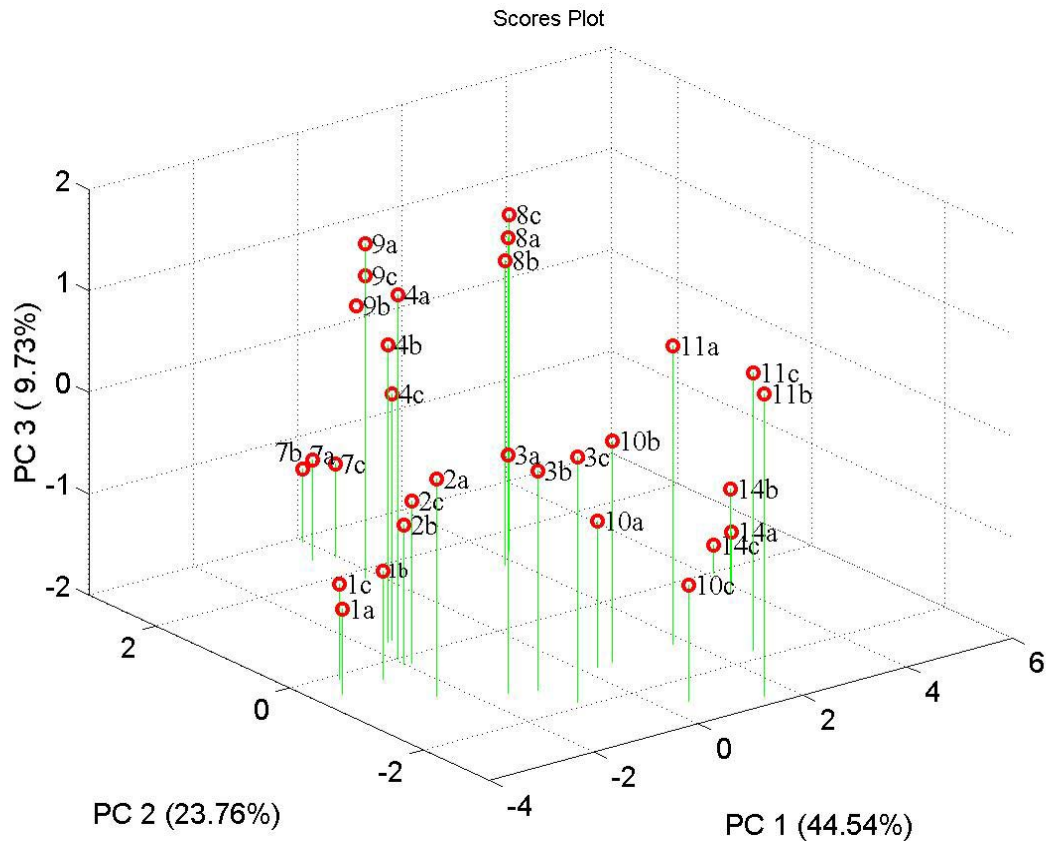


Figura 129. Resultados con los tres primeros parámetros principales

Otra información de interés del análisis PCA es el peso (load) de cada electrodo para el cálculo de los primeros Componentes Principales. El valor de los pesos se muestra en la Figura 130, donde se observa que hay bastante dispersión a lo largo de la figura, pero si se puede determinar una cierta agrupación de los dos electrodos de cobre y los de carbón. Es decir, que aunque los valores de potencial de estos materiales son distintos, existe una cierta proporcionalidad, lo que indica que la información que aportan es similar. También hay una cierta correlación de los electrodos de plomo y en cambio no la hay entre los electrodos de oro y plata. Estas conclusiones ya eran previsibles de una forma cualitativa al observar las gráficas de cada uno de los electrodos a lo largo del tiempo, pero por medio de los pesos del análisis PCA se obtiene una información más global y objetiva del comportamiento de cada electrodo.

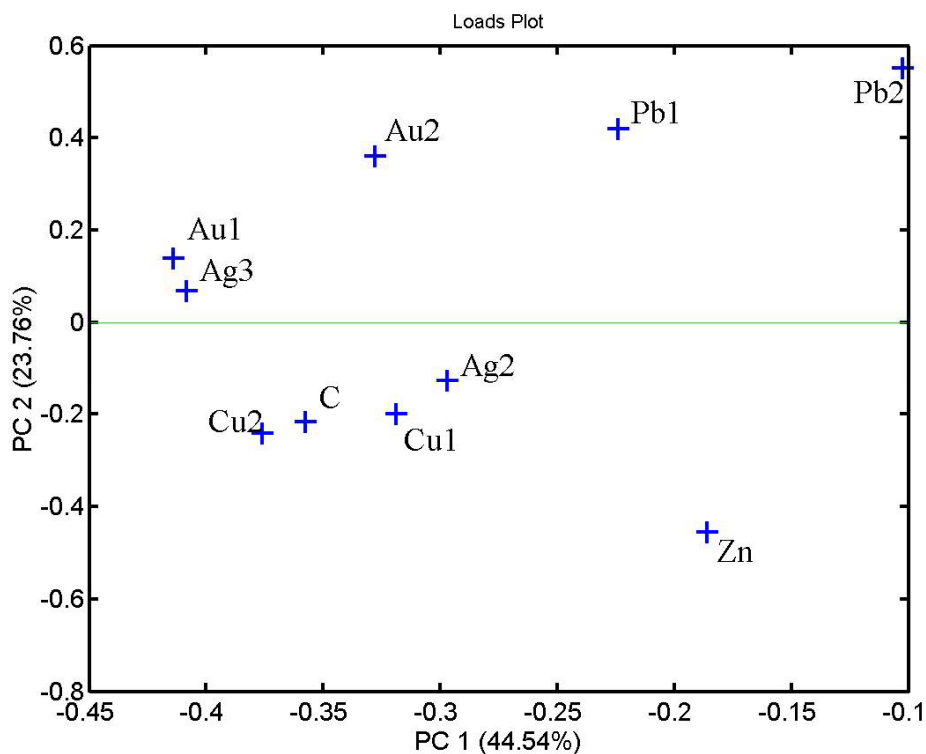


Figura 130. Pesos de cada electrodo en el análisis PCA

2.4 ANÁLISIS DE DERIVAS DE LOS ELECTRODOS

Como las medidas se realizaron a lo largo de un periodo de tiempo considerable (14 días), cabe pensar si la discriminación de las medidas por días es debido a posibles derivas de los electrodos a lo largo del tiempo y no a las variaciones de la naturaleza de las muestras a analizar. Porque uno de los principales problemas de las medidas potenciométricas es su posible falta de repetibilidad si no se utiliza un método de medida muy escrupuloso. Para disipar estas dudas y por experiencias de otras medidas anteriores, se efectuaron cada día de trabajo medidas para la calibración de los electrodos.

Si se realiza un análisis PCA con los datos conjuntos de las medidas con lomo y las medidas de calibración y se representan los dos primeros parámetros aparece la gráfica de la **Figura 131**

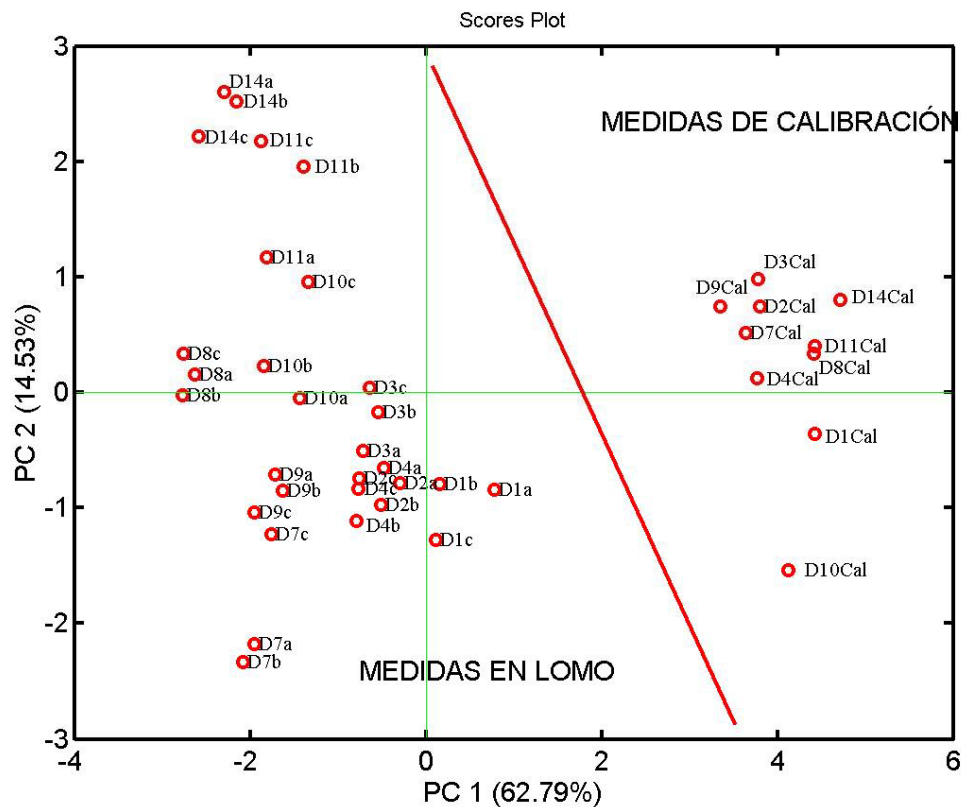


Figura 131. PCA de las medidas conjuntas de lomo y de calibración

Como se han mezclado en un mismo análisis las medidas con muestras de lomo y las medidas de calibración se puede observar una clara separación en dos bloques, a la derecha las de calibración y a la izquierda con lomo. Este hecho es muy lógico ya que las muestras son de naturaleza muy diferente y no es fácil relacionarlas. Además en la figura se puede observar que PC1 aporta un 62,79% de la información total de los electrodos y este parámetro es el que determinan la separación entre las muestras de lomo y las de calibración.

Para relacionar las medidas de calibración con las de lomo en una misma gráfica PCA es necesario realizar el denominado análisis **PCA supervisado**³⁶². Este método consiste en determinar las componentes principales utilizando única y exclusivamente un tipo de muestras, en nuestro caso con solo las medidas de lomo que corresponde con

³⁶² J. Brezmes. *Diseño de una nariz electrónica para la determinación no destructiva del grado de maduración de la fruta*. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Catalunya (2002).

las representadas en la **Figura 128**. Una vez determinadas las direcciones de máxima varianza, se proyectan tanto las medidas de lomo como las medidas de calibración sobre las dos primeras componentes principales (PC1 y PC2). En caso de que una medida de calibración coincida en la zona de la agrupación de las medidas de lomo de su correspondiente día significaría que exista una deriva del valor de los electrodos a lo largo del tiempo y la discriminación de las muestras es debida fundamentalmente a esa deriva. En cambio, si no existe una clara relación entre ambos tipos de muestras significa que la agrupación de las muestras no es debida a las derivas, aunque no excluye la existencia de las derivas en el caso de que las medidas de calibración no estén perfectamente agrupadas entre sí.

Realizando este método de análisis con todos los datos disponibles se obtiene la gráfica representada en la **Figura 132**, donde los puntos señalados con la letra *L* corresponde con medidas de lomo y los puntos señalados con *Cal* con las medidas de calibración

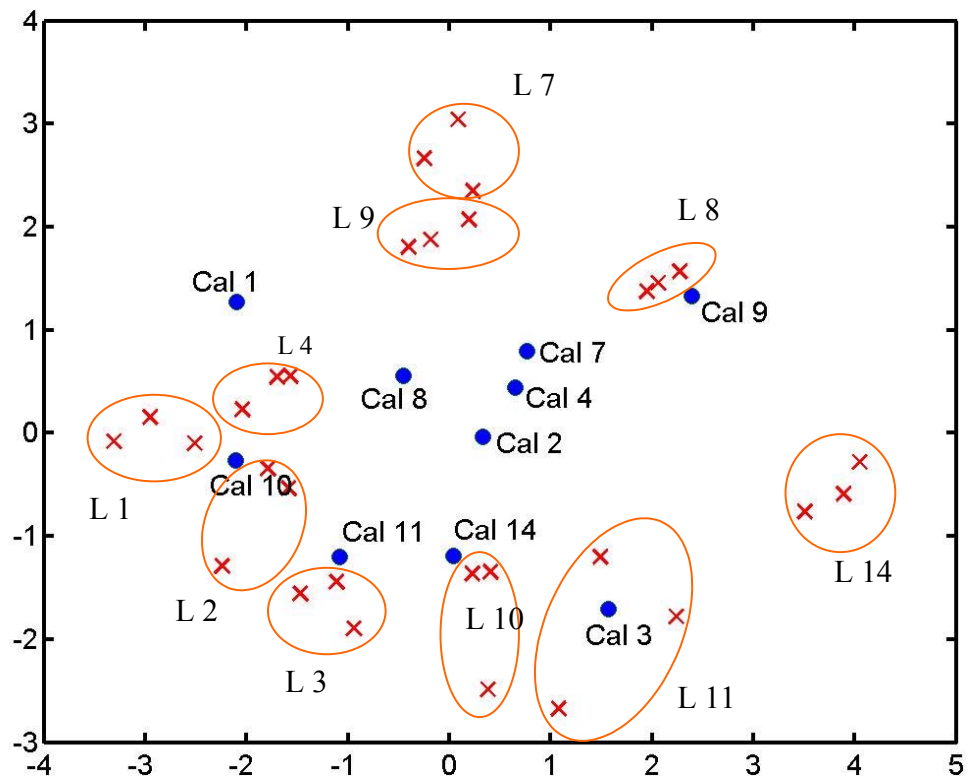


Figura 132. Medidas conjuntas de lomo y de calibración con análisis PCA en modo supervisado

Observando con detenimiento la figura se puede comprobar que no hay una relación entre las medidas de calibración con sus correspondientes medidas de lomo del mismo día. Existe una cierta deriva de las medidas de calibración porque no todas coinciden en la misma zona de la gráfica, pero tampoco se puede decir que la variación de las muestras de lomo a lo largo del tiempo es debido a la deriva de los electrodos.

Las variaciones de la señal potenciométrica de los electrodos con la carne de cerdo es menos evidente que con la del pescado, probablemente por la diferente composición química.

2.5 CLASIFICACIÓN DE LAS MEDIDAS

Con los mismos datos de las medidas de lomo se realiza un segundo tipo de análisis multivariante para poder clasificar dichas medidas según el número del día que estaba almacenada la muestra. Para conseguir esta clasificación se aplican redes neuronales artificiales para que, a partir de un vector de entrada, en nuestro caso las medidas de los 10 electrodos, sean capaces de averiguar a que grupo de salida pertenece, en nuestro caso el día de almacenamiento. Se aplican dos tipos de redes *Perceptron* y ARTMAP.

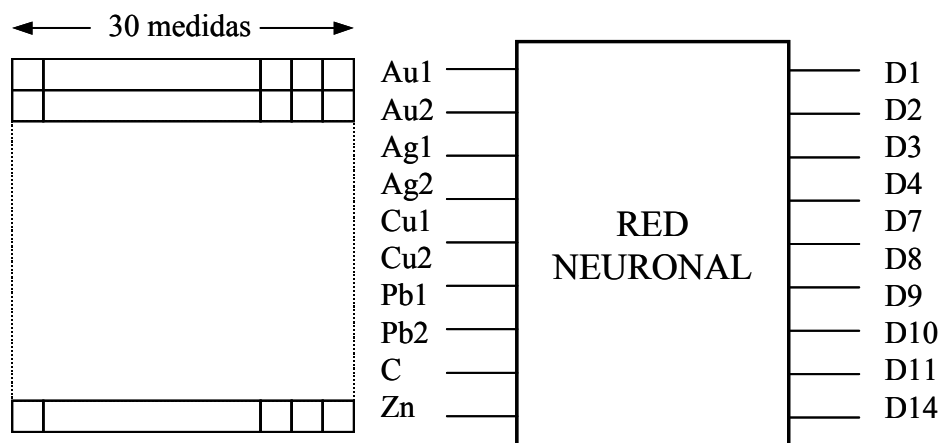


Figura 133. Esquema entradas y salidas de la red neuronal

2.5.1 APLICACIONES DE REDES NEURONALES PERCEPTRON (MLP)

La red MLP está formada por dos capas de neuronas, una oculta y otra de salida. La capa de oculta está formada por 10 neuronas y la de salida también por otras 10 neuronas.

Al igual que con las experiencias con pescado (capítulo 7), por medio del programa *MATLAB* y el programa anexo *Neural Networks Toolbox*, se desarrolla un algoritmo que constituye una red neuronal para la clasificación de las medidas con lomo.. La matriz de entrada son las 30 medidas de los 10 electrodos. El valor de cada salida es 1 cuando la salida tiene que estar activada según un determinado vector de entradas y 0 cuando no debe estar activado. Es decir, cada salida se activará (1) cuando se aplica a la entrada los vectores correspondientes a las medidas del día en cuestión, y no estará activada (0) en cualquier otro caso.

La función de transferencia de las neuronas es del tipo *logsig* y de forma similar a las experiencias con pescado (capítulo 7) se realiza una aproximación de los resultados a 1 ó 0. Aplicando el método de validación cruzada de orden 1 “*leave-one-out*” (capítulo 3) a la matriz de las 30 medidas se consigue 2 matrices, una con las salidas ideales (1 ó 0) y otra matriz con las salidas calculadas por la red neuronal.

Resultado con redes neuronales

La red neuronal con 10 salidas logra unos resultados y tasa de éxito total que varía según el día (desde el primero d1 al último d14) y el número de neuronas en la capa oculta. Las tasas de éxito se muestran en la Tabla 30. Es de destacar que el acierto total (columna Tot) no coincide siempre con la suma de aciertos parciales de cada día, sino que puede ser menor, porque hay ocasiones que la red genera dos o más 1 de salida. En este caso el éxito parcial se adjudica a cada día implicado pero no es éxito total. Este caso solo es cuando toda la combinación de resultados es igual al ideal.

Neuronas Capa oculta	d1	d2	d3	d4	d7	d8	d9	d10	d11	d12	Tot	%OK
8	2	1	1	3	3	2	3	3	3	2	22	73,33
10	2	1	3	3	2	3	2	3	1	3	20	66,66
12	2	1	1	3	3	3	3	3	3	3	22	73,33

Tabla 30. Resultados red neuronal MLP con 10 salidas

En ella se comprueba que las tasas de éxitos son en general, aceptables aunque durante los primeros días son bajas. Estos resultados bajos pueden ser debido a que se

exige mucha resolución a la red neuronal, porque con solo 30 medidas tiene que acertar sobre 10 posibles salidas.

Fijándose en la gráfica de las PCA se puede observar que si desea mejorar la red neuronal es conveniente agrupar las salidas, para así exigir menos resolución a la red. De esta forma los datos de los días 1,2,3 y 4 se agruparon en una salida, los datos de los días 7,8 y 9 en otra salida, los datos de los días 10 y 11 en otra y los datos del día 14 se dejan como están, es decir en total 4 salidas. Realizando el proceso de forma similar al anterior se obtiene los resultados de la **Tabla 31**.

Neuronas Capa Oculta	Días 1,2,3 y 4	Días 7,8 y 9	Días 10 y 11	Día 14	Total	%OK
8	10	9	5	3	25	83,33
10	10	9	6	1	24	80,0
12	10	8	5	3	25	83,33

Tabla 31. Resultados red neuronal MLP con 4 salidas

Se comprueba que hay una cierta mejora en la tasa de éxito en el acierto de los grupos de días, pero no demasiado espectacular. Es significativo el descenso de la agrupación de las medidas de los días 10 y 11, lo que significa que a pesar de la cercanía de los datos en la gráfica bidimensional de PCA, realmente no son muy similares entre si.

Con este tipo de redes neuronales se puede demostrar que es difícil obtener resultados satisfactorios con datos como los presentes, además de que necesitan gran cálculo computacional que hace que el proceso sea bastante lento.

2.5.2 Aplicación de la Red *Fuzzy Artmap* con las Medidas de Lomo

El mismo tipo de análisis que se ha realizado con redes neuronales de tipo *Perceptron* se ha llevado a cabo con una red neuronal de tipo ARTMAP. Este tipo de redes se entrenan de una forma rápida y eficiente. Cuando el número de muestras de entrenamiento para cada categoría es impar se comprueba que la red *Perceptron*

ocasiona problemas de velocidad y eficiencia, mientras que la red fuzzy ARTMAP no da problemas³⁶³.

Utilizando la técnica de entrenamiento y validación de *leave-one-out* de la misma forma que el análisis anterior y para un número de salidas de 10 que corresponde a las medidas de cada día por separado ó 4 cuando se toma en los mismos grupos que los señalados en la Tabla 31, se comprueba que se logran **una tasa de éxito del 100%**. Este resultado está en consonancia con el análisis PCA, donde se obtiene una buena separación entre las medidas de los distintos días en la gráfica de las dos primeras componentes principales. De esta forma se confirma que la lengua electrónica con los 10 electrodos es útil para discriminar las medidas realizadas en el lomo fresco a lo largo de 14 días.

2.6 CONCLUSIONES DE LAS EXPERIENCIAS CON LOMO FRESCO

Por medio de un sistema de lengua electrónica, formada por diversos electrodos metálicos trabajando de forma potenciométrica, se ha realizado un análisis de muestras de lomo fresco de cerdo a partir de diversas medidas a lo largo del tiempo. Con este método se comprueba si se puede detectar una variación del potencial de los electrodos, y que pueda utilizarse como un detector de la frescura de la carne. Las expectativas no eran demasiadas claras, ya que no hay demasiados antecedentes de medidas de este tipo con carne y se suponía que los cambios biológicos de la carne no producirían efectos sobre el potencial de los electrodos.

Los resultados de las medidas fueron coincidentes en parte con las expectativas porque no hubo grandes variaciones en las medidas, pero en cambio sí que se detectaron las suficientes diferencias entre las medidas de los distintos días para obtener, con la ayuda de técnicas de análisis multivariante, discriminación de las medidas de los distintos días.. También se ha realizado un análisis de clasificación utilizando redes neuronales artificiales, comprobando que para este caso funcionan mejor con redes resonantes adaptativas del tipo ARTMAP, con el se consigue un éxito del 100%.

³⁶³ G. Carpenter, S. Grossberg, N. Markuzon, J. Reynolds and D. Rosen, *Fuzzy ARTMAP: A neural network architecture for incremental supervised learning of analog multidimensional maps*, IEEE Transactions on Neural Networks, 3 (1992) 698-713.

3 MEDIDAS DE DIVERSOS TIPOS DE LOMO CURADO

La segunda parte de este capítulo está dedicada a exponer las experiencias con lomo curado, es decir carne cruda a la que se le añade un preparado denominado adobe formado por sal, pimentón y especias. El proceso de curado suele terminar con un proceso de oreo donde se produce una pérdida de agua. Originariamente el curado era un método de conservación de los alimentos porque la sal evita los procesos de putrefacción de la carne.

El Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPV está investigando en el desarrollo de productos de carne curada de cerdo donde el tipo de sal que se utiliza en la curación evita el NaCl para que de esta forma, pueda ser consumido por las personas hipertensas, ya que este tipo de sal es la más perjudicial para este tipo de patología, mientras que otros tipos de sal, como el KCl, Cl_2Ca y Cl_2Mg no son tan perjudiciales. Sin embargo no se puede sustituir totalmente el NaCl de los productos curados porque sino pierden sus características organolépticas, confiriéndoles un fuerte sabor amargo. Por este motivo, se han realizado curaciones de lomos de cerdo con diversas proporciones de distintas sales a los que se realizan exhaustivos análisis de naturaleza química, bioquímica, microbiológica, etc. Estos análisis están complementados con medidas potenciométricas.

El punto de partida son las experiencias que se exponen en el capítulo 5 de la presente memoria, donde se logra la discriminación de disoluciones con diversas mineralizaciones, tanto por la variedad de aniones como de cationes. En el caso que se presenta en este capítulo se trabaja sobre elementos sólidos y de constitución mucho más compleja por lo tanto las previsiones de lograr una buena discriminación son menores.

3.1 OBJETIVO

El objetivo de esta experiencia es la discriminación de diversas muestras de lomo curado por medio de un sistema de lengua electrónica formado por múltiples electrodos potenciométricos metálicos más otro electrodo de referencia, para ello se utilizaron 18 muestras, de 6 tipos de concentración de sal repetido tres veces.

<i>Muestras</i>	<i>Proporción de sales</i>
1,2 y 3	100% ClNa
4,5 y 6	50% ClNa + 50% ClK
7,8 y 9	65% ClNa + 35% ClK
10,11 y 12	75% ClNa + 25% ClK
13,14 y 15	45% ClNa + 25% ClK + 20% Cl ₂ Ca + 10% Cl ₂ Mg
16,17 y 18	55% ClNa + 25% ClK + 15% Cl ₂ Ca + 5% Cl ₂ Mg

Tabla 32. Proporción de sal de las muestras

3.2 SISTEMA DE MULTIELECTRODOS

Para realizar las medidas se utiliza el mismo sistema que para las medidas con lomo fresco, es sistema multielectrodo está formado por 14 electrodos de diversos materiales. En concreto, 3 electrodos de Au (3), Ag (3), Cu (2), C(2), Zn(2), Ni (1) y Pb(1). La longitud de cada uno de ellos es de unos 3 cm y de grosor variable según el material. Los electrodos están soldados a una placa de circuito impreso que sirve de soporte a todo el sistema y mediante el conector adecuado llevaba la señal a un sistema de acondicionamiento de la señal. El sistema de medida es similar al expuesto en el Anexo II de la presente memoria.

3.3 EXPERIENCIA

Se realizaron diversas medidas previas para la puesta en marcha del equipo de medida. Las experiencias definitivas consisten en 4 medidas con cada una de las 18 muestras, es decir un total de 72 medidas. Para realizar las medidas se punciona el conjunto de electrodos en la loncha de lomo curado, y se coloca el electrodo de referencia de forma que haga buen contacto. El muestreo se realiza a intervalos de 5 segundos durante aproximadamente 5 minutos, para así estabilizar el potencial de los electrodos. Después de cada medida los electrodos se limpian con agua destilada y etanol secándose cuidadosamente. También se limpia el electrodo de referencia. El orden de las medidas se realizó de forma aleatoria para evitar efectos de posibles derivas de las medidas de los electrodos a lo largo del tiempo. Los detalles de las experiencias son similares a la que se muestra en la **Figura 126**

3.4 RESULTADOS

Debido a que las muestras se diferencian solo por la concentración de sales y que todas las sales son de tipo cloruro, es decir con el mismo tipo de anión, variando solo el tipo de catión es previsible la dificultad en lograr la discriminación de las muestras con electrodos de naturaleza fundamentalmente metálica. No obstante, tal como se ha expuesto en el capítulo 5 de la presente memoria, ya se habían realizado experiencias previas en disoluciones acuosas salinas, en donde se comprobó que es posible discriminar cationes aunque con mayor dificultad que aniones.

De cada fichero con los resultados de las medidas se extrae un dato para cada electrodo. Con estas medidas se confecciona una tabla con las medidas de cada electrodo para cada medida, es decir una tabla de 14 columnas y 72 filas. Al realizar una representación gráfica de las medidas, mediante la hoja de cálculo *Excel*, se comprueba que es difícil observar una discriminación entre los distintos tipos de muestras, por lo que se plantea métodos que simplifiquen y resuman la información de los datos.

El primer método para resumir de la información consiste en trabajar con el valor medio de las medidas de los electrodos del mismo material, es decir se toma un dato de los 3 electrodos de Au, otro de los 3 electrodos de Ag, de forma similar de los 2 electrodos de Cu, C y, Zn y los electrodos solitarios de Pb y Ni. De esta forma la tabla queda resumida a 7 electrodos que corresponde a los 7 materiales utilizados (Au, Ag, Cu, C, Zn, Pb y Ni).

La segunda táctica consiste en agrupar las muestras con características más destacables ya que en algunas muestras la variación de sal es muy pequeña. De esta forma se escogen los datos de las muestras con características más extremas, es decir: 1, 2 y 3 (100 ClNa), 4, 5, 6 (50% ClNa y 50% ClK) y 13, 14 y 15 (45% ClNa + 25% ClK + 20% Cl₂Ca + 10% Cl₂Mg).

Por lo tanto la tabla de datos se resume a una cuarta parte de la anterior, es decir 7 columnas y 36 filas. Con esta tabla se aplica el Análisis de Componentes Principales (PCA) por medio de programa de análisis matricial *MATLAB* y con la herramienta anexa *PLS_Toolbox*. Y los resultados se muestran en la **Figura 134**.

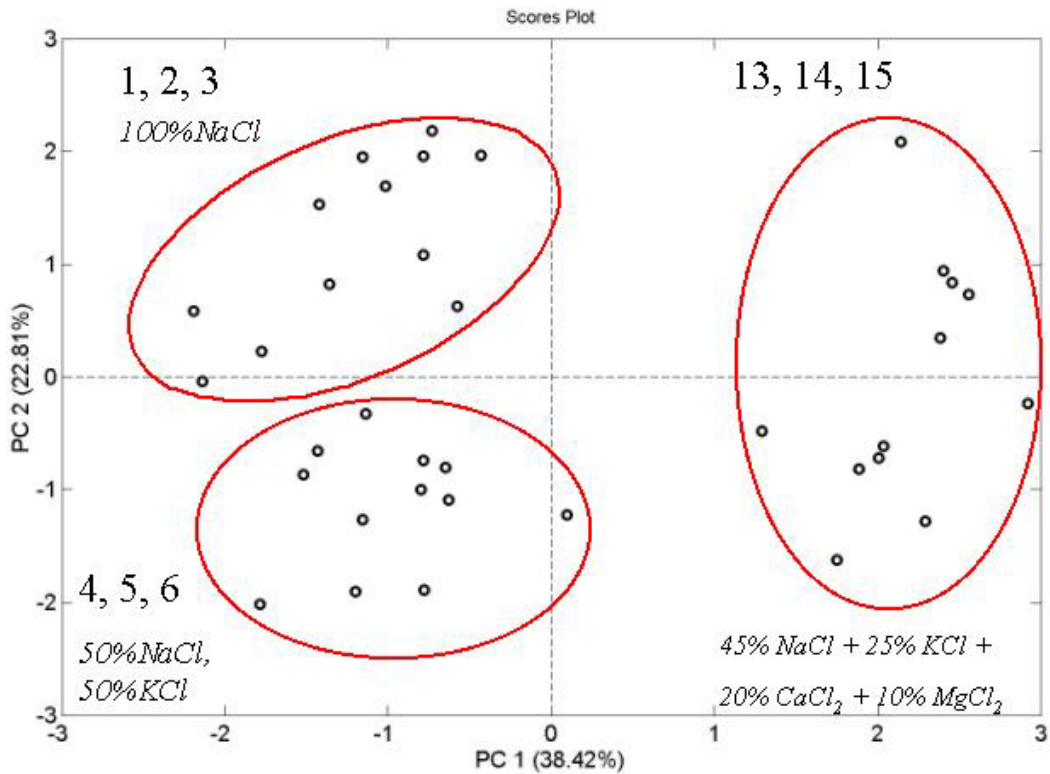


Figura 134. Gráfica de los Parámetros Principales

De la observación de la gráfica con los resultados del análisis PCA se puede sacar las siguientes conclusiones:

- Existe una discriminación de las medidas en tres agrupaciones, cada grupo abarca las muestras con las mismas características, por lo tanto hay 12 puntos en cada agrupación correspondiente a las 4 medidas de cada una de las 3 muestras. No se ha marcado cada una las muestras para que quede más clara la figura.
- La separación de las medidas correspondiente a las muestras 14, 15 y 16 es mayor y más clara que la del resto, con lo cual indica que con este sistema de medida es más fácil detectar la presencia sales de Ca^{+2} y Mg^{+2} , a pesar de su pequeña proporción en la mezcla.
- La separación entre las medidas correspondientes a las muestras 1, 2 y 3 y las muestras 4, 5 y 6 es evidente aunque pequeña. Es decir que a los electrodos les cuesta distinguir los compuestos de Na^+ y de K^+ , seguramente por su similar comportamiento electroquímico. En cambio el Ca^{+2} y el Mg^{+2} tienen un comportamiento electroquímico claramente diferente.

- La proporción de información que abarca cada uno de los parámetros principales es relativamente pequeña $PC1=38,42\%$ y $PC2=22,81\%$, es decir en esa gráfica se plasma el $61,23\%$ de la información total, a pesar que estamos trabajando con solo 7 electrodos. Este hecho indica que existe poca correlación entre la información que proporciona los distintos electrodos, es decir que son bastante independientes unos de otros.

Para comprender mejor el comportamiento de los distintos electrodos es interesante mostrar la gráfica con los pesos de cada uno de los electrodos en los valores de $PC1$ y $PC2$.

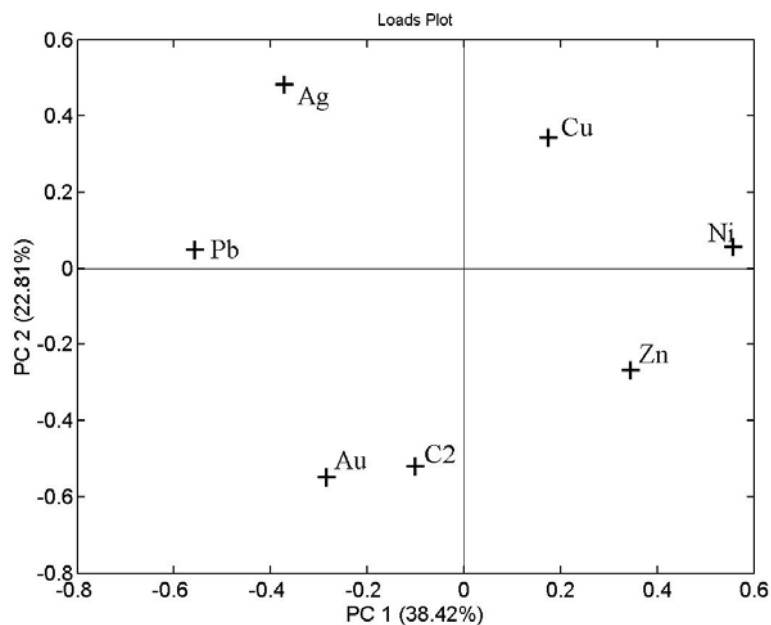


Figura 135. Peso de cada electrodo en el valor de parámetros principales

En la gráfica se observa que los electrodos de Ni y Pb se encuentran en los extremos derecho e izquierdo y determina mayoritariamente la variación de $PC1$ y además con antagónicos entre si. Comparando con la gráfica anterior (**Figura 134**) se comprueba que estos electrodos son los que más detectan a las muestras 13, 14 y 15, es decir aquellas que poseen $MgCl_2$ y $CaCl_2$. La discriminación $NaCl$ y KCl , es una combinación de C, Au y Ag.

Debido a que la gráfica bidimensional del análisis PCA posee un $61,23\%$ de la información y que la **Figura 134** no posee etiquetas en los datos por el elevado número de datos, es conveniente un análisis de **dendrograma**. En la Figura 136 se muestra los

resultados, donde se comprueba que los datos de con sales de Calcio (Ca1 a Ca12) forman una rama independiente respecto a las otras dos. Los otros dos grupos, sales de NaCl al 100% (Na1 al Na12) y NaCl al 50% y KCl al 50% (K1 al K12), la mayoría de están separadas, aunque hay algunas medidas en ramas erróneas.

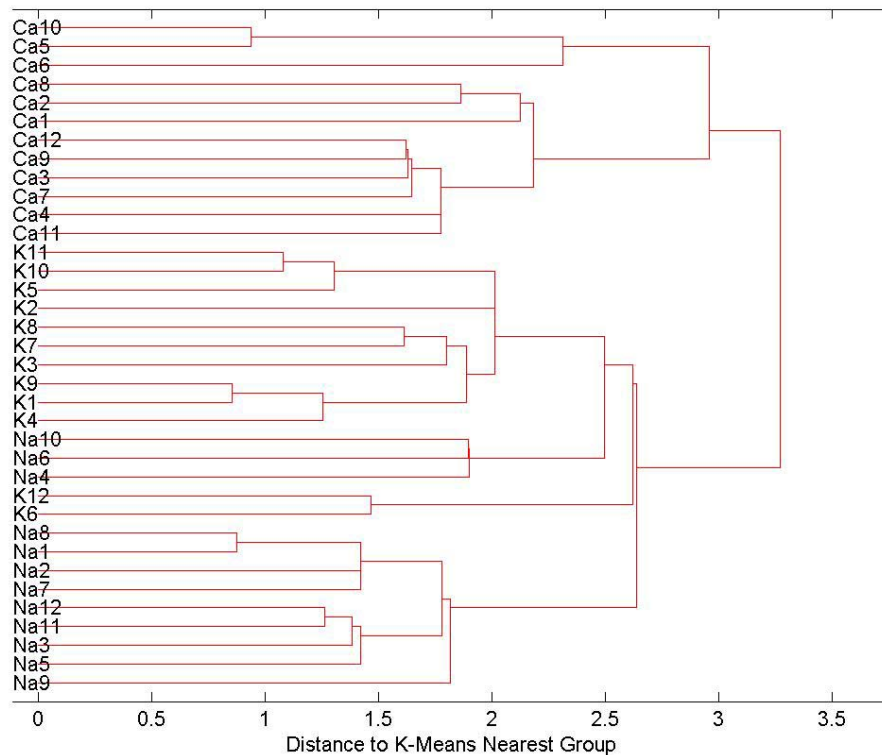


Figura 136. Dendrograma de los datos de lomo curado, utilizando la distancia K-Means

3.5 CONCLUSIÓN DE LAS MEDIDAS CON LOMO CURADO.

Dentro de los distintos tipos de análisis que se realizan a los lomos curados con distintos tipos de sal y en distinta concentración, se ha presentado un análisis por medio de sistema de lengua electrónica. Por medio de diversos electrodos inespecíficos y con la ayuda de métodos de análisis multivariante se han realizado diversas medidas a distintas muestras de lomo curado. A pesar de que la diferencia de las muestras es bastante sutil, debido a que las sales se diferencian por sus cationes y que es más difícil la detección con electrodos potenciométricos metálicos de los cationes que aniones, se ha logrado una discriminación de tres tipos de muestras.

Capítulo 9. Conclusiones

A lo largo de esta memoria se han expuesto las distintas etapas desarrolladas en la tesis doctoral, de las cuales se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1^a) Se ha planificado un sistema de lengua electrónica que utiliza electrodos metálicos y óxidos metálicos, tanto en forma de material puro como en forma de tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*) para la construcción de multisensores. Con este método se logran dispositivos con características de sencillez de construcción, robustez mecánica, fácil manejo y bajo costo. Todo ello con una precisión y fiabilidad aceptable gracias al manejo de técnicas multivariantes de reconocimiento de patrones.

2^a) Se ha construido un equipo de medida para poder realizar las experiencias. Este sistema permite la acogida de múltiples sensores, el acondicionamiento de la débil señal generada por los sensores potenciométricos y su adquisición por medio de un ordenador personal para el análisis de los datos procedentes de las medidas.

3^a) Las primeras experiencias se utilizaron muestras de aguas naturales. Se ha realizado análisis de varios tipos de aguas envasadas y de suministro urbano. Por medio de técnicas de análisis multivariante se han realizado diversos análisis de los datos. Así, se logró una buena discriminación de las muestras por medio de Análisis de Componentes Principales (PCA). Por medio de redes neuronales artificiales se logró una clasificación de las muestras, comprobado que la red de tipo Fuzzy Artmap consigue resultados mejores que con los de tipo Perceptron y con un costo computacional menor. Por medio de técnicas PLS (*Partial Least Square*) se ha predicho la concentración de los iones presentes en esas aguas.

4^o) Las experiencias con disoluciones acuosas continuaron con otras experiencias con disoluciones artificiales para lograr la discriminación de dichas disoluciones según el tipo de anión o de catión, concluyendo que es más fácil la discriminación de las disoluciones con distintos anión que con distinto catión, tanto en disoluciones puras como en compuestas.

5ª) Se ha experimentado con muestras líquidas de naturaleza más compleja que el agua, como es el vino. Este tipo de muestras se prestan a ser analizadas por sistemas de lenguas electrónicas porque están formadas por una gran cantidad de componentes, algunos en proporción elevada como es el agua y el alcohol, pero otros en pequeña proporción que son los que proporcionan las características organolépticas del vino. Las experiencias se realizaron primero con vinos comerciales de distinto tipo y tonalidad, logrando una buena discriminación de las diferentes muestras.

6º) Se ha desarrollado un sistema de detección de volátiles por medio de sensores potenciométricos, para así obtener un sistema de nariz electrónica húmeda. Este sistema se probó en primer lugar con muestras con características de emisión de volátiles muy distintas como son el vinagre, comprobando que algunos electrodos lo pueden detectar fácilmente y posteriormente con vinos comerciales. La experiencia final consistió en una combinación de la nariz electrónica y lengua electrónica para la detección del deterioro del vino cuando está mucho tiempo en contacto con el aire. Las medidas se realizaron durante un tiempo considerable (48 días) complementado con la medida de la acidez mediante métodos químicos convencionales. Mediante este último método solo se logra detectar las últimas fases del deterioro debido a un gran aumento de la acidez por el aumento del ácido acético que produce el “picado” del vino. La combinación de los sistemas de nariz y lengua electrónica también se logra una discriminación de los restantes días, probablemente por la modificación de otros componentes del vino que no producen aumento de la acidez que el conjunto de ambos sistemas es capaz de detectar.

7º) Se ha trabajado con muestras de alimentos sólidos pero con gran proporción de agua, como son la carne y el pescado. En el caso del pescado se realizó múltiples experiencias con varios tipos de electrodos metálicos. Las primeras experiencias se realizaron en modo continuo, comprobando que el potencial generado por los electrodos con el paso del tiempo, y por consiguiente con el deterioro del pescado, es variable pero continuo. Las experiencias siguientes se realizaron de modo discreto, es decir una tanda de medidas cada día, comprobando que los electrodos que mejor comportamiento ofrecen son los de oro y plata. Las medidas potenciométricas se acompañaron de experiencias bioquímicas y microbianas, lo que permite realizar una correlación entre ambos tipos de experiencias. Por último se realizó una serie de análisis con redes

neuronales obtener un sistema que puede ofrece un análisis cualitativo del estado de conservación en tres posibles estados: Apto, Dudoso y no Apto.

8º) Las experiencias con carnes se concretaron en el análisis de lomo de cerdo. Por un lado, también se realizaron experiencias para determinar si un sistema multielectrodo formado por múltiples metales es capaz de detectar el deterioro de la carne con el paso del tiempo pero de forma menos evidente que en el pescado. Un segundo tipo de análisis consistió en lograr una discriminación de diversas piezas de lomo curado de cerdo. Estas piezas se diferenciaban entre si por la distinta composición de sales, tanto de NaCl como es el más habitual en el consumo, como KCl, y CaCl₂.

Por lo tanto, el desarrollo de los sistemas de lengua y nariz electrónica que se presenta en esta memoria puede mejorar el control de calidad de las muestras analizadas, con buenas perspectivas de aplicación en múltiples campos económicos, sobretodo en la industria alimentaria.

1 PRODUCCIÓN CIENTÍFICA: PATENTES, PUBLICACIONES, CONGRESOS Y PROYECTOS.

Como consecuencia de los trabajos relacionados con esta tesis doctoral o relacionada con ella se ha generado una producción científica que se plasma en forma de patentes, publicaciones, presentaciones en congresos científicos y proyectos de investigación financiados con fondos de instituciones públicas o privadas.

1.1 PATENTES

♦ **Inventores** (p.o. de firma): Martínez Máñez, Ramón; Soto Camino, Juan; Garcia Breijo, Eduardo; Ibáñez Civera, Javier; Gil Sánchez, Luis

Título: *Multisensor integrado para la determinación de parametros físico-químicos de efluentes líquidos*

Nº de solicitud: P200500246

País de prioridad: España

Fecha de solicitud: 2-02-2004

Entidad titular: UNIVERSIDAD POLITECNICA DE VALENCIA

1.2 PUBLICACIONES

- 1) **Autores:** Ramón Martínez-Mañez, Juan Soto, Eduardo García-Breijo, Luis Gil, Javier Ibáñez y Elena Gadea
Título: *A multisensor in thick-film technology for water quality control.*
Revista: Sensors and Actuators A-Physical
Volumen: 120 **Año:** 2005 **Pag Inicial:** 589 **Pag. Final:** 595

- 3) **Autores:** Beatriz García Acosta; Eduardo Garcia-Breijo; Felix Sancenón; Juan Soto; Luis Gil Sánchez; Ramón Martínez Mañez; Xavier Albiach-Marti
Título: *Coordinative and electrostatic forces in action: from the desing of differential chromogenic anion sensors to selective carboxylate recognition.*
Revista: CHEMICAL COMMUNICATIONS - 1359-7345
Volumen: **Año:** 2004 **Pag Inicial:** 774 **Pag. Final:** 775

- 4) **Autores:** Ramón Martínez Mañez, Juan Soto Camino, Eduardo García Breijo, Luis Gil Sánchez, Javier Ibáñez Civera, Eduard Llobet Valero.
Título: *An "electronic tongue" design for the qualitative analysis of natural waters.*
Revista: Sensors and Actuators B Chemical - 0925-4005
Volumen: 104 **Año:** 2005 **Pag Inicial:** 303 **Pag. Final:** 305

- 5) **Autores:** Luis Gil Sánchez, Eduardo Garcia Breijo, Javier Ibáñez Civera, Roberto H. Labrador, Eduard Llobet Valero, Ramón Martínez Mañez, Juan Soto Camino.
Título: *Electronic Tongue for Qualitative Analysis of Aqueous Solutions of Salts using Thick-Film Technology and Metal Electrodes.*
Revista: Sensors
Volumen: 9 **Año:** 2006 **Pag Inicial:** 1128 **Pag. Final:** 1138

- 6) **Autores:** Juan Soto, Roberto H. Labrador, María D. Marcos, Ramón Martínez-Mañez, Carmen Coll, Eduardo García-Breijo, Luis Gil
Título: *Introduction of a model for describing the redox potential in faradic electrodes*
Revista: Journal of Electroanalytical Chemistry
Volumen: 594 **Año:** 2006 **Pag Inicial:** 96 **Pag. Final:** 104

- 7) **Autores:** Beatriz García-Acosta, Ramón Martínez-Máñez, Félix Sancenón, Juan Soto, Knut Rurack, Monika Spieles, Eduardo García-Breijo, Luis Gil
Título: *Ditopic N-Crowned 4-(p-Aminophenyl)-2,6-diphenylpyridines: Implications of Macrocycle Topology on the Spectroscopic Properties, Cation Complexation, and Differential Anion Responses*
Revista: Inorganic Chemistry
Volumen: 46 **Año:** 2007 **Pag Inicial:** 3123 **Pag. Final:** 3135
- 8) **Autores:** Juan Soto, Roberto H. Labrador, M.D. Marcos, Ramón Martínez-Máñez, Carmen Coll, Eduardo García-Breijo, Luis Gil
Título: *A model for the assessment of interfering processes in faradic electrodes*
Revista: Sensors and Actuators A: Physical
Volumen: En Prensa **Año:** 2007 **Pag Inicial:** **Pag. Final:**

1.3 CONGRESOS

- 1) **Congreso:** Seminario Anual de Automática, Electrónica Industrial e Instrumentación (SAAEI)
Edición: SAAEI'01
Título: *MULTISENSOR EN CAPA GRUESA PARA LA DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE CALIDAD DEL AGUA*
I.S.B.N. 84-699-3676-0
Editorial UPC – Editor A. Manuel Lázaro.
Fecha: 17/09/2001 **Lugar:** Matanzas (Cuba)
Tipos participación: Resumen de comunicación póster
Tipo Congreso: Nacional con actas
Autores: Eduardo Garcia Breijo, Javier Ibáñez Civera, Luis Gil Sánchez, Ramón Martínez Máñez, M^a Jesús Seguí Roselló, Josefa Lizondo Sabater, Juan Soto Camino.
- 2) **Congreso:** Seminario Anual de Automática, Electrónica Industrial e Instrumentación (SAAEI)
Edición: SAAEI'01
Título: *SENSOR DE PH A BASE DE PASTAS RESISTIVAS PARA CAPA GRUESA*

I.S.B.N. 84-699-3676-0

Editorial UPC – Editor A. Manuel Lázaro.

Fecha: 17/09/2001 **Lugar:** Matanzas (Cuba)

Tipos participación: Resumen de comunicación póster

Tipo Congreso: Nacional con actas

Autores: Eduardo Garcia Breijo, Luis Gil Sánchez, Javier Ibáñez Civera, M^a Auxiliadora Recasens Bellver, Juan Soto Camino, Juan, M^a Jesús Seguí Roselló, Josefa Lizondo Sabater, Ramón Martínez Máñez.

- 3) **Congreso:** Proceeding of the 4th European Workshop on Microelectronics Education (EWME)

Edición: EWME'02

Título: *MULTIMEDIA PRESENTATION OF THE UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA THICK-FILM HYBRIDS MICROELECTRONICS LABORATORY: TEACHING AND RESEARCH.*

I.S.B.N. 84-267-1325-4

Editorial Marcombo, Boixareu Editores.

Fecha: 23/03/2002 **Lugar:** Vigo (España)

Tipos participación: Resumen de comunicación póster.

Tipo Congreso: Internacional con actas.

Autores: Eduardo Garcia Breijo, Luis Gil Sánchez, Javier Ibáñez Civera, Fernando Tamarit Peris.

- 4) **Congreso:** 28th Annual Conference of the IEEE Industrial Electronics Society.

Edición: IECON'02

Título: *THICK-FILM MULTISENSOR FOR DETERMINING WATER QUALITY PARAMETERS*

I.S.B.N. 84-813-8513-1

Fecha: 5/09/02 **Lugar:** Sevilla

Tipos participación: Resumen de comunicación póster.

Tipo Congreso: Internacional con Actas.

Autores: Eduardo Garcia Breijo, Javier Ibáñez Civera, Luis Gil Sánchez, Álvaro Tormos Ferrando, Gema Prats Boluda.

- 5) **Congreso:** Seminario Anual de Automática, Electrónica Industrial e Instrumentación (SAAEI).

Edición: SAAEI'02

Título: *SISTEMA DE MEDIDA DE LA CONTAMINACIÓN ORGÁNICA DE AGUAS*

I.S.B.N. 84-813-8513-1

Editorial Servicio de Publicaciones de la Univ. Alcalá.

Fecha: 2002 **Lugar:** Alcalá de Henares

Tipos participación: Resumen de comunicación póster

Tipo Congreso: Nacional con Actas

Autores: Eduardo Garcia Breijo, Luis Gil Sánchez, Javier Ibáñez Civera, Álvaro Tormos Ferrando, Bernabé Mari Soucase.

- 6) **Congreso:** VI Congreso de Tecnologías Aplicadas a la Enseñanza de la Electrónica

Edición: TAEE 2004

Título: *CURSO MULTIMEDIA DE LA TECNOLOGÍA DE CIRCUITOS HÍBRIDOS DE CAPA GRUESA*

Fecha: 2004 **Lugar:** Valencia

Tipos participación: Resumen de comunicación póster

Tipo Congreso: Nacional con Actas

Autores: Elena Gadea Morant, Eduardo Garcia Breijo, Luis Gil Sánchez; Javier Ibáñez Civera, Álvaro Tormos Ferrando.

- 7) **Congreso:** IX Simposio Latinoamericano de Polímeros y VII Congreso Iberoamericano de Polímeros

Edición: SLAP2004

Título: *PREPARACIÓN DE NUEVOS ELECTRODOS SELECTIVOS CON MEMBRANAS POLIMÉRICAS*

Fecha: 2004 **Lugar:** Valencia (España)

Tipos participación: Resumen de comunicación póster

Autores: Eduardo Garcia, Luis Gil, Josefa Lizondo, Ramón Martínez Mañez, M^a Jesus Seguí, Juan Soto, Isabel Alcaina.

- 8) **Congreso:** V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química
Título: *MULTISENSOR PARA MEDIDAS DE LA CALIDAD DEL AGUA EN TECNOLOGÍA THICK-FILM*
Fecha: 2004 **Lugar:** La Habana (Cuba)
Tipos participación: Resumen de comunicación póster
Tipo Congreso: Internacional con Actas
Autores: Teresa Pardo; Ramón Martínez Mañez; Juan Soto; Eduardo García; Luis Gil; Javier Ibanez; Elena Gadea
- 9) **Congreso:** V Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química
Título: *DETERMINACIÓN DE OXIGENO DISUELTO POR MEDIO DE UN SENSOR EN TECNOLOGÍA THICK-FILM*
Fecha: 2004 **Lugar:** La Habana (Cuba)
Tipos participación: Resumen de comunicación póster
Tipo Congreso: Internacional con Actas
Autores: Teresa Pardo; Ramón Martínez Mañez; Juan Soto; Josefa Lizondo; Eduardo García; Luis Gil; Javier Ibañez
- 10) **Congreso:** Conferencia de Dispositivos Electrónicas
Edición: CDE – 2005
Título: *POTENTIOMETRIC DISSOLVED OXYGEN SENSORS WITH REFERENCE*
Fecha: Febrero 2005 **Lugar:** Tarragona
Tipos participación: Resumen de comunicación póster
Tipo Congreso: Internacional con Actas
Autores: Ramón Martínez Mañez, Juan Soto Camino, Eduardo García Breijo, Luis Gil Sánchez, Javier Ibañez Civera, Elena Gadea Morant.
- 11) **Congreso:** Conferencia de Dispositivos Electrónicas
Edición: CDE – 2005
Título: *SYSTEM FOR DETERMINING WATER QUALITY WITH THICK-FILM MULTISENSOR*
Fecha: Febrero 2005 **Lugar:** Tarragona
Tipos participación: Resumen de comunicación póster

Tipo Congreso: Internacional con Actas

Autores: Ramón Martínez Máñez, Juan Soto Camino, Luis Gil Sánchez, Eduardo Garcia Breijo, Javier Ibáñez Civera, Elena Gadea Morant.

12) **Congreso:** International Symposium on Olfaction and Electronic Nose

Edición: ISOEN – 2005

Título: *ELECTRONIC TONGUE FOR QUALITATIVE ANALYSIS OF WATERS USING THICK-FILM TECHNOLOGY.*

Fecha: 13 a 15 Abril 2005. **Lugar:** Barcelona

Tipos participación: Resumen de comunicación póster.

Tipo Congreso: Internacional con Actas.

Autores: Ramón Martínez Máñez, Juan Soto, Luis Gil Sánchez, Eduardo Garcia Breijo, Javier Ibáñez Civera, Elena Gadea Morant, Eduard Llobet Valero.

13) **Congreso:** 8th FIGIPAS meeting in Inorganic Chemistry.

Título: *POTENTIOMETRIC CHARACTERIZATION OF A THICK FILM ELECTRODE OF RuO₂ RESISTIVE PASTE AS pH SENSOR.*

Fecha: Julio 2005 **Lugar:** Atenas (Grecia)

Tipos participación: Resumen de comunicación póster.

Tipo Congreso: Internacional con Actas.

Autores: Roberto. H. Labrador; Juan Soto; Ramón Martínez Máñez; Carmen Coll; Eduardo Garcia-Breijo; Luis Gil.

14) **Congreso :** V Jornadas de Investigación en Ciencia e Ingeniería de Alimentos.

Título: *ESTUDIO DEL SEGUIMIENTO DE LA FRESCURA DE PESCADO MEDIANTE EL EMPLEO DE UNA LENGUA ELECTRÓNICA.*

Fecha: 2005 **Lugar:** Valencia.

Tipos participación: Ponencias

Autores: Jose M. Barat, Isabel Escriche, Luis Gil Sánchez, M C Aristoy, Fidel Toldrá.

15) **Congreso:** Eurosenors - 2006

Título: Detection of wine spoilage by electronic tongue and nose.

Fecha: 13 a 15 Septiembre 2006 **Lugar:** Göteborg (Suecia)

Tipos participación: Resumen de comunicación póster.

Tipo Congreso: Internacional con Actas.

Autores: Ramón Martínez Mañez, Juan Soto, Luis Gil Sánchez, Eduardo Garcia Breijo, Javier Ibáñez Civera, Elena Gadea Morant, Eduard Llobet Valero.

16) **Congreso:** Eurosensors - 2006

Título: A model for the assessment of interfering processes in faradic electrodes.

Fecha: 13 a 15 Septiembre 2006 **Lugar:** Göteborg (Suecia)

Tipos participación: Resumen de comunicación póster.

Tipo Congreso: Internacional con Actas.

Autores: R. Labrador Montero, Juan Soto Camino, M^a D. Marcos Martinez, Ramón Martínez-Mañez, Carmen Coll Merino, E Garcia Breijo, Luis Gil Sánchez.

1.4 PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

3) **Título del proyecto: Desarrollo de sistemas para el reconocimiento, determinación y monitorización de especies de interés medio ambiental.**

Construcción de un equipo de monitorización ambiental.

Entidad financiadora: **MINISTERIO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA. D.G. DE INVESTIGACION.**

Entidades participantes: **Universidad Politécnica de Valencia**

Duración, desde: **02-DEC-02 hasta: 02-DEC-05**

Cuantía de la subvención: **87.400€**

Investigador responsable: **Soto Camino, Juan**

Número de investigadores participantes: **10**

5) **Título del proyecto: Diseño de tinta serigráfica electroluminiscente para la determinación de la contaminación orgánica de aguas.**

Entidad financiadora: **UPV. VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACION.**

Entidades participantes: **Universidad Politécnica de Valencia.**

Duración, desde: **01-DEC-01 hasta: 01-DEC-03**

Cuantía de la subvención: **15.699,61€**

Investigador responsable: **Garcia Breijo, Eduardo**

Número de investigadores participantes: **3**

- 6) Título del proyecto: **Sistema de adquisición y control para la determinación de la calidad del agua por parámetros difusos.**

Entidad financiadora: **UPV. VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACION.**

Entidades participantes: **Universidad Politécnica de Valencia**

Duración, desde: **01-SEP-01** hasta: **01-SEP-03**

Cuantía de la subvención: **18.030€**

Investigador responsable: **Martínez Máñez, Ramón**

Número de investigadores participantes: **15**

Capítulo 10. Líneas Futuras

Durante el desarrollo de este trabajo se han ido abriendo líneas de investigación que por su extensión han quedado fuera del contexto de esta tesis, pero que son de interés para futuras investigaciones. Entre ellas cabe destacar las siguientes:

1 PASTAS PROPIAS PARA TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA (*Thick-Film*)

En las experiencias de esta tesis se han utilizado electrodos con tecnología de capa gruesa empleado pastas comerciales. Estas pastas se fabrican y comercializan para la construcción de circuitos electrónicos híbridos, donde en un mismo sustrato aislante se incorporan componentes electrónicos activos, conectados con técnicas de montaje superficial, y componentes electrónicos pasivos (resistencias, condensadores, conexiones eléctricas) formados por pistas de pastas con característica resistiva, conductora o dieléctrica.

Este tipo de pastas comerciales están formadas por algunos compuestos químicos activos y otros compuestos aglutinantes. Pero los fabricantes de las pastas no suelen facilitar el contenido exacto de las mismas, y por lo tanto no es posible saber como pueden afectar cada pasta a los valores de potencial de los sensores fabricados con ellas. Se puede determinar el porcentaje de cada uno de los elementos químicos simples mediante análisis de espectros realizado con microscopio electrónico. En el capítulo 7 (análisis del pescado) se presenta una tabla con el porcentaje de los principales elementos de los sensores empleados en esas experiencias.

Para futuras experiencias con electrodos en tecnología de capa gruesa (*Thick-Film*) es deseable la creación de pastas serigráficas propias, con los compuestos químicos adecuados y en cantidad prefijada para cada aplicación. Para ello, es necesario conocer las características de estas pastas, sus constituyentes y su fabricación

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS PASTAS DE TECNOLOGÍA DE CAPA GRUESA

Las pastas para la tecnología de capa gruesa están formadas fundamentalmente por dos grupos de constituyentes. El primer grupo corresponde a los componentes que permanecerán en el producto final después de los procesos de quemado a alta temperatura, y está formado básicamente por polvos de tierras inorgánicas, que suelen incluir a vidrios para formar un agente vidriado (“pastas fritadas”).

El segundo tipo de constituyentes está formado por las sustancias que confiere las características reológicas a la pasta para poder realizar el proceso de impresión serigráfica. En este proceso se requiere que las pastas posean una viscosidad determinada. Por un lado, debe ser lo suficientemente fluida para que pueda traspasar la tela serigráfica al paso de la rasqueta, pero también debe tener la viscosidad suficiente para que no se derrame la pasta por la placa.

1.1.1 Fabricación de Pastas

Las pastas que contienen vidrio se denominan “frita” y están formadas por tintas a las que se le añaden vidrio en polvo muy fino. Durante el ciclo de quemado se produce dos procesos, al principio se sinteriza y finalmente se funden a la temperatura de pico. La función de la fase de vidrio difiere según los diferentes tipos de film. Una pasta fritada típica contiene una serie constituyentes similares a los indicados en la **Tabla 33**

<i>Componente</i>	<i>Constituyente</i>
Solvente a baja presión de vapor	Terpinol
Agente aglutinante	Etil-celulosa (quemado en aire) Alcohol polivinilo (quemado en N ₂)
Frita (polvo de vidrio)	Vidrio Plomo borosilicato
“Pigmento” (agente activo eléctricamente)	Metales preciosos, óxidos, cerámicas, vidrios,

Tabla 33. Composición de una pasta de capa gruesa fritada³⁶⁴.

³⁶⁴ K. Pitt. *An Introduction to Thick Film Component Technology*. Mackintosh (1981)

Bajo estas indicaciones, una línea futura de investigación es la adquisición de las materias primas y las herramientas necesarias para la fabricación de las pastas necesarias con características adecuadas a la aplicación a realizar.

2 OTROS TIPOS DE SENSORES

Los sensores utilizados en esta tesis están formados por metales u óxidos metálicos. Aunque se ha comprobado su utilidad en las aplicaciones presentadas, también se han manifestado algunos inconvenientes debido a la falta de repetibilidad, que sería deseable de mejorar. Para ello, se puede usar otros tipos de sensores, que no han sido utilizados en lenguas electrónicas, como las monocapas auto-ensambladas (SAM- *Self Assembled Monolayers*). Existe la posibilidad de enclavar en la superficie de algunos metales, sobretodo el oro, con moléculas en forma de cadena, con anclaje de azufre, que son capaces de generar un determinado potencial en función del medio en que se encuentran. Este proceso se ha utilizado de forma natural en las experiencias de esta tesis con patrones de cisteína sobre electrodos de oro y plata.

2.1 DESARROLLO DE MONOCAPAS AUTOENSAMBLADAS (SAMs).

Desde la primera demostración de la formación de monocapas³⁶⁵ en 1946 se ha descrito un largo número de combinaciones que dan lugar a la formación de monocapas auto-ensambladas, que básicamente incluyen: compuestos conteniendo sulfuro en superficies de oro, silanos anclados a vidrio y ácidos carboxílicos sobre superficies de óxidos metálicos. Aparte de los aspectos fundamentales de comprensión de los procesos de auto-ensamblaje, las monocapas auto-ensambladas son interesantes como sistemas para el desarrollo de superficies con propiedades moleculares modulables lo que hace éste sea un tema de interés en la Química Supramolecular. Así, la posibilidad de crear monocapas con moléculas con propiedades ópticas, eléctricas o químicas abre la posibilidad de diseñar sistemas optoelectrónicos capaces, por ejemplo, de actuar como sensores.

³⁶⁵ W.C. Bigelow, D.L. Pickett, W.A. Zisman, J. Colloid Interface Sci. 1946, 1, 513.

3 VOLTAMETRÍA CÍCLICA

En esta tesis doctoral se ha empleado técnicas potenciométricas para realizar las distintas experiencias. Esta técnica tiene la ventaja de ser cómoda, de fácil utilización y necesitar equipo sencillo y económico, pero también se experimentan algunos problemas por falta repetibilidad. Se han presentado múltiples experiencias por diversos grupos de investigación que utilizan técnicas voltamétricas para crear lenguas electrónicas, entre ellos con electrodos metálicos en forma de varilla con diversos materiales³⁶⁶, pero no hay precedentes, que se sepa, del uso de la tecnología de capa gruesa para construir electrodos para técnicas voltamétricas. Con este método se obtendría un multisensor de tamaño miniaturizado.

Para desarrollar esta línea de investigación se están realizando medidas de un equipo de medida de marca AUTOLAB que se muestra en la **Figura 137** con electrodos de oro, platino y parbón (**Figura 138**). A estos electrodos se pueden añadir electrodos de construcción propia.



Figura 137 Equipo de voltametría AUTOLAB

³⁶⁶ P. Wide, F. Winqvist, Pontus Bergsten, E. M. Petriu. *The Human-Based Multisensor Fusion Method for Artificial Nose and Tongue Sensor Data*. IEEE Transactions On Instrumentation And Measurement, 47, (1998), 1072-1077



Figura 138. Electrodo de disco rotatorio de oro, electrodo de referencia y electrodo auxiliar así como accesorios adicionales

4 NARICES ELECTRÓNICAS

En esta tesis se ha presentado una experiencia para detectar el deterioro del vino (capítulo 6) mediante sistema de narices potenciométricas húmedas. Este tipo de medidas muestra un interesante desarrollo porque evita el contacto de los electrodos con la muestra a analizar. Las líneas de investigación de sensores para narices electrónicas pueden enfocarse en mejorar el sistema desarrollado mediante un componente sólido de consistencia de tipo gel, que mantenga la humedad y en contacto constante entre el sensor y el elemento volátil. No hay apenas precedentes de narices electrónicas que utilicen técnicas potenciométricas³⁶⁷, por lo que esta línea de investigación tiene amplias perspectivas de futuro. Las investigaciones también pueden continuar con sistemas mixtos de lenguas y narices electrónicas, formando un sensor global de olor y sabor de un alimento.

5 EQUIPOS DE MEDIDA PORTÁTILES

El sistema de medida con el que se han realizado de esta tesis se basa en el uso de un ordenador personal convencional, con placa de adquisición de datos comercial y software apropiado. Para extender estos sistemas a aplicaciones comerciales es deseable la miniaturación del sistema de proceso de datos mediante el uso de microprocesadores sencillos, por ejemplo tipo PIC, que realice los procesos de captación de señales y su almacenamiento. Se está desarrollando un sistema formado por un PIC con convertidor

³⁶⁷ Q. Liu, Hua Cai, Y. Xu, Yan Li, R. Li and P. Wang. *Olfactory cell-based biosensor: A first step towards a neurochip of bioelectronic nose*. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 (2006) 318-322

analógico-digital y una pantalla de cristal líquido para configurar las medidas. En la **Figura 139** se representa el equipo de medida y su aplicación para realizar medidas sobre pescado en la **Figura 139**. El equipo a base de microprocesadores posee características de robustez, sencillez de manejo y económico.

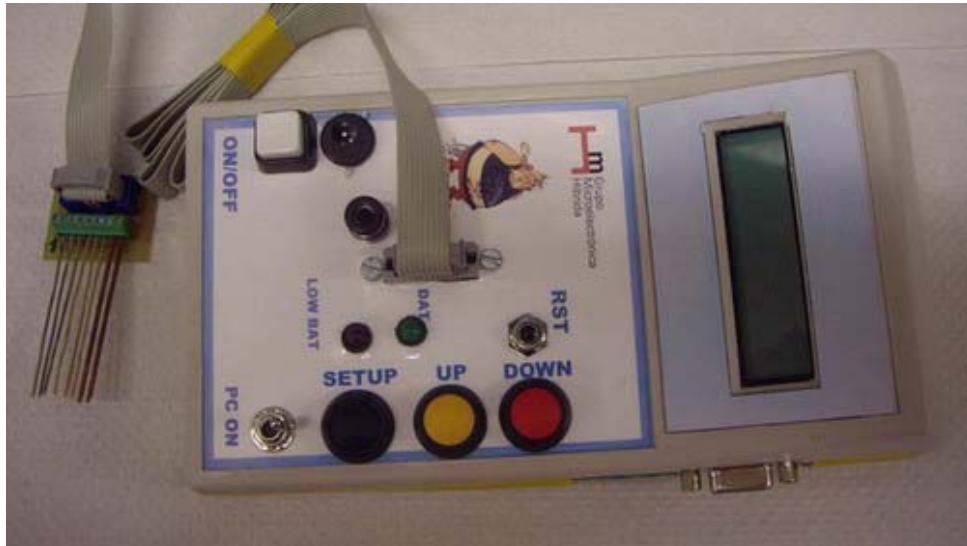


Figura 139. Equipo de medida portátil



Figura 140. Medidas con pescado con el equipo de medida portátil

A este tipo de equipo de medida se pretende implementar lógica difusa para el reconocimiento de patrones a partir de los datos de las medidas. Este desarrollo de lógica difusa se está realizando con programa informático *FuzzyTECH*TM.

5.1 PERSPECTIVAS DE FUTURO

El objetivo de esta estrategia es obtener un equipo que, además de marcar el valor de potencial de los electrodos, realice una evaluación global de la muestra que se está analizando, realizado in situ y por personal no especializado. Para ello el sistema debe incorporar una etapa de reconocimiento de patrones formada por una red neuronal que sea entrenada con medidas previas para luego realizar la evaluación. Para ello se está construyendo un equipo a base de microprocesadores cuyo esquema de bloques se representa en la **Figura 141**.

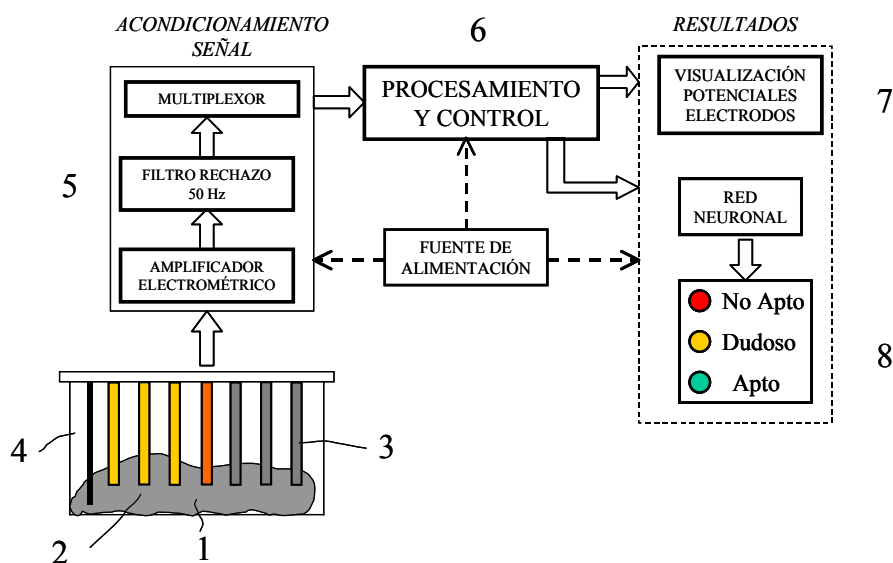


Figura 141. Sistema propuesto para el control de la frescura del pescado: 1) muestra, 2) electrodo de Au 3) electrodos de Ag, 4) Sensor de temperatura, 5) acondicionamiento de la señal, 6) procesado y control, 7) visualización potencial, 8) resultado red neuronal.

El sistema de medida formado por los siguientes subsistemas:

- Etapa Transductora de Señal.
- Etapa de Acondicionamiento y Digitalización de la señal (5).
- Etapa de Procesado y Control (6).
- Etapa de Salida.
- Fuente de Alimentación.

5.1.1 Etapa Transductora de Señal

La adquisición de la señal se logra por medio de un sistema multielectrodo que se pone en contacto directo con las muestras de pescado, El multielectrodo está formado por un electrodo de referencia de cobre (1), tres electrodos de oro (2), y tres electrodos de plata (3) y sensor de temperatura (4). Los electrodos se unen a una placa de pistas conductoras en circuito impreso por medio de soldadura con estaño. Por medio de un cable múltiple plano se conecta el sistema multielectrodo al sistema electrónico de medida. El sensor de temperatura (4), preferiblemente un semiconductor o un termopar, sirve para compensar las variaciones de potencial debidas a dicho parámetro y también se pone en contacto con el tejido del pescado.

5.1.2 Etapa de Acondicionamiento y Digitalización de la Señal

La etapa de acondicionamiento se sigue realizando con amplificadores electrométricos, es decir aquellos que poseen impedancia de entrada muy elevada para permitir la medida de carácter potenciométrico. Además se incorporan filtros para la inmunidad antes los ruidos procedentes de la red eléctrica. La etapa de digitalización y control de medida se está realizando con un sistema de microcontrolador de tipo PIC, para permitir la realizar estas tareas en un equipo de medida portátil.

5.1.3 Etapas de Procesado y Control

Debido a que los valores absolutos de los electrodos no son todavía indicadores fiables para determinar directamente la calidad del pescado, se está planificando la incorporación de lógica difusa, que a partir de los diversos datos obtenidos de cada uno de los electrodos puedan evaluar la calidad de conservación del pescado en tres niveles: Apto, no apto y dudoso. Para ello, se puede utilizar paquetes informáticos, como FuzzyTECH que permite la incorporación de lógica difusa en un sistema de microcontrolador.

5.1.4 Etapa de Salida

Una vez realizado el proceso de datos se visualiza el resultado. Este puede hacerse por medio de una pantalla de LCD incluida en el sistema de medida, o por medio de indicadores de tipo LED artificiales que permitan realizar una clasificación de las

muestras en tres tipos de salidas: Aptas, No Aptas y Dudosa y que serán representado por medio de tres indicadores (verde, rojo y amarillo).

6 APLICACIÓN DE LENGUA ELECTRÓNICA A OTROS TIPOS DE ALIMENTOS

En esta tesis los sistemas de lengua electrónica se han aplicado ha diversos tipos de alimentos: agua, vino, pescado y carne. Pero se puede extender su aplicación a otros tipos de alimentos. En el Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPV se trabajan con múltiples tipos de alimentos, realizando análisis de naturaleza física, química, biológica, microbiana y organoléptica. De esta forma, es posible realizar una comparación entre estos valores de análisis estándar con los valores potenciométricos, relacionanado los datos de ambos tipos de análisis e interpretando la variación de los datos de la lengua electrónica respecto a las características bioquímicas de los alimentos.

Entre las posibles nuevas aplicaciones es factible el control de calidad de las mieles, debido a experiencias del Instituto Universitario de Ingeniería Alimentos para el Desarrollo de la UPV. La miel de abejas es un producto, cuya composición fisicoquímica y organoléptica varía notablemente dependiendo de la flora visitada y de las condiciones climáticas y edafológicas del lugar donde procede³⁶⁸.

7 APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES A SENSORES CROMOGÉNICOS

Las técnicas de reconocimiento de patrones tienen aplicaciones que superan los límites de los sistemas de narices y lenguas electrónicas, abarcando las investigaciones de análisis químicos. De hecho, estos sistemas se pueden considerar un caso particular de la ciencia de la **quimiometría**, que es la disciplina química que aplica métodos matemáticos o estadísticos sobre datos químicos³⁶⁹.

³⁶⁸ M.L Piana, L. Persano Oddo, A. Bentabol, E. Bruneau, S. Bogdanov, C. Guyot. *Sensory analysis applied to honey: state of the art*. *Apidologie*, 35 (2004), S26-S37.

³⁶⁹ B. Lavine. *Chemometrics*. *Anal Chem*, 70, (1998), 209-228.

Las técnicas quimiométricas pueden aplicarse a las investigaciones que desarrolla el Instituto de Química Molecular Aplicada de la Universidad Politécnica de Valencia (IQMA). Este centro de investigación ha trabajado en el desarrollo de lo que se denominan sensores químicos moleculares (sondas moleculares) en donde el proceso de reconocimiento está acoplado a un proceso de señalización. Este comportamiento se consigue mediante la introducción en el ligando (o sitio reactivo) de unidades transductoras moleculares, capaces de transmitir información del proceso molecular de reconocimiento a través de un cambio en sus propiedades físicas (por ejemplo ópticas o electroquímicas). Este es un campo relativamente nuevo y de un auge creciente dentro del campo de la química supramolecular.

En relación a las sondas moleculares electroquímicas, el IQMA ha trabajado básicamente con el uso de ferroceno como señal señalizadora de eventos de coordinación, llevando a cabo la preparación y caracterización de los compuestos y el estudio de cómo la coordinación de afecta al potencial de oxidación del grupo redox-activo señalizador.

Además del uso del ferroceno como unidad señalizadora también se ha trabajado en la señalización óptica, mediante el estudio de sistemas coordinantes-fluorescentes y colorimétricos que presentan como gran ventaja el posible desarrollo de sondas químicas para la detección “a simple vista” de especies de interés. En este campo el IQMA fue uno de los primeros grupos europeos en comenzar una labor amplia de investigación y ha logrado ser en esta área es un referente nacional e internacional.

Dentro de este ámbito de investigación se ha realizado un trabajo de investigación con aplicación de técnicas de análisis multivariante de Análisis de Componentes Principales (PCA). El trabajo consistió en la descripción de una nueva familia de sensores químicos cromogénicos de aniones diferencial basados en una coordinación de cation anilopiridina-metal que utilizan interacción de un coordinado metal-ligando de un metal complejo. Basada en la experiencia con sensores químicos colorimétricos, se desarrolló un nuevo concepto para detectar aniones cromogénicos que utilizan interacción de un coordinado metal-ligando de un metal complejo. Se estudia una familia de cromoionóforos, que consiste en una unidad aceptora (difelipiridina) unida a otra unidad donadora (anilina). Eligiendo las unidadesceptoras y dadoras apropiadas se puede realizar pruebas selectivas frente a cationes. Además, los complejos formados

con los cationes se pueden utilizar para el reconocimiento diferencial de aniones. En todos los casos se obtiene ligandos ditópicos que contienen dos sitios de coordinación: una unidad monodentada de difenilpiridina y la unidad anilínica.

Como estos sistemas están formados por un grupo dador a otro aceptor, la coordinación afecta a su banda de transferencia de carga, la cual se refleja en el cambio de color. Por lo tanto, se estudia las características espectrofotométricas de los receptores y los complejos formados. Los aniones tienen un comportamiento diverso, dependiente del ligando y del catión metálico que esté formando el complejo, exceptuando el NO_3^- , Cl^- , y Br^- que se comportan de manera similar frente a todos los complejos ensayados.

Se utiliza el método de PCA para estudiar el comportamiento de estos sistemas, comprobando que esta familia de ligandos no puede ser usada para el reconocimiento de NO_3^- , Cl^- y Br^- que provocan un cambio de color muy similar en todos ellos. Pero se podría obtener patrones de reconocimientos para AcO^- , CN^- , I^- y F^- . Se ha observado varios ejemplos de complejos que son decolorados selectivamente para estos aniones y son los que pasamos a describir a continuación. Los resultados de esta investigación se publicaron en revista SCI.³⁷⁰

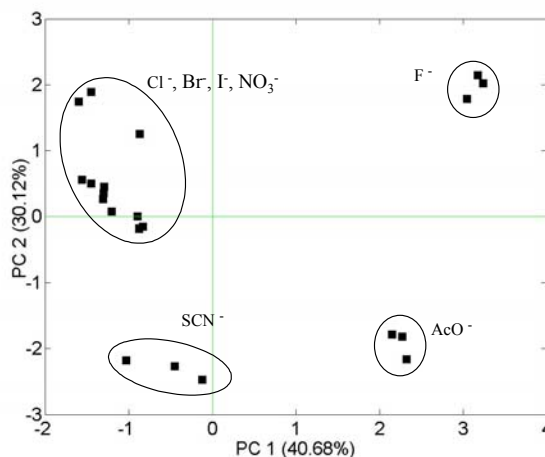


Figura 142. Diagrama PCA para los aniones AcO^- , SCN^- , I^- y F^- NO_3^- , Cl^- y Br^-

³⁷⁰ B. García-Acosta, X. Albiach-Martí, E. García, L. Gil, R. Martínez-Mañez, K. Rurack, F. Sancenón, J. Soto. *Coordinative and electrostatic forces in action: from the design of differential chromogenic anion sensors to selective carboxylate recognition*. Chem. Commun., (2004), 774 – 775.

Anexo I. Tecnología de Circuitos de Capa Gruesa

La tecnología de fabricación empleada para realizar los sensores es la misma que la empleada en la fabricación de circuitos microelectrónicos de capa gruesa. Esta tecnología consiste en dispensar mediante técnicas serigráficas, pastas de distintas características eléctricas, sobre substratos aislantes. Así los dos componentes básicos de un sistema híbrido son las pastas o tintas y los substratos^{371,372}

1 MATERIALES

1.1 SUBSTRATOS

El substrato es el soporte donde se monta el sistema, compuesto por conductores, dieléctricos y componentes serigrafiados o montados. Su función es triple: mecánica como soporte del sistema, eléctrica pues es un aislante que permite la realización de pistas y componentes pasivos y, por último, térmica pues es el medio para disipar el calor del sistema.

Los substratos más habituales en microelectrónica híbrida son los de **alumina** (óxido de aluminio) al 96% o 99%. Es el substrato más utilizado por sus buenas características y bajo coste.

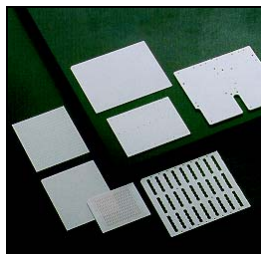


Figura 143. Substratos de Alumina de Ceramtec

³⁷¹ J. E. Sergeant, C.A. Harpet. *Híbrid Microelecnytronics Handbook*. McGraw-Hill.

³⁷² R. Álvarez Santos. *Tecnología microelectrónica 3. Circuitos Híbridos*. Editorial Ciencia 3 S.A. 1988.

1.2 TINTAS O PASTAS

Las tintas o pastas es el material fundamental de esta tecnología. Se basan, en general, en una estructura de tres constituyentes básicos:

- ✓ Material activo o fase funcional que define sus propiedades eléctricas.
- ✓ Ligante permanente que permite la adherencia al sustrato.
- ✓ Vehículo o soporte que le confiere cualidades serigráficas.

Los dos primeros constituyentes se conocen como “fracción mineral” y el último como “fracción orgánica” la cual desaparece (se evapora) después de la serigrafía.

El ligante permanente está constituido por partículas de vidrio con un bajo punto de fusión (borosilicatos de plomo, aluminosilicatos, óxidos metálicos) o en el caso de las pastas poliméricas por un plastificante.

El vehículo se emplea para mezclar el material activo y el ligante, proporcionando un carácter serigrafiable a la pasta. Puede estar formado por ligantes temporales como la etilcelulosa, solventes como el terpinol y agentes tensioactivos.

1.2.1 Características de las Pastas

Las características fundamentales de las pastas se dividen en: Eléctricas, reológicas (comportamiento viscoso de la pasta sometida a una fuerza), Tixotrópicas (variación de viscosidad en función de una tensión) y mecánicas.

1) **Características eléctricas** se pueden destacar: resistividad (ohm/cuadro), disipación (W/cm^2) coeficiente de temperatura (ppm $^{\circ}C^{-1}$), tensión de trabajo, coeficiente dieléctrico (en pastas dieléctricas), ángulo de pérdidas (en pastas dieléctricas).

2) **Características reológicas** se pueden destacar: viscosidad, (cps (rpm)).

3) **Las características tixotrópicas** implica una estructura interna de pasta que queda rota al ser agitada pero que se reorganiza al volver al reposo. Las tintas para capa gruesa deben disminuir su viscosidad durante el proceso de serigrafía y retornar a su viscosidad original una vez finalizado.

4) **Características mecánicas** se pueden destacar: Estabilidad, compatibilidad tinta-substrato y tinta-tinta, adhesión, envejecimiento, reproducibilidad, dilución, rendimiento, resolución, etc.

1.2.2 Clasificación de las Pastas

En función del proceso de sintetizado o quemado, las pastas se pueden dividir en: Pastas de Baja Temperatura y Pastas de Alta Temperatura:

Las pastas de baja temperatura son:

- ✓ Poliméricas, que utilizan una resina cargada con una fracción mineral cuyo tratamiento térmico se sitúa por debajo de los 200°C.
- ✓ Minerales, que utilizan un vidrio de baja temperatura en el quemado (sobre 650°C).

Las pastas de alta temperatura son:

- ✓ Pastas de metales preciosos para conductores.
- ✓ De RuO_2 o $\text{Bi}_2\text{Ru}_2\text{O}$ para resistores.
- ✓ De metales no preciosos como el cobre.
- ✓ De carburos, silicatos, nitruros o boruros para resistores compatibles con el Cu.
- ✓ Boratos o titanatos para dieléctricas.

1.2.2.1 Pastas conductores de metales nobles

Se caracterizan por tener una muy baja resistividad, asegurando una buena conducción eléctrica. Los materiales más comunes son: oro, plata, platino y aleaciones de estos materiales entre si o con paladio.

La más utilizada, por su bajo coste, es la de plata pura o con aleaciones de platino o paladio, las cuales le confieren mayor disipación de potencia y mejor soldabilidad, aunque empeora la conductividad. Las pastas de aleaciones de plata suelen comercializarse según la proporción de plata.

Las pastas de oro son empleadas en alta frecuencia, para aplicaciones donde sea necesario el wire-bonding y el die-bonding (*chip-bonding*). Suele, también, presentarse con aleaciones de platino y de paladio.

Las pastas de platino se suelen emplear en sistemas termométricos (resistencia termométrica de platino) o para sensores (tipo redox); pero normalmente se encuentra en aleaciones de Au o Ag para conductores.

1.2.2.2 Pastas resistivas

Por su función las pastas resistivas tienen una formulación más compleja que las conductoras, normalmente aleaciones de óxidos.

La resistividad se consigue según distintas concentraciones, tamaños y distribución de los elementos. Los compuestos más utilizados son los óxidos de rutenio o las aleaciones de plata/óxido de paladio, éste último en desuso.

Los óxidos de Rutenio, se utilizan con dopantes con el fin de obtener distintos coeficientes de temperaturas (positivos o negativos).

1.2.2.3 Pastas dieléctricas

Este tipo de pastas se utilizan en varias aplicaciones, puentes o cross-over, dieléctrico de condensadores y protección de circuitos.

El puente tiene como objeto aislar conductores serigrafiados en varias capas. Como condensadores deben ofrecer un coeficiente dieléctrico elevado. Como protectoras sirven de recubrimiento contra agentes corrosivos, polvo, etc.

En general, estas pastas están formadas por mezclas de vidrio (aluminio-silicato de plomo) y polvos cerámicos (Al_3O_2 y ZrO_2); también se encuentran mezclas con TiO_3Ba .



a)

b)

c)

Figura 144. a) Pastas de plata-paladio de Ferro, b) Pasta de RuO₂ de Heraeus c) pasta protectora de Heraeus

1.2.2.4 Pastas de metales no nobles

El elevado coste de las pastas basadas en metales nobles encarece los sistemas de capa gruesa. Como alternativa existen pastas de metales no preciosos como el aluminio, cobre y el níquel. El problema de estos metales suele ser su soldabilidad y su quemado en atmósferas inertes.

1.2.2.5 Pastas poliméricas

El ligante es un polímero termoendurecedor o fotocurable. Los primeros tienen una temperatura de polimerización que varía entre 60° y 200°C, mientras que los segundos se polimerizan mediante luz ultravioleta.

Estas pastas están formadas por tres componentes: ligante, disolvente y relleno.

El **ligante** consiste en una materia plástica termo/fotoendurecible a base de formaldehidos de fenol, garantizando la robustez mecánica durante todo el proceso y la adhesión al sustrato. Tiene una estructura formada por macromoléculas lineales, siendo soluble y fusible. Durante los ciclos térmicos se produce un "fileteado" entre moléculas bajo el efecto de la temperatura. Se obtienen finalmente una estructura rígida y dura, a partir de la cual el ligante es insoluble e infusible.

Los **disolventes** usuales son de origen orgánico con una pequeña tensión de vapor. El tipo y cantidad determinan el valor de viscosidad. Dichos disolventes desaparecen durante la fase de secado.

Los materiales de **relleno** o carga determinan el comportamiento eléctrico de las pastas, pudiendo ser de granos metálicos (plata, cobre, etc) para las conductoras, de granos de grafito para las resistivas y sin carga para las aislantes.

Las pastas poliméricas están teniendo un espectacular avance en el campo de los sensores. Existen líneas específicas para fabricación de sensores.

2 PROCESO DE FABRICACIÓN

Los circuitos electrónicos de capa gruesa se realizan siguiendo un proceso de varias etapas, que pueden variar en función del tipo de circuito a implementar. El proceso de fabricación de un sistema *Thick-Film* se muestra en la **Figura 145**, este mismo proceso con pequeñas variaciones se puede aplicar a la fabricación de electrodos en esta tecnología.

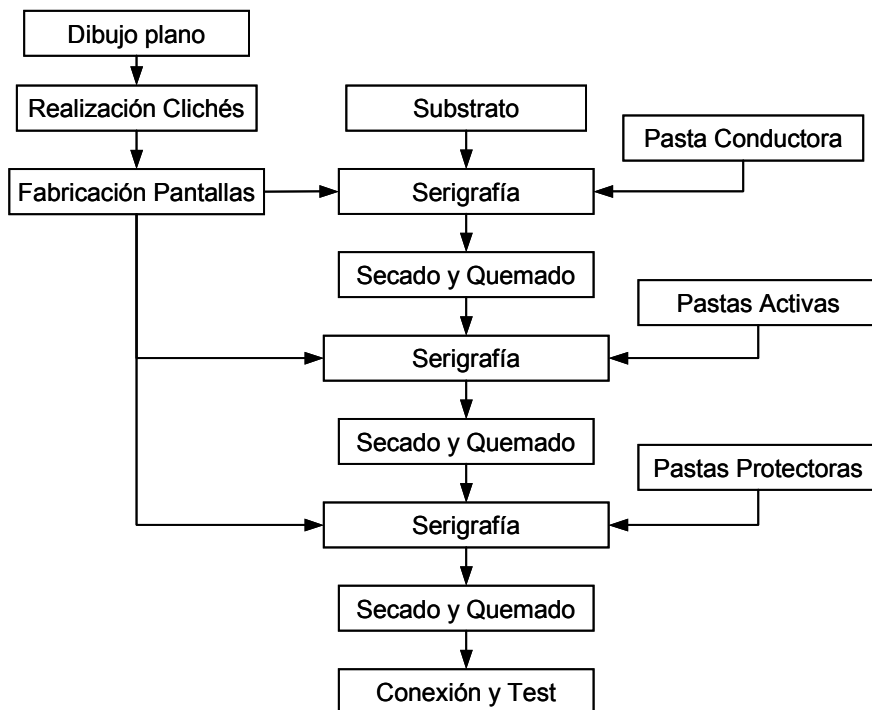


Figura 145. Proceso tecnológico de sensor en capa gruesa.

Todo el proceso de tecnología de capa gruesa se basa en las técnicas serigráficas, desarrollado en la **Figura 146**.

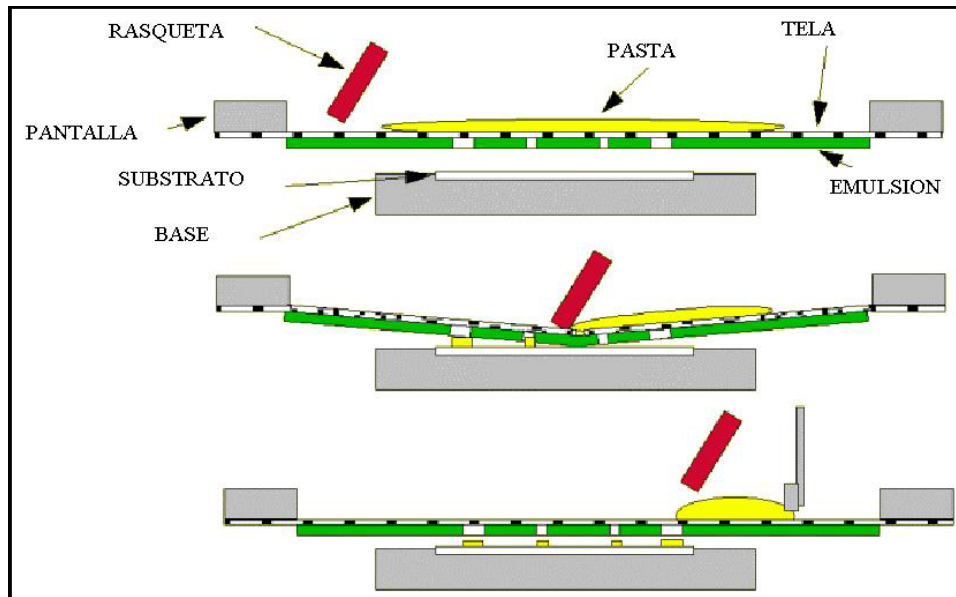


Figura 146. Proceso serigráfico.

Este proceso consiste en utilizar una pantalla donde se adhiere una tela (de distintos tamaños de apertura) sobre la cual se ha fijado un film fotosensible. El film permite mediante métodos fotográficos (empleando un fotolito) delimitar las zonas por donde debe pasar la pasta, empleando una rasqueta, a través de la tela.

2.1 PANTALLAS SERIGRÁFICAS

La función del marco o pantalla es poder mantener tensada la tela y servir de fijación en la máquina de serigrafiar. Los parámetros básicos ha considerar en esta parte del proceso son:

- ✓ Marco. Dimensiones y material del marco.
- ✓ Tela. número de Mesh (número de hilos por pulgada), trama, orientación de la malla y tensado.
- Emulsión. tipo y espesor.
 - ✓ Espesor final.
 - ✓ Insolación y revelado.

2.1.1 Marcos

Los marcos suelen ser de acero extruido o aluminio (**Figura 147**) y debe soportar la fuerza de tensado. Se recomienda que el ancho de la pantalla sea al menos tres veces el ancho del circuito, si el marco es demasiado pequeño, recibirá una sobrecarga en los bordes de la rasqueta, y se deteriorará la malla.

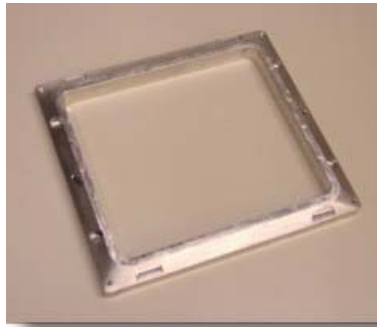


Figura 147. Marco de aluminio.

2.1.2 Telas

Las telas sirven de soporte para el film fotosensible y deben de tener una determinada apertura de malla para dejar pasar la cantidad suficiente de pasta. Para colocarlas en el marco deben tensarse y pegarse a él. Las telas, de hilos entrecruzados, pueden ser de poliéster, nylon o acero inoxidable (**Figura 148**), estas últimas se suelen utilizar en grandes tiradas debido a su gran resistencia.

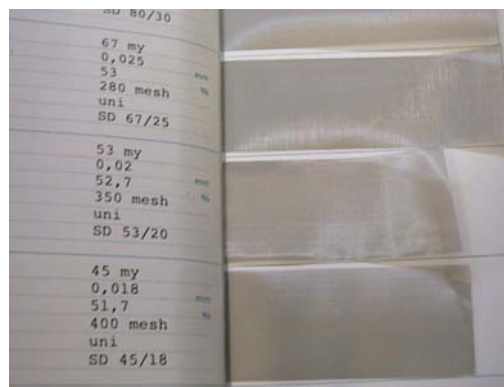


Figura 148. Telas de acero inoxidable.

Las telas se caracterizan por formar una red de hilos con un grosor y una distancia entre ellos muy homogénea, dando lugar a sus características principales: número MESH diámetro y espesor del hilo y superficie abierta. Estos factores serán determinantes a la hora de elegir la tela según el tipo de pasta a emplear ya que por esas características se obtendrá un mayor o menor espesor de capa de pasta sobre el sustrato (además, el espesor final, también depende del espesor de la película fotosensible).

La orientación de la tela es importante a la hora de colocar la tela sobre la pantalla; desde un punto de vista mecánico, la estabilidad máxima (**Figura 149**) se obtiene tensando la tela con los hilos formando un ángulo (ángulo mesh) respecto al marco de 45° o entre 22° y 45°.

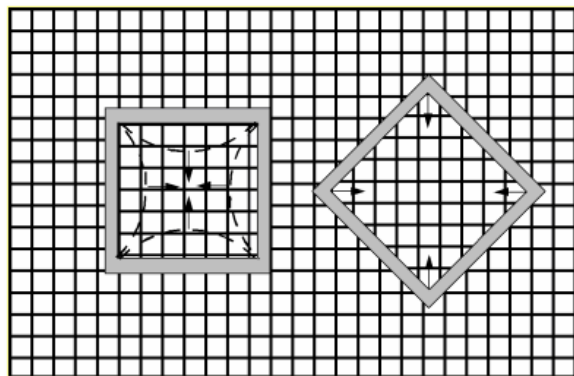


Figura 149. Orientación de la tela.

La tela se debe de tensar sobre el marco de modo que la tensión de la malla más la tensión que producirá la rasqueta sobre la ésta, sea menor que el sector de alargamiento elástico (sea reversible). Si superamos ese valor, entraremos en el sector de alargamiento plástico, que es irreversible, y esto supondría la degradación de la malla

Para tensar la tela, se corta al tamaño adecuado y se coloca sobre una mesa de tensado, que sujeta la tela con pinzas por todos sus lados mientras el marco está debajo. La tela se estira de forma controlada, hasta conseguir la tensión deseada (se puede medir con un newtontester).

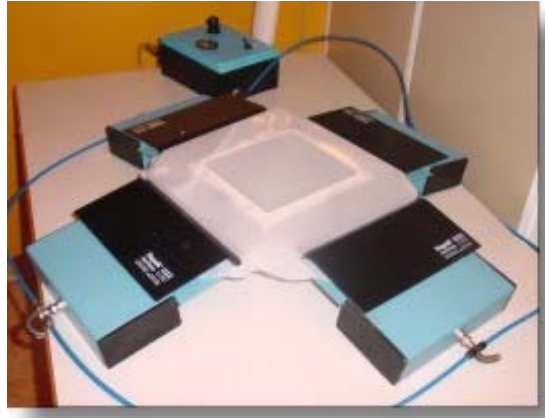


Figura 150. Tensado de tela mediante grapas neumáticas.

Una vez tensada la tela, se encola la malla sobre el marco con pegamento específico para este tipo de tensados, el tiempo de secado depende del fabricante (15 a 30 min.).

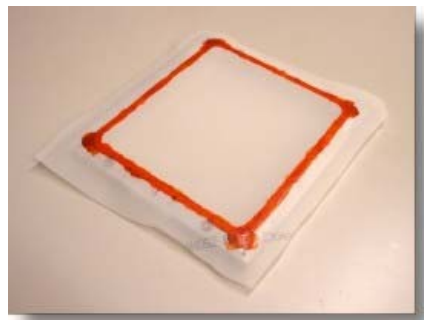


Figura 151. Tela encolada al marco.

Después del tensado y pegado de la tela al marco tenemos la pantalla preparada para colocar el film fotosensible, pero, con objeto de evitar partículas de grasa que podrían evitar la correcta adherencia del film a la tela debemos desengrasar la tela con algún producto específico para este tipo de proceso.

2.1.3 Film Fotosensible

Para poder transferir la imagen a la tela se realizan varios procesos: el primero consiste en añadir una capa o film fotosensible a la tela, la cual endurece por secado; después se coloca el fotolito sobre el conjunto tela-film y se insola con luz actínica, de tal forma que las zonas iluminadas por la luz quedan endurecidas (film positivo, **Figura 152**) al polimerizar el film e incrustadas en la tela, por otra parte las zonas en sombra se eliminan mediante revelado (**Figura 153**)

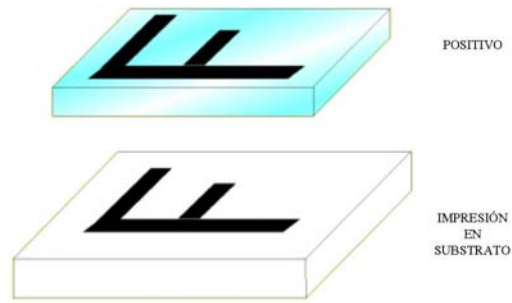


Figura 152. Transferencia por positivo.

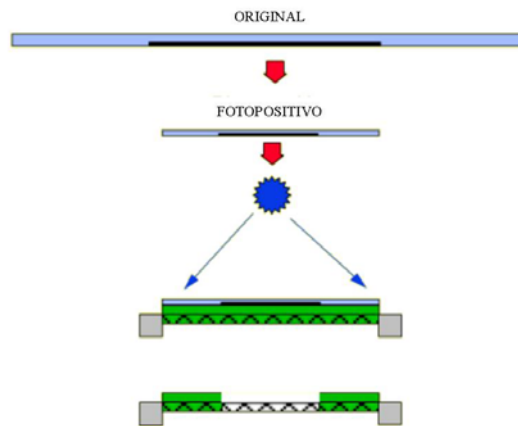


Figura 153. Proceso de insulado

Después de colocar el film se debe secar la pantalla en una secadora (**Figura 154**), de esta manera se elimina la humedad de la pantalla y se endurece la emulsión fotosensible cogiendo así la consistencia adecuada (**Figura 155**).



Figura 154. Secadora para pantallas.

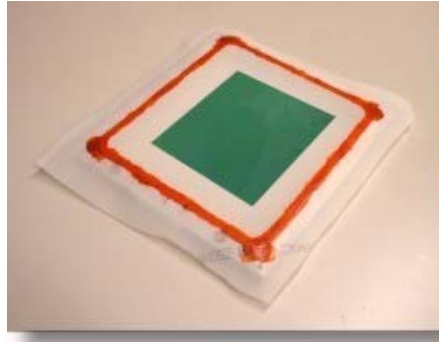


Figura 155. Pantalla con film.

La capa fotosensible no solo sirve para definir el área que quedará libre para el paso de la pasta (**Figura 156**), sino que definirá también el espesor de capa final de la pasta sobre el sustrato (**Figura 157**). La relación entre el espesor de pasta y las características del conjunto tela-film viene dada por:

$$E_p = E_T \cdot A + E_F$$

donde:

- E_p : Espesor final de la pasta húmedo
- E_T : Espesor de la tela.
- A : Proporción de apertura de la malla (superficie libre)
- E_F : Espesor de la película fotosensible.

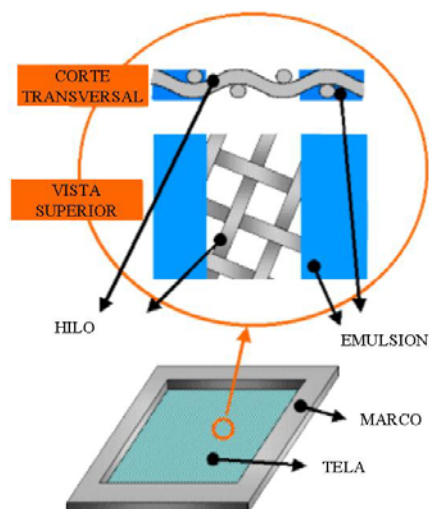


Figura 156.- Pantalla: tela más film.

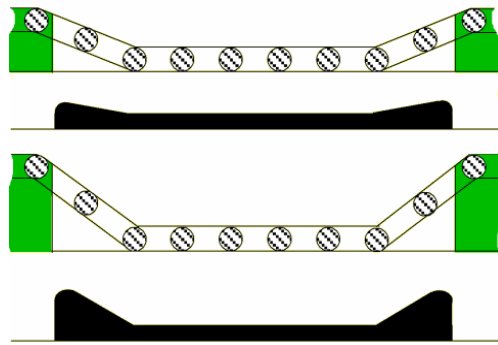


Figura 157. Efecto de la capa fotosensible en el espesor de capa.

2.1.4 Insolado y Revelado

Una vez preparada la pantalla con el film, se coloca el fotolito sobre la capa fotosensible de la pantalla (**Figura 153**). Se coloca el conjunto en una insoladora (**Figura 158**), con el lado de fotolito+film hacia la fuente de luz (**Figura 159**). A continuación se realiza la insolación durante un tiempo preciso; en el cálculo de este tiempo se tienen en cuenta las variables suministradas por el fabricante de la emulsión en función de la insoladora y ciertos parámetros complementarios: distancia de la pantalla a la fuente de luz, tipo de tela, mesh de la tela, temperatura, humedad y potencia de la lámpara.



Figura 158. Insoladora para pantallas.

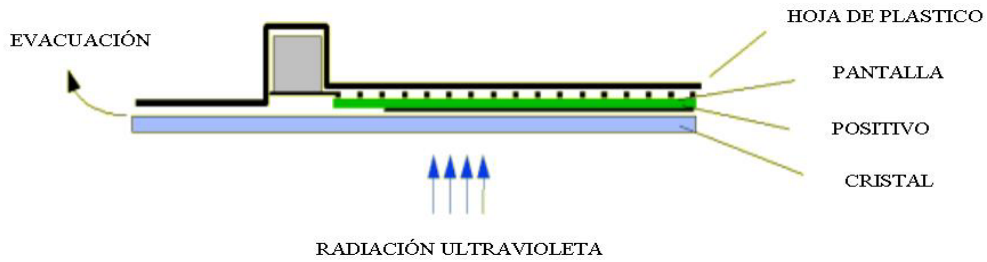


Figura 159. Proceso de insolado con vacío.

Para realizar el revelado de la imagen se utiliza el método adecuado según el tipo de emulsión fotosensible empleado, lo más habitual es utilizar un chorro suave de agua sobre la pantalla tanto sobre un lado como sobre el otro.

El proceso finaliza con el secado de las pantallas durante 5-10 min a 45°C (**Figura 160**).

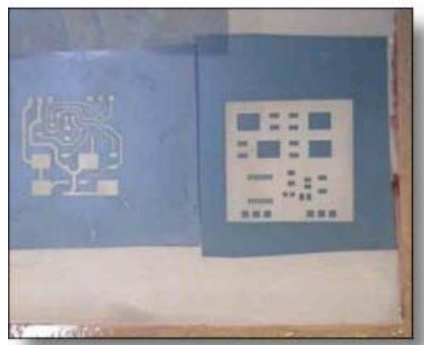


Figura 160. Pantalla insolada.

Se pueden utilizar bloqueadores y retocadores para completar el proceso. Los bloqueadores se emplean para rellenar las zonas no expuestas al film y que no deben quedar al aire (para no dejar pasar pasta inútilmente); los retocadores sirven para redefinir el motivo sobre el film en el caso de una mala insolación o revelado (**Figura 161**).

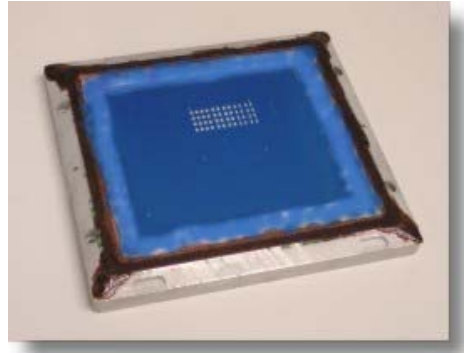


Figura 161. Pantalla terminada.

2.2 SERIGRAFÍA.

Una vez realizadas las pantallas, el siguiente paso en la fabricación de circuitos de capa gruesa consisten en la realización de la serigrafía.

La serigrafía es la técnica general de impresión de un dibujo con pastas o tintas sobre un substrato rígido. De esta forma se consigue una homogeneidad de espesor y buena definición.

Existen dos métodos de serigrafía:

- ✓ Serigrafía por contacto: es el empleado en pasta de soldadura, en este método la tela de la pantalla se apoya sobre toda la superficie del substrato.
- ✓ Serigrafía fuera de contacto: en este método la pantalla no se apoya sobre el substrato, salvo en la zona en que la rasqueta presiona hacia abajo la malla, apoyándola sobre la zona de substrato que se serigrafía. Se emplea en capa gruesa ya que se obtiene mayor precisión.

Los factores principales que influyen en la serigrafía son: las tintas o pastas a utilizar, la rasqueta y ma maquina de serigrafía y sus ajustes.

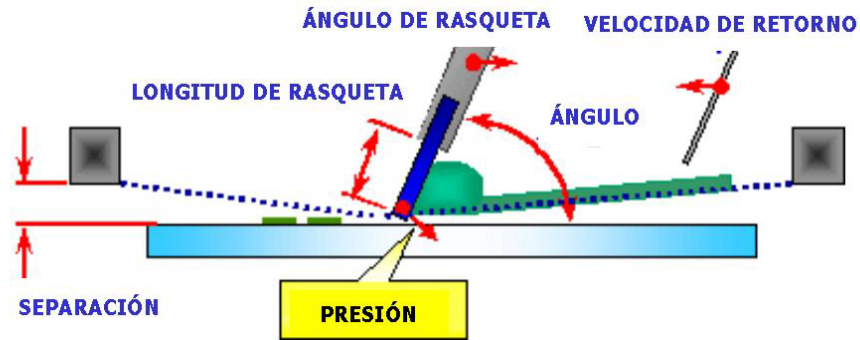


Figura 162.- Factores físicos de influencia en la serigrafía.

2.2.1 Pastas

La pasta o tinta que va a ser serigrafiada, requiere de una preparación previa, que consiste en la agitación dentro del bote durante varios minutos, para que disminuya su viscosidad y se ponga a temperatura ambiente (**Figura 163**). La pasta debe depositarse sobre la pantalla con una cantidad suficiente para que cubra toda el área de trabajo, con un espesor aproximado de 1 mm, se deposita delante de la rasqueta en el sentido de serigrafía, a lo largo y en paralelo.

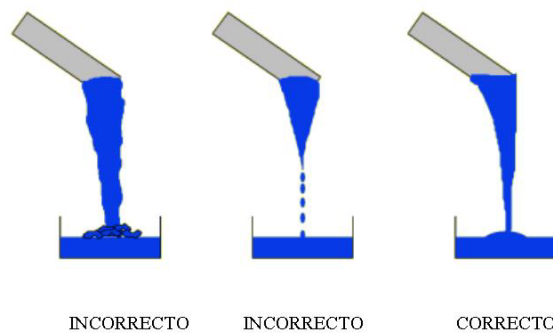


Figura 163. Viscosidad adecuada para serigrafía.

2.2.2 Rasqueta

La rasqueta tiene como misión:

- Forzar a la pantalla a tener un contacto con el substrato en la superficie a imprimir.
- Forzar la pasta a través de las superficies abiertas.

- Eliminar el exceso de pasta de la superficie de la pantalla.

Como características principales propias, se debe tener en cuenta el material, tamaño, forma, dureza y durabilidad. Como características de funcionamiento se deben considerar el ángulo de ataque, la distancia a la pantalla y la distancia de salida.

La forma va a depender del tipo de pasta a imprimir, de si tiene que realizar doble pasada e incluso de las formas del dibujo a realizar. La forma básica es en “V”, existiendo tres variaciones básicas: en cuchillo, en diamante y rectangular. La dureza de la rasqueta tiene influencia sobre el tipo de pasta a emplear, la dureza suele venir definida por el color de la rasqueta.

Otros factores a tener en cuenta son la velocidad y presión de la rasqueta, ya que permiten definir el espesor final de capa; a mayor presión mayor disminuye el espesor de capa e inversamente a mayor velocidad, mayor espesor de capa. La presión debe variar con el tipo de pasta pero suele oscilar entre 0.1 y 1 kg/cm; mientras que la velocidad oscila entre los 5 y 30 cm/s.

También influye en este aspecto el paralelismo de la rasqueta sobre el sustrato ya que si no está alineada con respecto a la pantalla y sustrato se ejercerán distintas presiones en distintas zonas de impresión.

2.2.3 Maquinas de Serigrafía

Por su estructura y método operativo el conjunto de máquinas puede ser clasificado en:

- ✓ Manuales.
- ✓ Semiautomáticas
- ✓ Automáticas

Se diferencian en la posibilidad de modificar parámetros de forma manual o por programación. Las tareas que permiten estas máquinas son:

- Colocación del sustrato de alúmina, montaje de la pantalla sobre la máquina, centrado de marcas, reglajes (X, Y, ángulo, snap-off), carga de pasta en la pantalla con ayuda de una espátula, vacío, abatimiento de la pantalla sobre el sustrato,

selección de velocidad, selección presión, subida de la pantalla, corte de vacío, retirada de sustrato.



Figura 164. Máquina semiautomática AUREL C1010

2.2.4 Nivelado y Secado

Una vez realizada la serigrafía, se deja reposar de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo la pasta retorna a las características de viscosidad que tenía antes de la serigrafía y se nivela su espesor, reduciéndose las marcas que han dejado los hilos durante la serigrafía.



Figura 165.- Proceso de secado.

2.3 CICLO TÉRMICO

Después de la impresión serigráfica y que la pasta haya reposado sobre el sustrato durante 5 a 10 minutos, debe comenzar el “ciclo térmico” consistente en:

- ✓ Un secado en estufa.
- ✓ Un quemado en horno.

Quemado a **baja temperatura**:

Las pastas polímeras se someten a un “quemado” a temperaturas entre 60° y 200°C en periodos entre 10 min y 2 horas.

Quemado a **alta temperatura**:

Después de un secado durante 10 minutos a 150°C la “cohesión” de los depósitos es realizada en hornos cuyo perfil térmico $T=f(t)$ y atmósfera son previamente determinados.

El perfil como el indicado en la figura muestra **tres fases**:

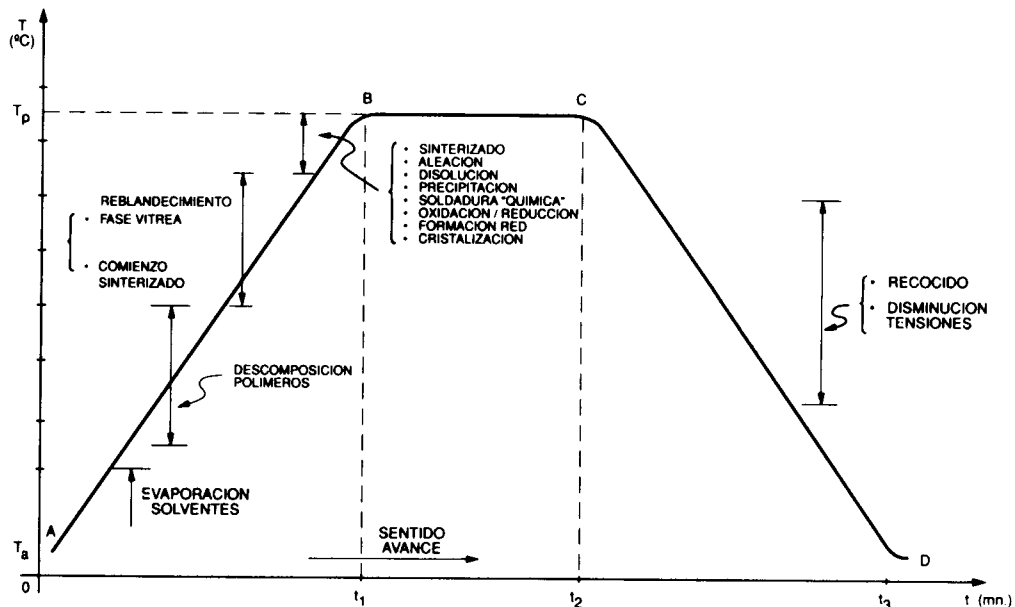


Figura 166. Ciclo de quemado

✓ Fase AB:

Durante la que se elimina y queman los componentes orgánicos de la tinta, es decir se producen: Evaporación del solvente, Descomposición de los polímeros, Reblandecimiento de la fase vítrea, Comienzo de la sinterización.

La velocidad de subida o de calentamiento, viene dada por la pendiente, y es igual a 50°C/min, aproximadamente.

✓ Fase BC:

Durante esta segunda fase, la temperatura permanece estable y se realiza la sinterización de la fase funcional o metálica con las partículas “cristalinas” de la tinta, fijándose ésta al sustrato.

Esta fase se puede considerar la más crítica, debiendo mantenerse la temperatura del horno dentro de una tolerancia con desviaciones inferiores a 5°C, para poder conseguir las transformaciones: sinterización, aleación, disolución, precipitación, unión o soldadura “química”, oxidación/reducción, formación de redes cristalinas, cristalización.

✓ Fase CD:

Durante la que se produce el enfriamiento, y durante ella, a una velocidad de 50°C/min tiene lugar: un tratamiento de “recocido”, disminución de tensiones internas.

Los tiempos y temperaturas de las fases anteriores, dependen del tipo de pasta y son especificadas por el fabricante. No obstante, un ciclo convencional puede durar de 30 minutos (corto) a 55 minutos (largo), con la siguiente distribución de tiempos parciales:

0 – T1, calentamiento, estimado en unos 20 minutos.

T1-T2, permanencia a temperatura máxima, estimado en 20 minutos.

T2-T3, enfriamiento, durante 15 minutos.

En lo que se refiere a temperaturas, el ciclo se caracteriza por:

- Un calentamiento en estufa a temperatura T comprendida en el intervalo de 25°C a 140°C, para eliminar una fracción orgánica volátil.
- Una combustión o pirólisis de los ligantes orgánicos a temperatura comprendida entre 140°C y 500°C.
- Una sinterización con fusión de la fase vítrea a la temperatura comprendida entre 500°C y 1000°C.

Los ciclos térmicos también varían según el tipo de pasta.

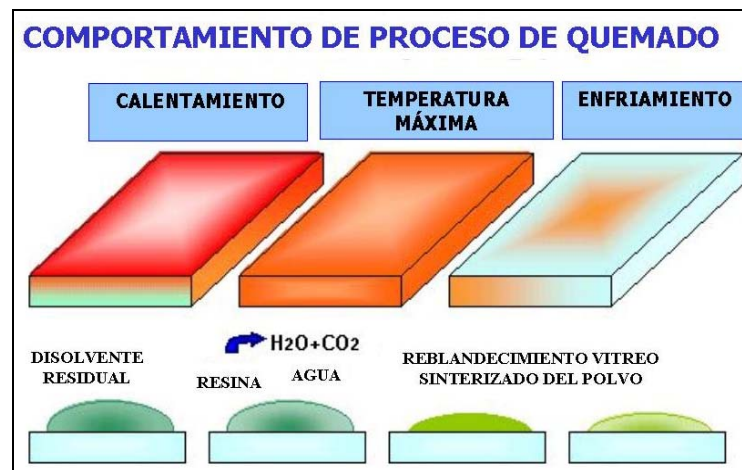


Figura 167.- Esquema del proceso de quemado.

2.3.1 Hornos de Quemado

Los hornos para el quemado de las pastas deben presentar un conjunto de características de entre las cuales podemos mencionar:

- Poder cumplir con el perfil exigido, Reproducibilidad, Rendimiento, Atmósfera adecuada.

Por su método operativo pueden clasificarse en:

- Estáticos no programables, Estáticos programables, Continuos de zonas.

Por la fuente de caldeo pueden clasificarse en: Convencionales, Infrarrojos.

3 ELECTRODOS UTILIZADOS EN LAS EXPERIENCIAS

En los puntos anteriores de este anexo se han expuesto las características generales de la tecnología de capa gruesa. En este punto se especifica los materiales, herramientas, procesos y resultados concretos de los electrodos de tecnología de capa gruesa que se han utilizado en las experiencias de esta tesis doctoral

3.1 MATERIALES

3.1.1 Substratos

Para realizar los sensores se utilizaron substratos de **alúmina**, modelo *RUBALIT 7085* al 96% de la marca *CERAMTEC*. Para realizar el sistema multisensor se utilizó piezas de superficie 57,8 x 27,8 mm y de espesor 1 mm. (**Figura 143**)

3.1.2 Pastas

Se han utilizado distintos tipos de pastas, con características eléctricas resistivas, conductoras y dieléctricas. Dentro de cada tipo se distinguen según el elemento activo que interviene en los sensores. A continuación se presentan unas tablas con las características más importantes (según información ofrecida por los fabricantes), de las pastas que han sido utilizadas en la construcción de los sensores para las experiencias de esta tesis doctoral.

3.1.2.1 Pastas Resistivas. Fabricante: Heraeus³⁷³

Elementos Activo	Nombre	Temp.Quemado (°C)	Resistividad (Ω/cuadro)	Coef Res. Temp (ppm/°C)
RuO ₂	R8911D	700	1	±100
RuO ₂	R8921D	700	10	±100
RuO ₂	R8941D	700	1k	±100
RuO ₂	R8961D	700	1M	±100

³⁷³ <http://www.heraeus.es>

3.1.2.2 Pastas Conductoras. Fabricante Heraeus

Elementos Activo	Nombre	Temp. Secado (°C)	Temp. Quemado (°C)	Resistividad (Ω/cuadro)	Viscosidad
Ag	C1075	150	850	< 2,2 m	30-50Pas
Pt/Ag	C1076	150	850	< 4m	30-50Pas
Ag/Pd	C1214	150	850	< 40m	30-45Pas
Cu	C7257	125	900	< 2,6 m	
C	C2000802	60		100	2,3 Pas

3.1.2.3 Otras pastas. Marca GEM³⁷⁴

Elementos Activo	Nombre	Temp. Secado (°C)	Temp. Curado (°C)	Resistividad (Ω/cuadro)	Viscosidad
C	C2000802	60	80	100	2,3 Pas
AgCl	C61003P7	60	80	500	5,3

3.1.2.4 Pastas Poliméricas. Marca Electro-Science Laboratories, Inc (ESL)³⁷⁵

Elementos Activo	Nombre	Temp. Secado (°C)	Temp. Curado (°C)	Resistividad (Ω/cuadro)	Viscosidad
Polimérica	240-SB	125	200 (1hora)	10 ¹⁰	150
			150 (2hora)		

3.2 PANTALLAS Y TELAS SERIGRÁFICAS

Para construir las pantallas serigráficas de los sensores en el Laboratorio del Grupo de Microelectrónica Híbrida de la UPV, se ha seguido el siguiente procedimiento:

- Fotolito: Para obtener el fotolito con el dibujo del sensor, se realiza una impresión del dibujo sobre papel transparente de acetato con impresora tipo láser. Se realiza una doble impresión para asegurar una mayor densidad de la tinta y por tanto, mayor opacidad de las zonas que no deben pasar la radiación de insolación.

³⁷⁴ <http://www.g-e-m.com/index.html>

³⁷⁵ <http://www.electroscience.com/>

- Marco: El marco de las pantallas serigráficas es de hierro de dimensiones 35x30cm y de aspecto similar al representado en la **Figura 147**.
- Tela: Para construir la pantalla se utiliza tela de poliéster de la marca *Monolen PET 100*, modelo 120/3410 y de un MESH de 305 (número de hilos por pulgada). Se corta un trozo de la tela serigráfica de tamaño mayor que el marco y se coloca el marco metálico con orientación de 45°.
- Máquina tensadora. Para aplicar la tela al marco se tensa con una máquina tensadora de la marca *RUPER* (**Figura 150**) con una presión 1 atmósfera. La tela se pega al marco con cola de tipo *Kiwobond 1000 HMT* y se deja secar durante 20 minutos. Posteriormente se recorta la tela que sobresale por el marco.
- Una vez construida la pantalla se limpia la tela con un gel abrasivo desengrasante (*ULANO GEL 23*) para así eliminar cualquier posible obturación de la entretela. A continuación se enjuaga con abundante agua a presión
- Film Fotosensible. Para transferir la imagen del fotolito a la pantalla se utilizó un film de tipo *ULANO CDF-3*. El film queda sujeto a la tela por encastre. El aspecto final es el que muestra la **Figura 155**.
- Secadora. Una vez superpuesto el film sobre la pantalla se seca durante 1 hora en la máquina secadora que se muestra en la **Figura 154**. Con esta etapa se encuentra la pantalla terminada.
- Insoladora- Reveladora. Para fijar el dibujo del fotolito al film fotosensible se aplica una máquina insoladora de la marca *B.C.B.* modelo *IC-500* (**Figura 158**) que posee una lámpara de radiación ultravioleta de 5000 watos, la insolación se realiza durante 185 segundos. Para fijar el film con precisión a la pantalla se realiza previamente el vacío.
-
- Serigrafía. La deposición de las pastas sobre el sustrato se realiza por proceso de serigrafía con máquina semiautomática de marca Aurel C1010 (**Figura 164**), que

pasa la pasta con una rasqueta de tipo “V” a la presión de 0,6 bar y velocidad 70 mm/seg.

- Ciclo Térmico. El conjunto de substratos y pastas se secan y queman en una mufla donde se programa el ciclo térmico según las especificaciones de los fabricantes de las pastas. La mufla utilizada es *VULCAN 3-130*.



Figura 168. Mufla para realizar el proceso térmico

- El proceso de serigrafía y ciclo térmico se repite tantas veces como tipos distintos de pastas se vayan a colocar sobre el substrato. Después de todos estos procesos el aspecto de un multisensor en tecnología de capa gruesa es la representada en la **Figura 169**, a falta de la última capa aislante y protectora. Este multisensor es el que ha sido utilizado para en análisis del vino y está formado por distintos tipos de pastas. Para conocer mejor el aspecto de la superficie del sensor y su constitución se realizó un análisis microscópico de cada uno de los sensores. El resultado se muestra en el punto siguiente de este anexo.

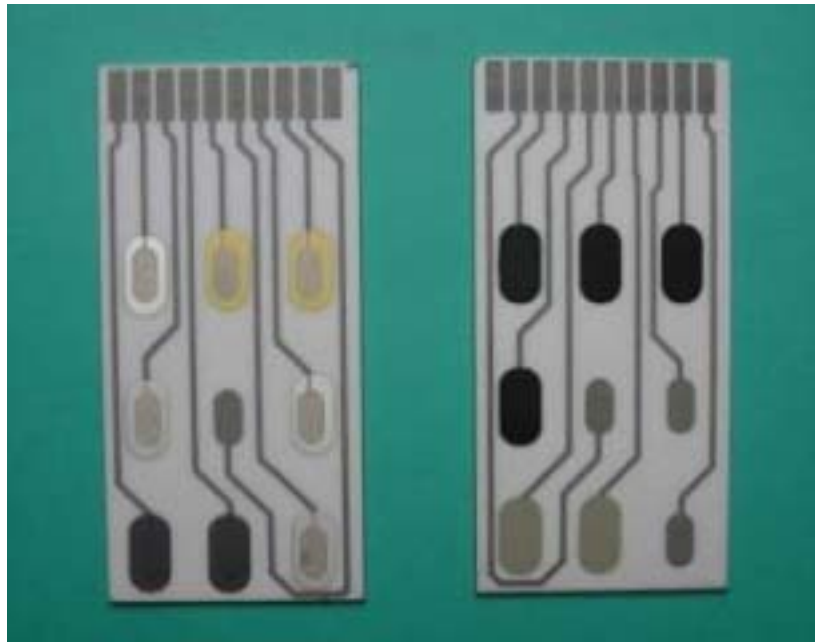


Figura 169. Aspecto de la placa a doble cara con distintos tipos de pastas

4 RESULTADOS FINALES

Una vez realizados todos los procesos de fabricación del sensor, la siguiente etapa consiste en su caracterización. Para ello se realizaron diversos análisis por medio de microscopio del Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV para observar la superficie del sensor y comprobar su aspecto, además se realizó un análisis de espectros para determinar la presencia de los principales elementos químicos y su proporción. Los resultados de este análisis para uno de los electrodos que se han utilizado en las experiencias con vino se detallan en los siguientes puntos.

4.1 SENSOR DE RuO_2

En la **Figura 170** se muestra fotografías del sensor con tinta de RuO_2 con aumento de 100 y 1000. En este último caso se puede observar los gránulos de RuO_2 (manchas negras)

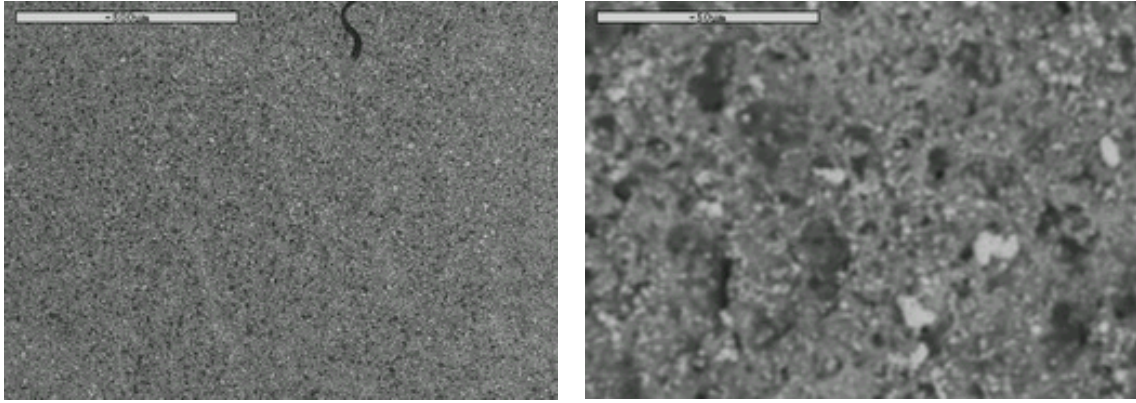


Figura 170. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de RuO₂ (aumento de 100 y de 1000)

Los resultados del análisis de espectros se presentan de dos formas, una gráfica de la concentración de los principales elementos químicos presentes. La concentración se mide en cps (cuentas por segundo) y mediante una tabla donde se indica la concentración absoluta y la relativa a su peso atómico. En este análisis se comprueba la concentración de oxígeno y rutenio y además una elevada concentración de plomo (27%).

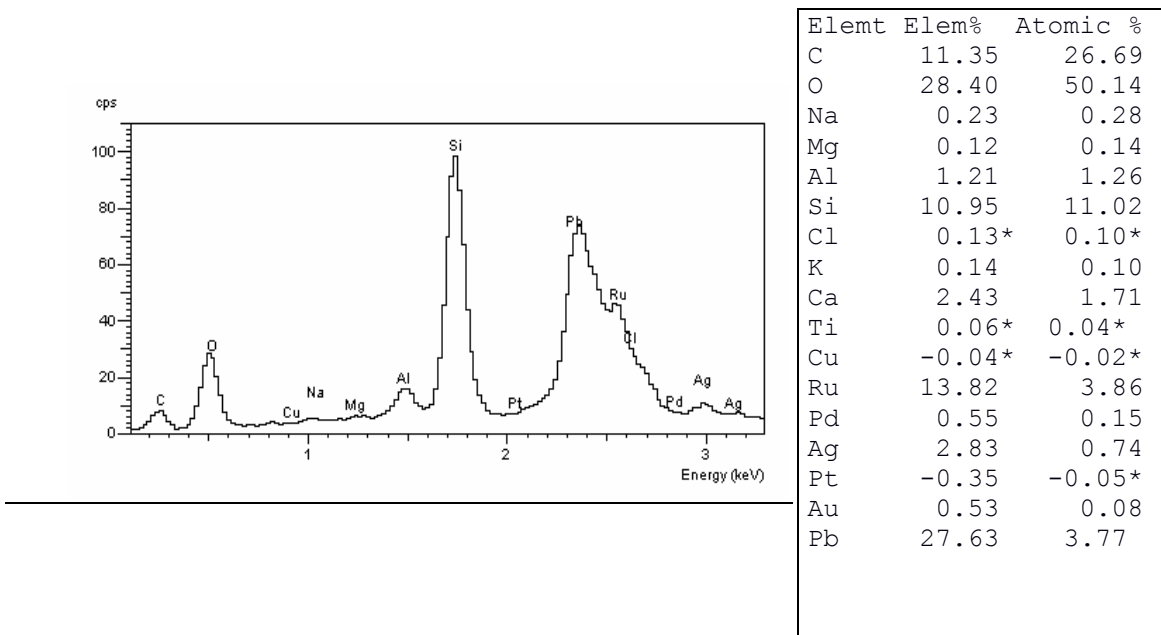


Figura 171. Análisis de espectros de un sensor de RuO₂

4.2 SENSOR DE CARBONO

La superficie del sensor en una vista con 100 aumentos muestra un aspecto uniforme de color negro.

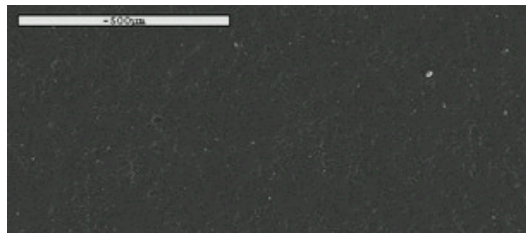


Figura 172. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de C

En el análisis de espectros se comprueba la alta concentración de carbono (72,1%), lo que comprueba la pureza de este sensor.

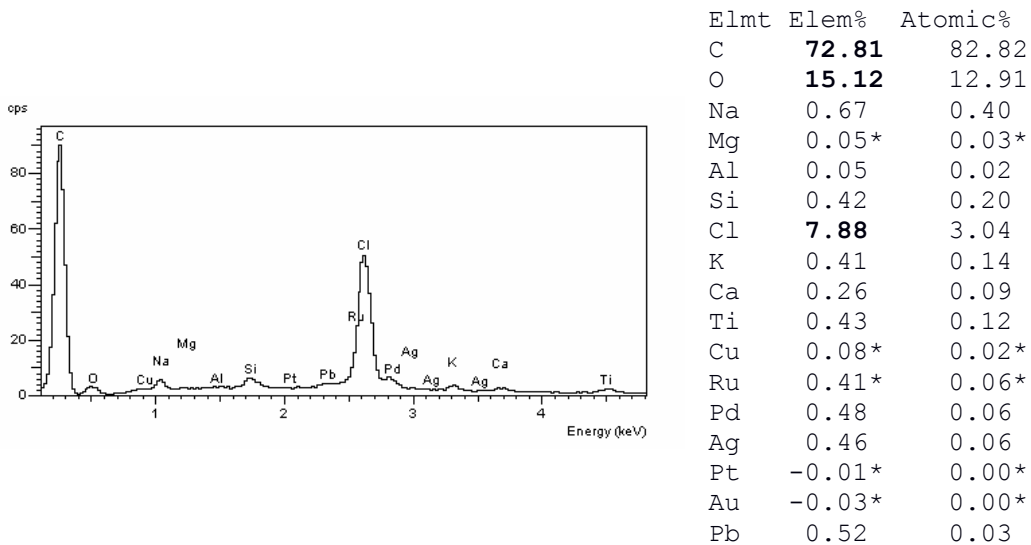


Figura 173. Análisis de espectros de un sensor de carbono

4.3 ELECTRODO DE PLATA

El aspecto de la superficie del electrodo de plata presenta el aspecto que muestra la **Figura 174**. En la vista con 1000 aumentos se observa una superficie rugosa con huecos y hendiduras.

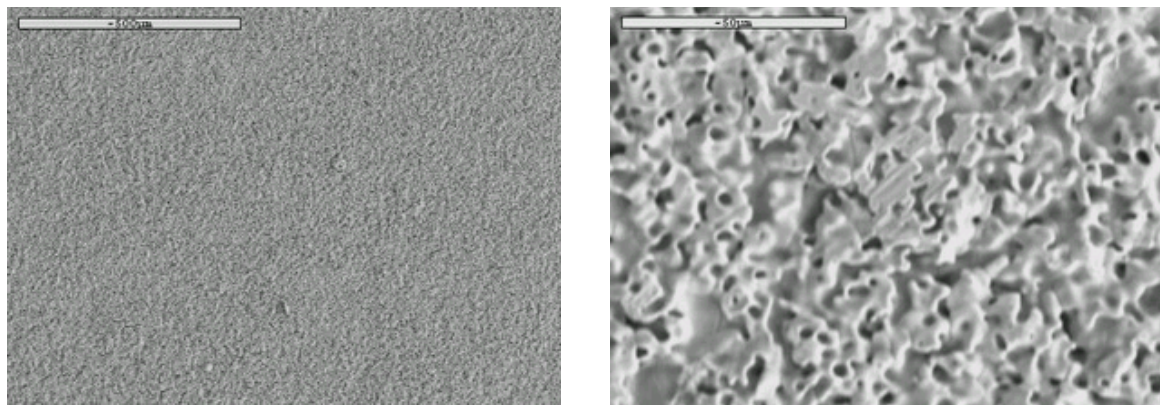


Figura 174. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de Ag (aumento de 100 y de 1000)

El análisis de espectros muestra la gran pureza de este electrodo, donde se llega a una concentración de más del 80% de plata. Otros elementos son el oxígeno y el carbono que suele participar como elementos estructurales

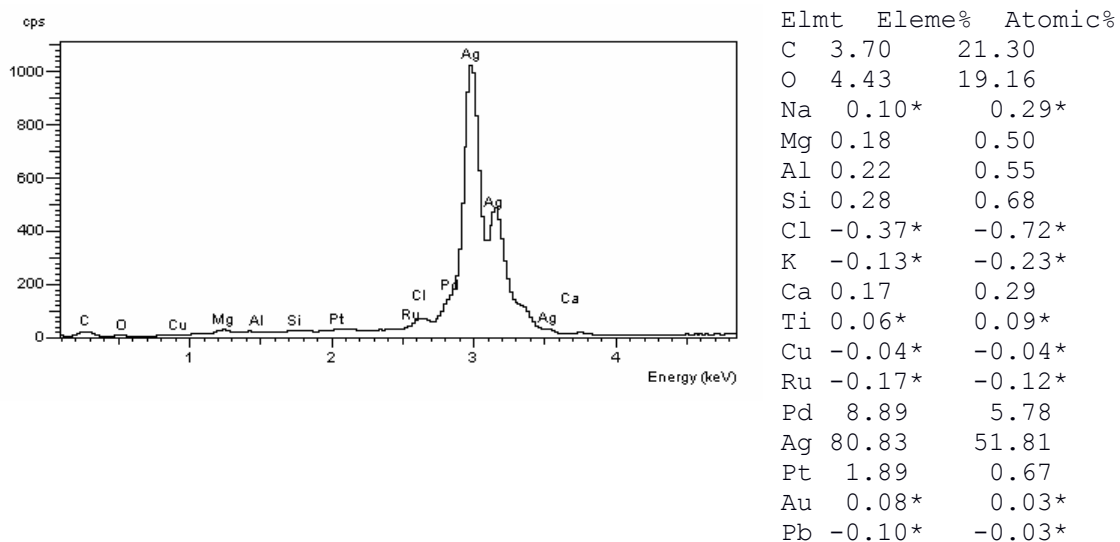


Figura 175. Análisis de espectros de un sensor de plata

4.4 ELECTRODO DE ORO

El aspecto de la superficie del electrodo de oro presenta el aspecto que muestra en la **Figura 176**, con aumentos de 100 y de 1000. En ellas se observa una superficie menos rugosa que la plata.

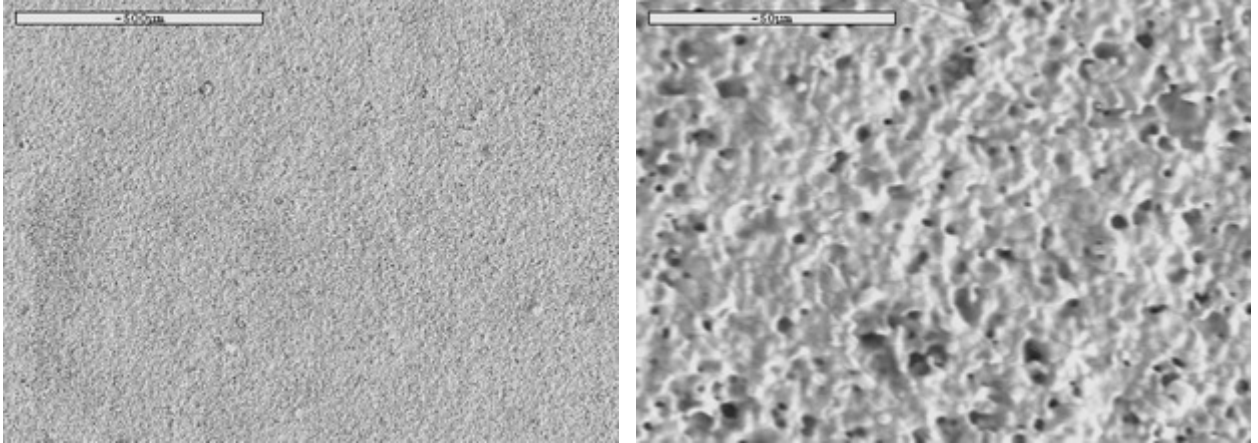


Figura 176. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de oro (x100 y x1000)

En el análisis de espectros se observa una elevada concentración de oro (58,77%), aunque también considerable presencia de plata (15,96%) y paladio (8,49%). Los elementos oxígeno y carbono corresponde a las sustancias aglutinantes de las pastas.

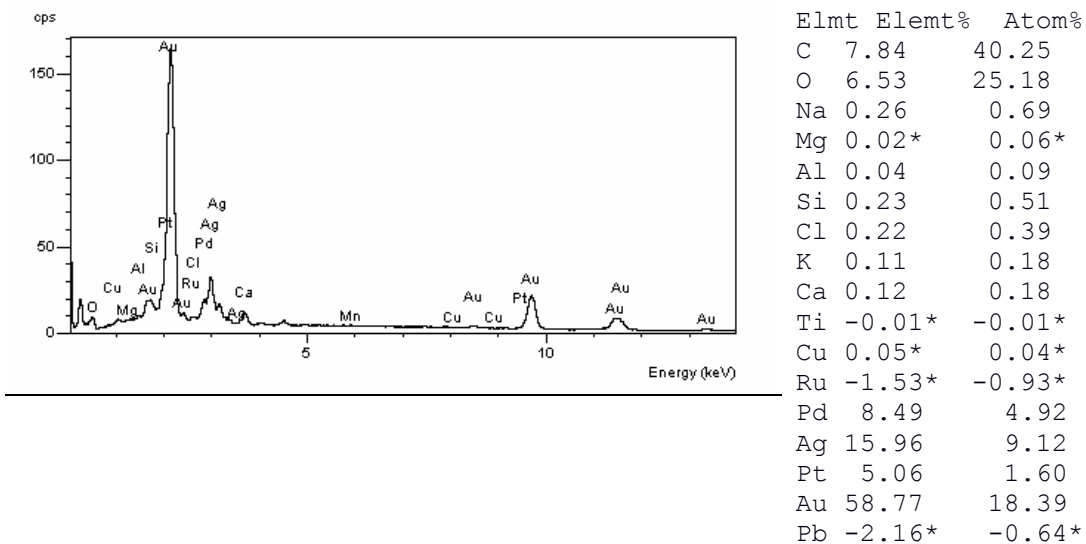


Figura 177. Análisis de espectros de un sensor de oro

4.5 ELECTRODO DE PALADIO

El electrodo de paladio está formado por la pasta con que se construyen las pistas conductoras (Ag/Pd). El aspecto de la superficie con aumento de 100 es similar a la de la pasta de plata, con un aspecto granulado.

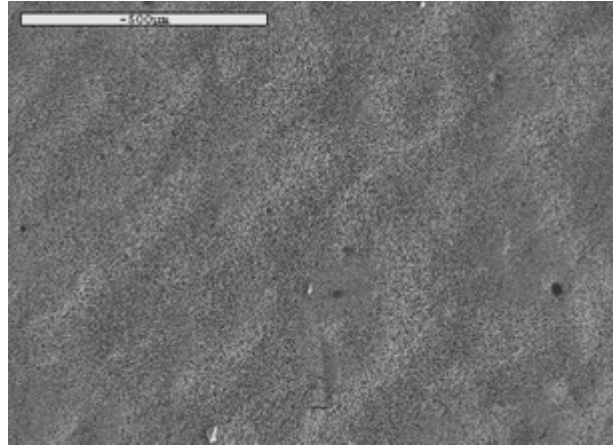


Figura 178. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de Pd (100 aumentos)

El análisis de espectros demuestra la alta proporción de plata (47,94%) y de paladio (21,61%). Los elementos oxígeno y carbono corresponden a las sustancias aglutinantes de las pastas.

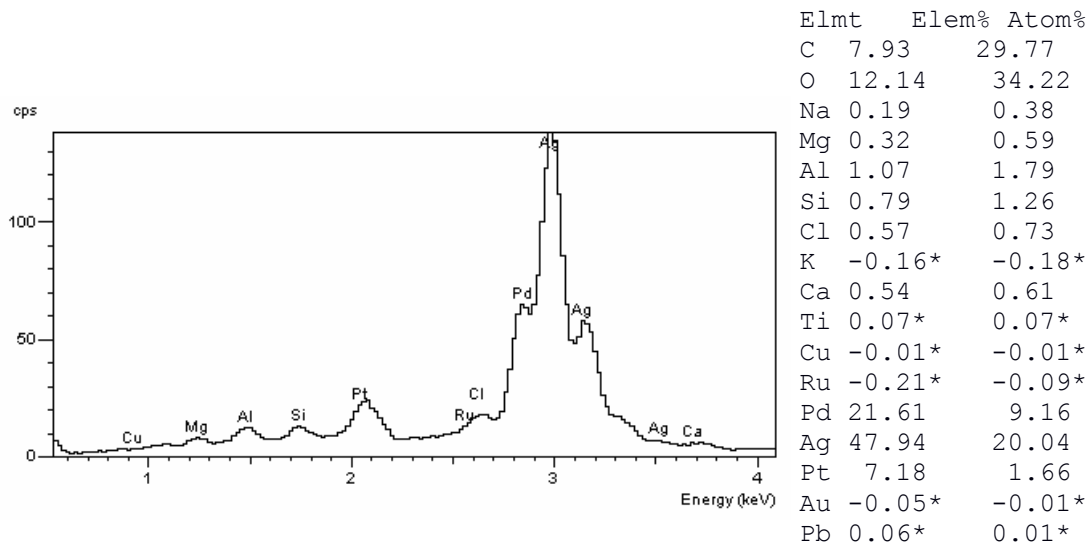


Figura 179. Análisis de espectros de un sensor de oro

4.6 ELECTRODO DE CLORURO DE PLATA

El electrodo de AgCl muestra en vista aumentada a x3000 un aspecto muy granulado.

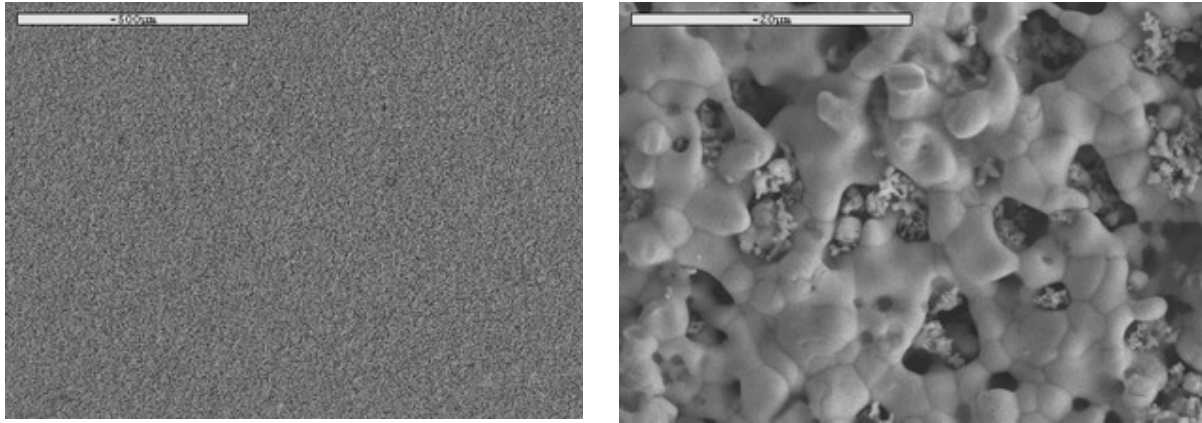


Figura 180. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de AgCl (x100 y x3000)

El análisis de espectros de este electrodo muestra que el elemento predominante es una vez más la plata (76,93%), el cloro se encuentra en una proporción menor (7,1%). Los elementos oxígeno y carbono corresponden a las sustancias aglutinantes de las pastas.

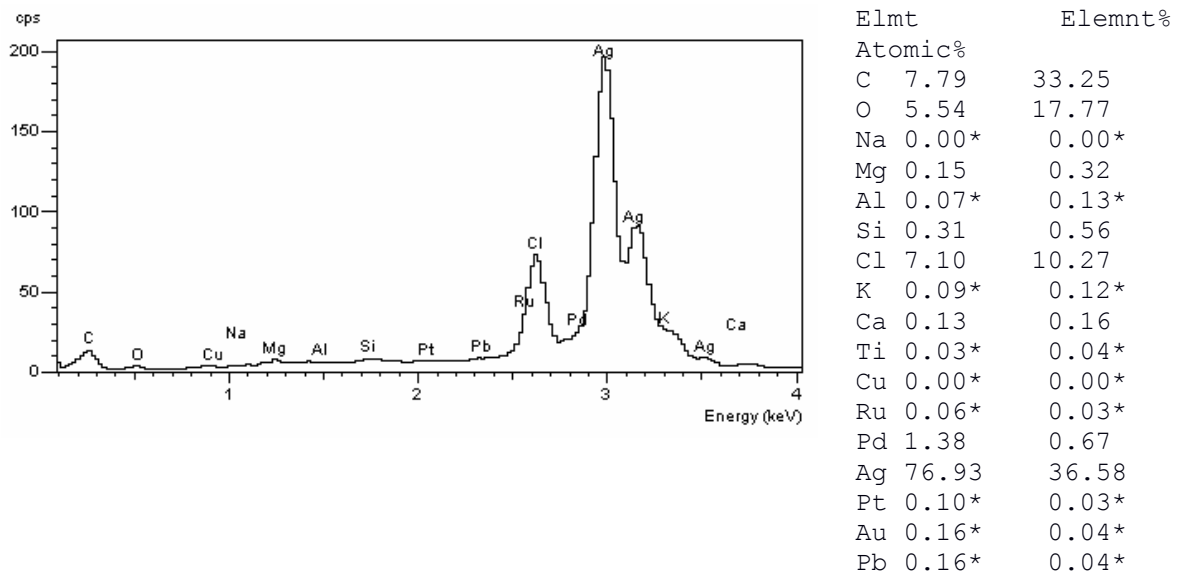


Figura 181. Análisis de espectros de un sensor de AgCl

4.7 ELECTRODO DE COBRE

La **Figura 182** muestra vistas de la superficie del electrodo con aumento de 100 y de 4000. También este electrodo muestra una superficie granulada.

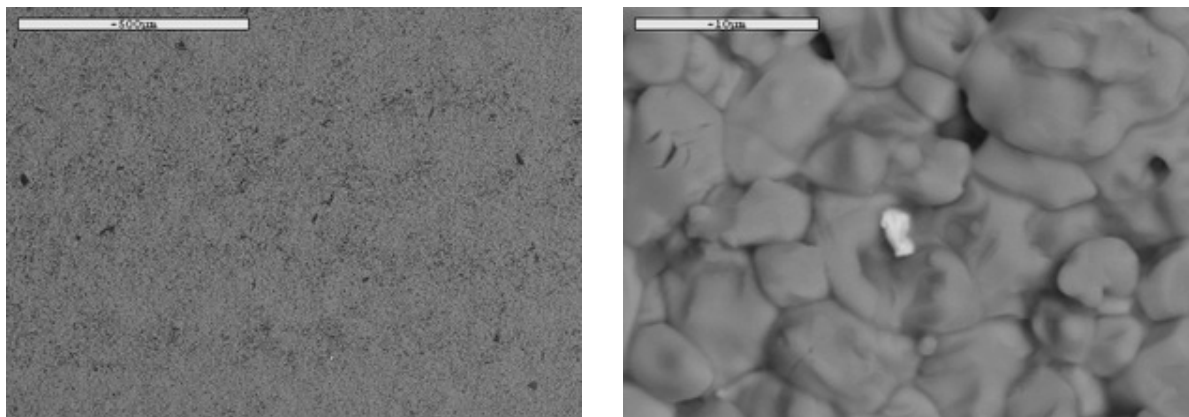


Figura 182. Vista con microscopio electrónico de la superficie de un sensor de Cu (x100 y x4000)

La gráfica del análisis de espectros muestra dos picos de Cu con distinta energía. La concentración total de Cu es del 66,83%. Los siguientes elementos son el carbón y el oxígeno que forma parte de la estructura aglutinante de pasta.

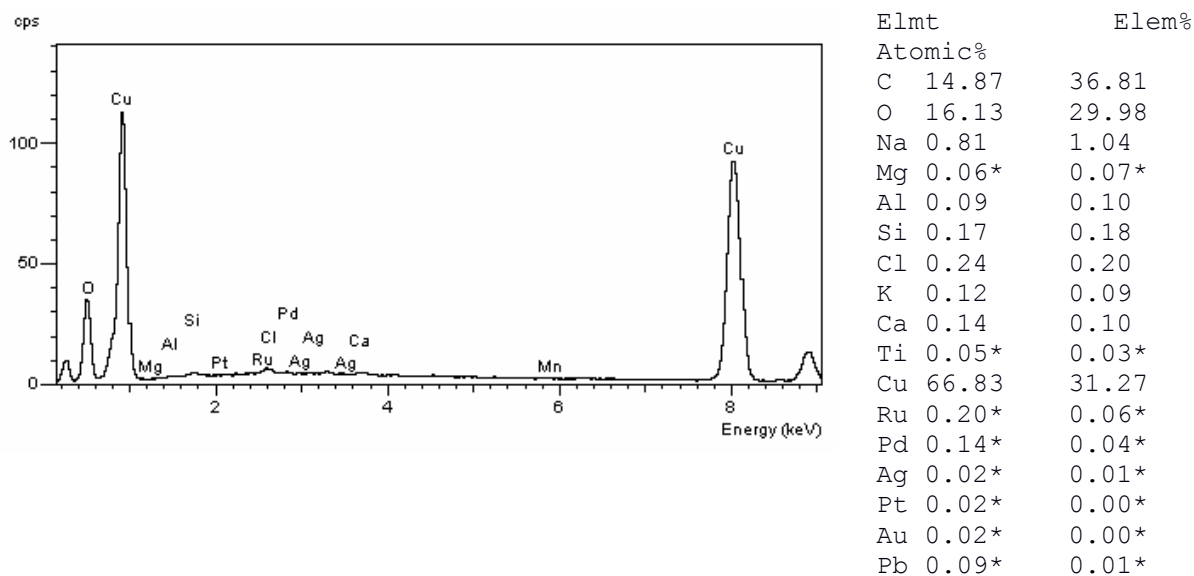


Figura 183. Análisis de espectros de un sensor de Cu

Anexo II. Sistema de Medida

Para realizar las experiencias de esta tesis doctoral se han empleado diversos sistemas de medida. Pero todos los sistemas empleados poseen una estructura general común, ya que la técnica de medida que se ha aplicado ha sido siempre potenciométrica. Pero como se han realizado análisis con distintos tipos de muestras, los sensores también han lo han sido, variando en cantidad, material y forma. El resto del sistema de medida también se ha modificado ligeramente, variando en función de las necesidades de las medidas. No obstante, el esquema general de la cadena de medida ha permanecido, a lo largo de todas las experiencias, bastante inalterable y se detalla en este anexo.

En el capítulo 1 de Introducción se presenta el sistema de medida de lengua electrónica, que está formado por un conjunto de bloques enlazados en forma de cadena, de tal forma que partiendo de la información que captan los sensores se obtiene al final una clasificación o discriminación de las muestras en función de características que sean de interés.

Los bloques que constituye el sistema general de medida están representados en la **Figura 184** y son los siguientes:

- Sensores.
- Sistema de Acondicionamiento de la Señal.
- Sistema de Adquisición de Datos.
- Análisis Multivariante de los datos.

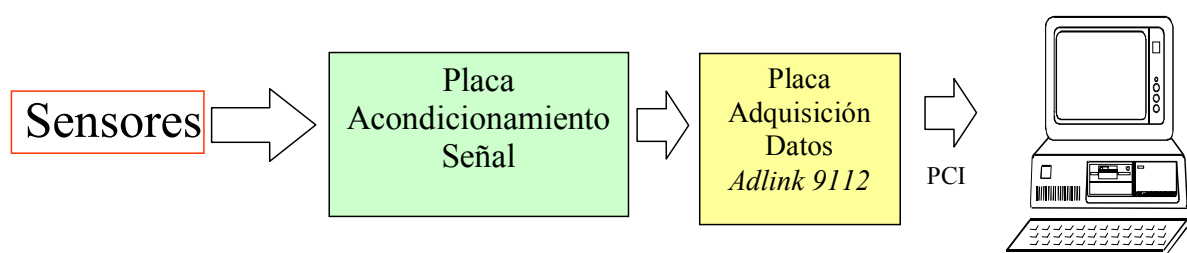


Figura 184. Diagrama de bloques del Sistema de Medida

En este anexo se describen las etapas electrónicas del sistema de medida, es decir el sistema de acondicionamiento de la señal y el de adquisición de datos ya que los sensores se han descrito a lo largo de los capítulos dedicados a cada una de las experiencias.

5 ACONDICIONAMIENTO DE LA SEÑAL

La señal eléctrica que genera un sensor de tipo potenciométrico, aun teniendo dimensiones de tensión eléctrica, posee características que dificultan su medida de forma directa. Esta dificultad estriba en la debilidad de la señal generada, con baja amplitud. Además, muchos electrodos poseen gran impedancia de salida, lo que conlleva que la señal generada sea muy sensible al ruido eléctrico. Por este motivo, se incorpora en la cadena de medida una etapa que realiza un acondicionamiento de la señal eléctrica procedente del electrodo para adecuarla al posterior sistema de adquisición de datos.

Para lograr el acondicionamiento de señal potenciométrica se diseñó un sistema compuesto fundamentalmente por dos partes: una primera etapa de **muy alta impedancia de entrada** y baja impedancia de salida y una segunda etapa de **filtrado para eliminar el ruido** procedente de la red eléctrica (50 Hz), así como otras señales de ruido de alta frecuencia. Para obtener un sistema con las características reseñadas, la primera tarea es la búsqueda de sistemas comerciales que realicen las tareas propuestas, pero en el mercado de dispositivos electrónicos no se encuentran elementos con las características adecuadas. Además hay que tener en cuenta que se va a trabajar con un número considerable de electrodos. Por este motivo se decide la construcción de un sistema electrónico con las cualidades óptimas para el tipo de medida a realizar.

Para construir el sistema electrónico de acondicionamiento de la señal, una decisión inicial es determinar el número de canales de medida. Este número está condicionado por el sistema de adquisición de datos. La placa utilizada es de 16 canales, luego este era el número de canales que en principio debe tener el sistema de acondicionamiento de la señal. Además hay que tener en cuenta el rango de tensión del potencial de los electrodos, que suele estar en el rango de ± 1 V.

5.1 PRIMERA ETAPA: AMPLIFICADOR DE ALTA IMPEDANCIA DE ENTRADA

Para realizar la primera etapa se buscan amplificadores operacionales con características electrométricas, es decir con impedancias de entrada del orden de T Ω y muy baja corriente de polarización de los transistores de entrada. De los productos existentes en el mercado español se eligió el C.I. LMC6001 de *National Semiconductor*, formado por un solo amplificador electrométrico, con impedancia de entrada de $10^{15} \Omega$, corriente de polarización de 25 fA y tensión de alimentación de ± 5 V funcionando con conexión de amplificador no inversor de ganancia unidad. (**Figura 185**)

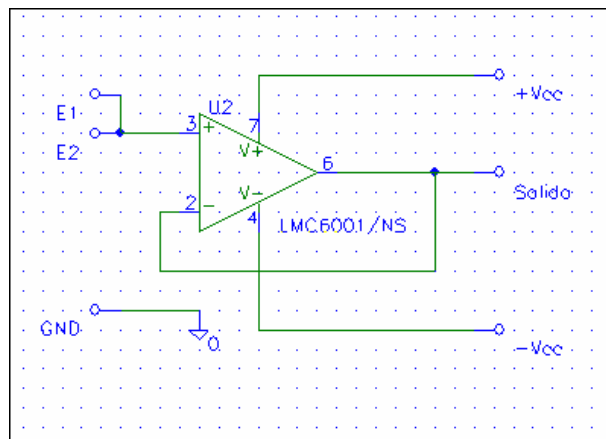


Figura 185. Amplificador de Alta Impedancia conectado en modo amplificador no inversor

Para realizar las conexiones necesarias de los 16 amplificadores se construyó una placa de circuito impreso con pistas a doble cara cuyo esquema se muestra en la **Figura 186**. Esta placa se obtiene con el programa informático *Microsym 6.1*. En esta figura se puede observar los 16 circuitos integrados de 8 patillas con conectores de entrada y salida, duplicador para conexión con cable suelto para cada canal y para cable plano conjunto de todos los canales. También se ha incorporado un anillo para el conector del electrodo de referencia.

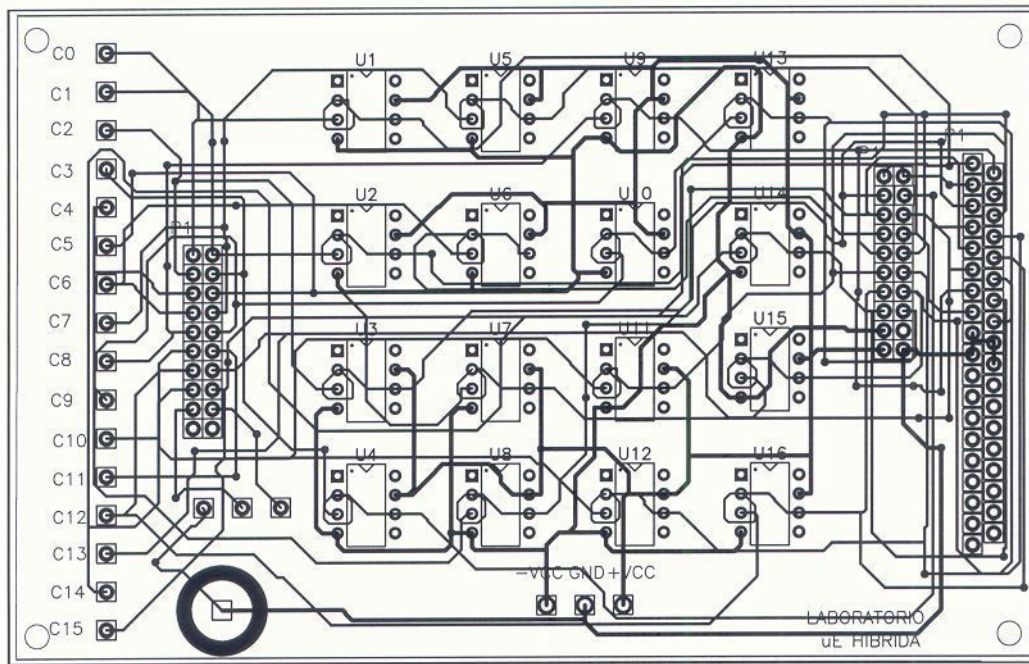


Figura 186. Plano de Circuito Impreso para placa de filtros

5.2 SEGUNDA ETAPA: FILTROS

La segunda etapa tiene como misión eliminar los ruidos procedentes de la red eléctrica. En un principio, se realizó un filtro de rechazo de banda para eliminar las señales de 50 Hz, pero se comprobó que también existen otras señales de ruido de frecuencia diferente. Por este motivo, se decidió construir un filtro pasa-baja, que permitiera pasar la señal útil que sea de frecuencia muy baja, y que atenuara todas las demás. Para determinar cual era la frecuencia de corte del filtro se tiene en cuenta que la frecuencia de muestro de la placa de adquisición de datos va a ser 5 seg por muestra (0,2 Hz), con lo cual una frecuencia de corte de 1Hz es adecuada. Para construir el filtro se utiliza un filtro de segundo orden de tipo Butterworth, cuyo esquema se representa en la **Figura 187**. Este filtro tiene como características principales, ganancia plana durante la banda pasante, una caída de la ganancia de 3 dB en la frecuencia de corte y una pendiente de caída de la ganancia con respecto a la frecuencia en la banda rechazada de 40 dB/década.

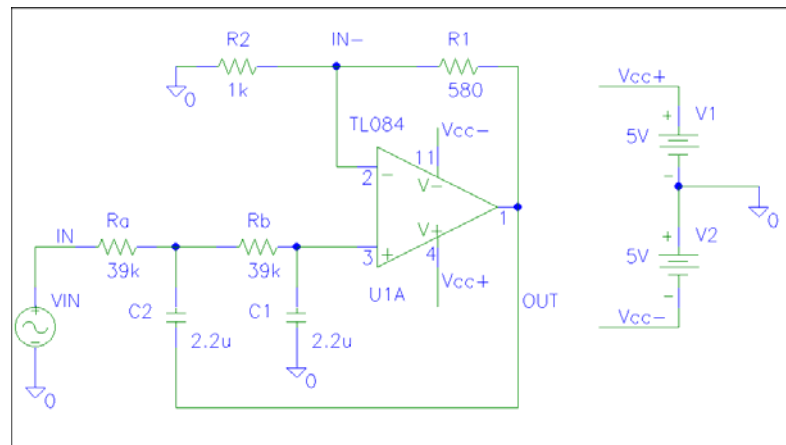


Figura 187, Filtro de Butterworth

El diseño del filtro consiste en el cálculo del valor de sus resistencias y condensadores, que viene determinado por las siguientes expresiones:

$$\tau = 2 \cdot \pi \cdot f = \frac{1}{R \cdot C} \Rightarrow R \cdot C = \frac{1}{2 \cdot \pi \cdot f} = \frac{1}{2 \cdot 3.14} = 0,159$$

Tomando $C = 2,2 \mu\text{F} \Rightarrow R = 39 \text{ k}\Omega$

Los filtros de Butterworth tiene una ganancia de $A = 1,54$, por lo que las resistencias de amplificación son: $A = 1 + R1/R2$, tomando $R1 = 1 \text{ k}\Omega$, el valor normalizado más cercano de $R2 = 580 \Omega$

Para comprobar sus efectos sobre la señal medida se realiza una simulación del circuito con el programa *Pspice*. La simulación consiste en un análisis de tipo alterna (AC) con un barrido desde 100 mHz hasta un 1 kHz, en él se observa que a 50 Hz tiene una caída de 53,2 dB, que se puede considerar suficiente para eliminar el ruido eléctrico procedente de la red de suministro eléctrico y para 200 mHz la ganancia es prácticamente igual que la máxima.

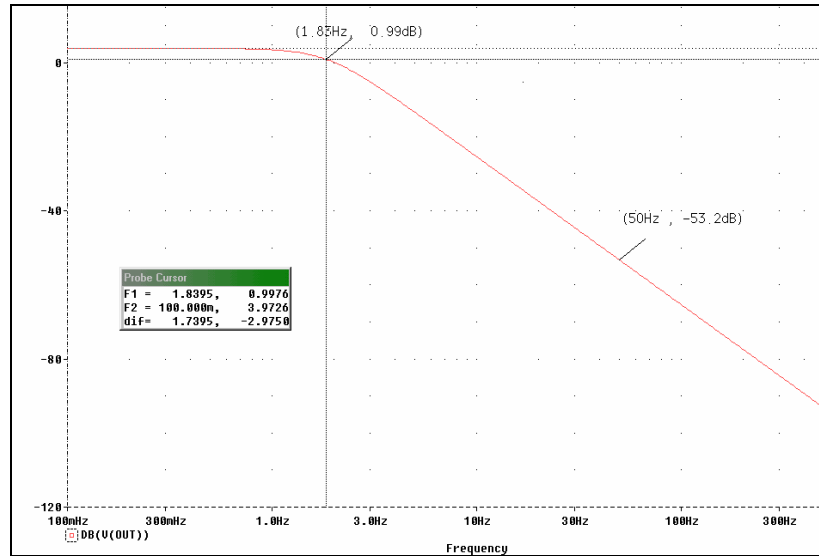


Figura 188. Simulación de respuesta del filtro

Para realizar los filtros se utilizaron amplificadores operacionales con entrada JFET, para reducir el espacio se utilizó el circuito integrado (C.I.) TL084 que contiene 4 amplificadores operacionales, por lo que hizo falta 4 C.I. De forma similar a la etapa anterior, se construyó una placa de circuito impreso para los 16 filtros pasa bajo cuyo plano se muestra en la **Figura 189**.

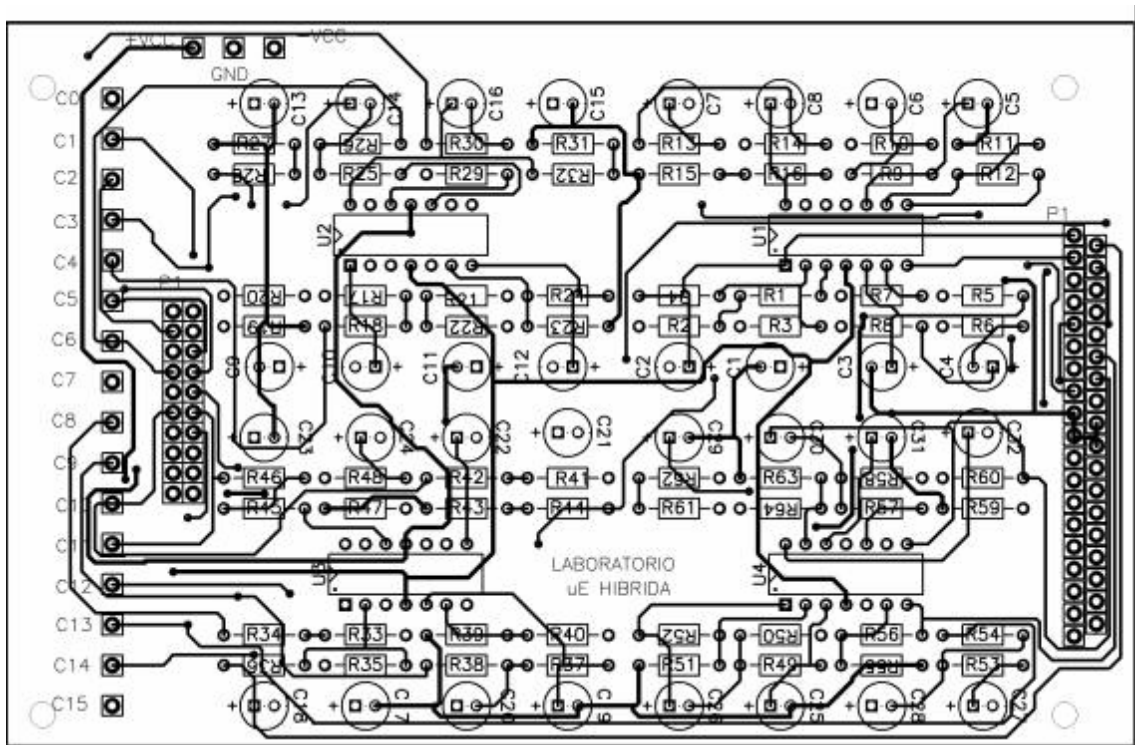


Figura 189. Plano de Circuito Impreso para placa de filtros

En la **Figura 190** se muestra el interior del sistema electrónico de acondicionamiento de la señal, con las dos placas de circuito impreso, que se acaban de describir, y la fuente de alimentación.

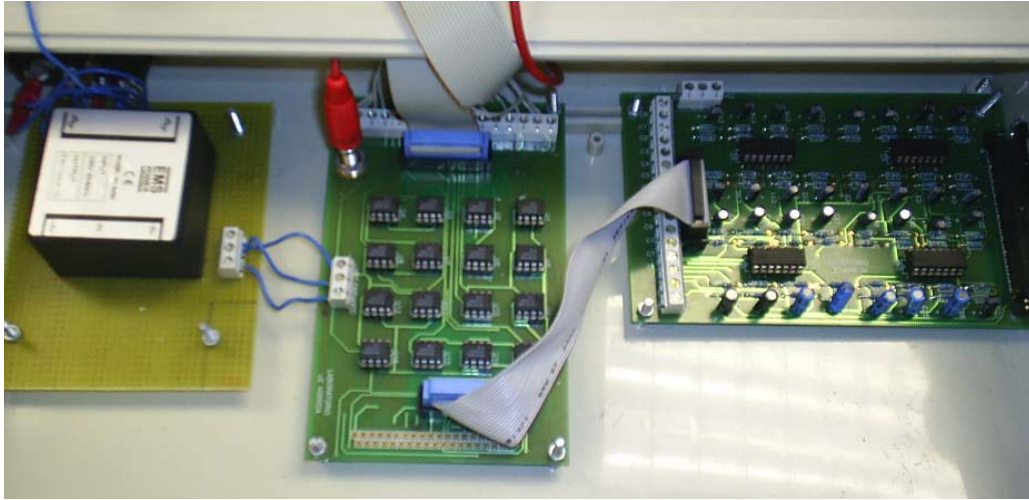


Figura 190. Prototipo de Sistema de Acondicionamiento de la Señal

5.3 CALIBRADO DEL SISTEMA ACONDICIONADOR

Una vez concluidos la construcción del sistema de acondicionamiento de la señal, falta realizar el calibrado para compensar la ganancia teórica de los filtros de Butterworth ($A=1,54$), así como los errores debido a la falta de precisión de los componentes de resistencias, a pesar de que se utilizaron componentes con tolerancia de solo el 1%.

Los valores de ganancia real para cada canal fueron:

A0: 1,5656	A4: 1,5620	A8: 1,5605	A12: 1,5991
A1: 1,5605	A5: 1,5584	A9: 1,5609	A13: 1,5610
A2: 1,5606	A6: 1,5630	A10: 1,5623	A14: 1,5612
A3: 1,5649	A7: 1,5607	A11: 1,5604	A15: 1,5602

La compensación se realizó por software en el programa de adquisición de datos.

5.4 MULTIPLEXACIÓN DE ENTRADAS

En algunas de las experiencias realizadas, el número de electrodos necesarios es superior al de entradas disponibles por el sistema de adquisición de datos. Para solucionar el problema se realizó un sistema de multiplexación de entradas, de forma que varios electrodos compartan un mismo canal de la placa de adquisición de señal y tengan acceso a ella por turnos. Para conseguir este objetivo se construyó una placa de circuito impreso con los componentes electrónicos digitales necesarios para conseguir la multiplexación de señales. Las entradas de selección correspondieron las salidas digitales de la placa de adquisición de datos.

6 SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE DATOS

La adquisición de datos consiste en la captura de las señales eléctricas procedentes de los diferentes sensores y su almacenamiento en un ordenador. El elemento primordial para la adquisición de datos es **una tarjeta multicanal de adquisición de datos**. Este sistema permite de forma automática la visualización de la información en la pantalla del ordenador en tiempo real, así como su almacenamiento para un posterior tratamiento matemático.

La tarjeta de adquisición de datos se inserta en un *slot* de bus PCI de un ordenador personal PC. La tarjeta que se utilizó en los experimentos es de la marca ADLINK[®] modelo PCI-9112.

6.1 TARJETA DE ADQUISICIÓN DE DATOS PCI – 9112

La tarjeta PCI-9112 es una tarjeta de adquisición de datos basada en la arquitectura Bus PCI de 32 bits.

Características:

- Entrada analógica con 12 bits de resolución.
- Memoria A/D FIFO en la placa.
- Auto-escáner en la selección de canal.
- Muestreador y retención (S&H) en chip.
- Ganancia programable de x0,5; x1; x2; x4; x8.

- 16 canales de salida digital.
- 16 canales de entrada digital.
- contadores de 16 bits programables independientemente.
- Tres modos de disparo del convertidor A/D.
- Convertidor integrado DC-DC para obtener una fuente de alimentación analógica estable.
- Conector tipo D de 37 pines.
- Tamaño compacto.

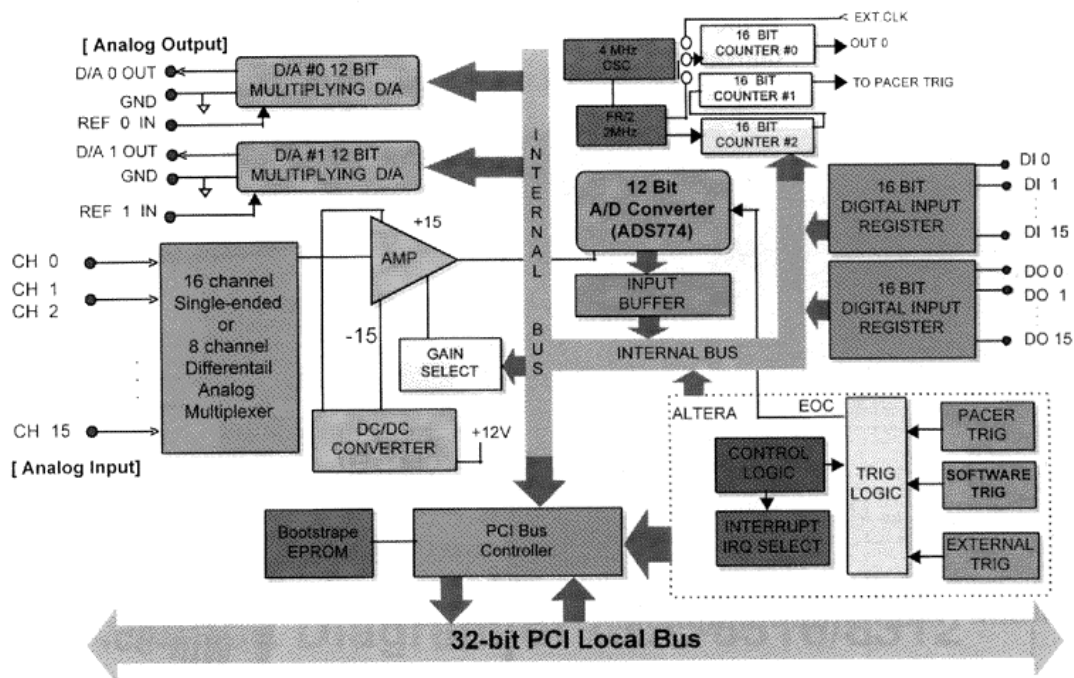


Figura 191. Esquema de bloques de la tarjeta de adquisición de datos PCI-9112

Para la aplicación que nos lleva a cabo, adquisición de datos de los sensores, usaremos las entradas analógicas.

Especificaciones de las Entradas Analógica (A/D):

- Convertidor: B.B. ADS774 del tipo de aproximaciones sucesivas
- Canales de entrada: 16 sencillos u 8 diferenciales (Controlado por switch)
- Resolución: 12 bits
- Rango de Entrada: (Controlado por Software)

Bipolar: $\pm 10\text{ V}$, $\pm 5\text{ V}$, $\pm 2,5\text{ V}$, $\pm 1,25\text{ V}$, $\pm 0,625\text{ V}$

Unipolar: 0~10 V, 0~5 V, 0~2,5 V, 0~1,25 V

- Tiempo de Conversión: 8 μ seg.
- Protección contra sobretensión: Continúa \pm 30 V max
- Precisión:
 - Ganancia: 0,5; 1 \Rightarrow 0,01% de FSR \pm 1 LSB
 - Ganancia: 2; 4 \Rightarrow 0,02% de FSR \pm 1 LSB
 - Ganancia: 8 \Rightarrow 0,04% de FSR \pm 1 LSB
- Impedancia de entrada: 10 M Ω
- Modo de Disparo: Software, Timer Pacer, y External trigger
- Transferencia de datos: controlado por programa, Interrupciones, DMA
- Frecuencia de adquisición: 110 kHz (máximo)

Las entradas analógicas se obtienen a través de un conector específico denominado CN3.

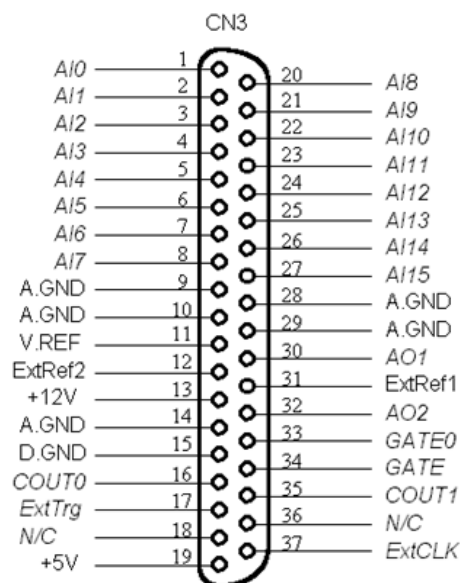


Figura 192. Asignación de pines del conector CN3

En la **Figura 193** se muestra el circuito equivalente de las entradas analógicas de forma unipolar junto a la fuente correspondiente a la señal medida.

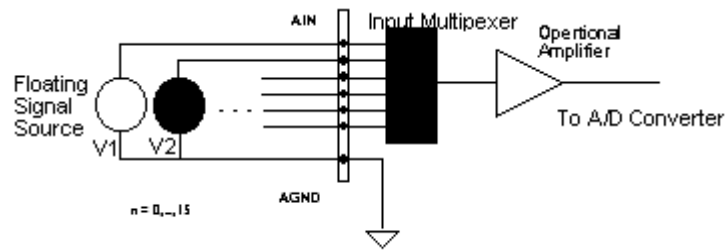


Figura 193. Fuente flotante y entrada no diferencial

6.1.1 Programas de Captura, Monitorización y Almacenamiento de Datos con VEE-Pro

Para visualizar y registrar los datos aplica el lenguaje de programación visual VEE Pro[®]. Este lenguaje contiene un entorno gráfico que permite la representación en pantalla de las trazas de cada electrodo con tiempo de muestreo programado por el usuario. El programa permite guardar el valor de cada medida de forma automática en un fichero ASCII.

El programa VEE-Pro tiene carácter modular, es decir está formado por distintos módulos que realizan tareas específicas que pueden configurarse. Los módulos se conectan entre si por medio de líneas de conexión. El programa posee dos pantallas, una para realizar el programa y otra con la representación que va a necesitar el usuario para realizar las medidas. A lo largo de la tesis se ha realizado diversos programas variando según las características de las experiencias. Las variaciones afectan al número de canales, multiplexación de canales, forma de muestreo, representación en pantalla, forma de almacenamiento en fichero, etc. Al no ser un lenguaje textual sino con objetos la documentación de los programas realizados es difícil indicarla en esta memoria. Pero a título de ejemplo breve, se representa un programa de captura de 4 canales.

En la **Figura 194** se representa el organigrama de las tareas principales, que consisten en una configuración y activación de la tarjeta de adquisición de datos PCI-9112 y a continuación los procesos de lectura de los canales activos de las entradas de la tarjeta, con posibilidad de realizar un promediado de varias medidas, calibración de las medidas, representación gráfica de las señales y almacenamiento en fichero junto con los datos de fecha y hora. Este proceso se repite de forma cíclica mientras no se active el

botón de FIN, que en tal caso se desactiva la tarjeta de adquisición de datos y el programa finaliza.

En la **Figura 195** se muestra el programa de objetos, donde se puede observar la relación entre los distintos bloques y la tarea del organigrama ayudado por coincidencia de colores (*AI_VreadChanel* para la captura de canales, *Trigger every* para determinar el tiempo de disparo, *To file*, para escribir en fichero, *CANALES 0-3* para representación en pantalla, etc.)

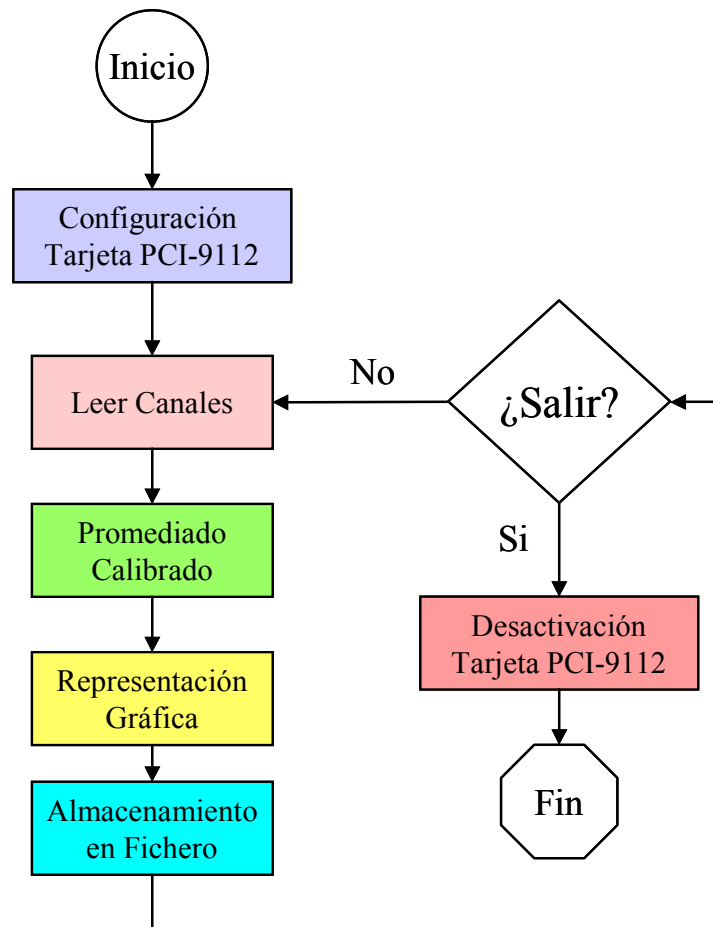


Figura 194. Organigrama VEE-Pro

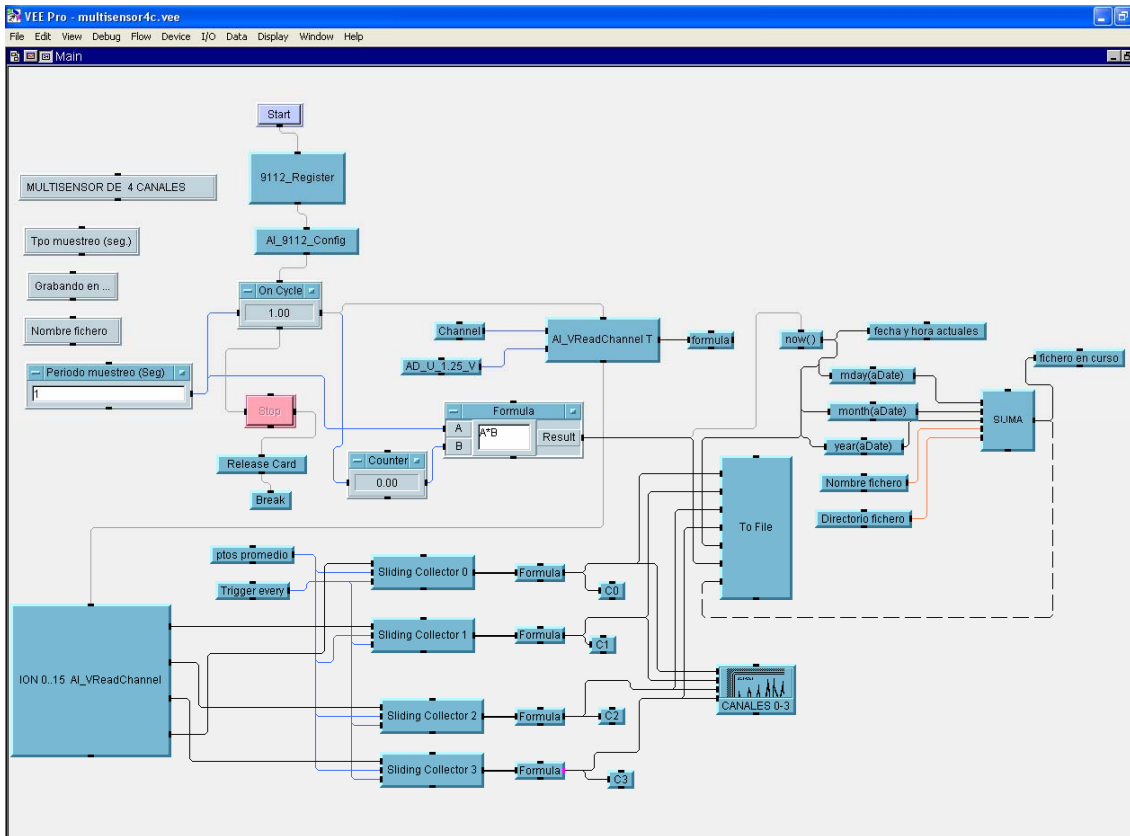


Figura 195. Esquema de un programa de captura, monitorización y almacenamiento de datos con VEE Pro

En la Figura 196 se muestra la pantalla para el usuario donde se muestra la representación gráfica de los canales, valores numéricos y control de inicio y final de la medida.

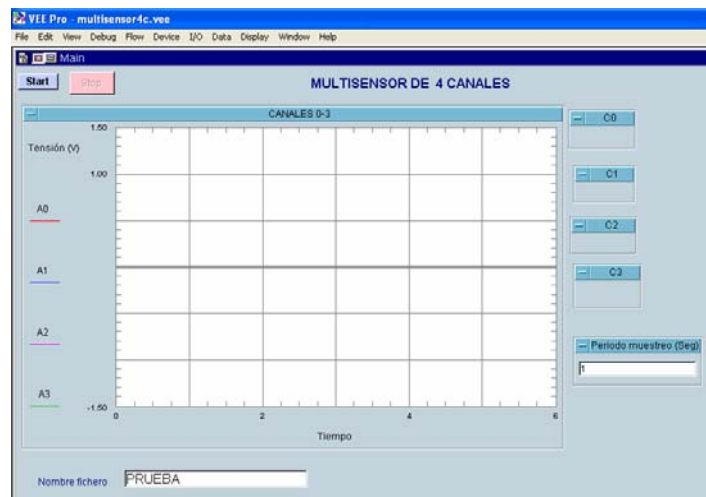


Figura 196. Pantalla del programa VEE-Pro de la Figura 195

En la **Figura 197** se muestra el aspecto de la pantalla de ordenador con el programa funcionando con la representación de las trazas de cada electrodo en tres ventanas para diversas muestras.



Figura 197. Aspecto de la pantalla de medidas para distintas muestras

Una vez realizado las distintas etapas del sistema de medida, la última fase es la conexión de todas ellas, comprobar su correcto funcionamiento y la calibración de cada uno de sus canales.

Referencias

<i>Primer Autor</i>	<i>Año</i>	<i>Nº referencia</i>	<i>Página</i>
Adhoum, N.	2003	339	229
Álvarez Santos, R.	1988	371	327
Apetrei, C.	2004	230	129
Apetrei, C.	2005	235	130
Apetrei, C.	2006	236	130
Arrieta, A.	2004	229	128
Arroyo, T.	2004	280	180
Artursson, T.	2002 - a	215	125
Artursson, T.	2002 - b	214	125
Atanasov, P.	1992	79	55
Atkinson, J.K.	1994	82	55
Atkinson, J.K.	1999	345	244
Auge, J. P.	1995	255	138
Bakker, E.	2005	20	9
Ballantine, D.	1997	38	20
Barat, J.M.	2006	29	12
Bardócz, S.	1995	320	224
Bargagna, G.	2000	110	89
Belford, R.E.	1987	77	57
Bell Jr., D.T	1976	36	20
Béné, A.	2001	325	228
Beullens, K	2006	176	114
Bigelow, W.C.	1946	365	317
Bilitewski, U.	1992 - a	80	57
Bilitewski, U.	1992 - b	76	57
Bilitewski, U.	1992 - c	75	57
Bishop, C. M.	1995	100	80
Bleimaum, R.	2002	264	140
Boknaes, N.	2002	326	228
Bremmer. H.A.	2000	296	212
Brezmes, J.	1997	27	11
Brezmes, J.	2000 - a	7	2
Brezmes, J.	2000 - b	28	11
Brezmes, J.	2002 - a	362	291
Brezmes, J.	2002 - b	125	97

Referencias

Brink, B.	1990	319	223
Bristol, T.	1974	37	20
Buehler, M.	2002	238	132
Buffle, J.	2005	66	47
Bugueño, G.	1999	347	253
Buratti, S.	2004	241	132
Buratti, S.	2007	242	132
Burns, B.	1985	312	220
Calvo, D.	2007	197	118
Camman, K.	1979	1	1
Campitelli, A.	1998	250	136
Carpenter, G.		120	92
Carpenter, G.	1987 - a	119	92
Carpenter, G.	1987 - b	118	91
Carpenter, G.	1991- a	122	94
Carpenter, G.	1991 - b	121	93
Carpenter, G.	1992 - a	123	94
Carpenter, G.	1992 - b	363	296
Chang, R.	1998	12	4
Ciosek, P.	2004 - a	180	115
Ciosek, P.	2004 - b	181	115
Ciosek, P.	2005	182	116
Ciosek, P.	2006 - a	187	117
Ciosek, P.	2006 - b	185	116
Ciosek, P.	2006 - c	189	117
Ciosek, P.	2006 - d	188	117
Ciosek, P.	2006 - e	184	116
Ciosek, P.	2006 - f	183	116
Cole, M.	2002	251	136
Connell, J. J.	1995	318	223
Cortina, M. A.	2005	194	118
Cosio, M. S.	2007	243	133
Craston, D.H.	1991	78	57
de Saja, R.	1999	328	229
Deisingh, A. K.	2004	41	19
D'Este, G.		271	172
Di Natale, C.	1996 - a	153	109
Di Natale, C.	1996 - b	272	177
Di Natale, C.	1997	273	178

Di Natale, C.	2000 - a	173	113
Di Natale, C.	2000 - b	5	2
Di Natale, C.	2000 - c	174	113
Di Natale, C.	2001 - a	302	215
Di Natale, C.	2001 - b	152	109
Di Natale, C.	2001 - c	333	229
Di Natale, C.	2004	202	120
dos Santos Jr, D.	2003	247	135
Duda, R. O.	2000	95	74
Dufour, E.	2003	327	228
Durán, A.	2006	196	118
Edelmann, A.	2001	45	20
Edelmann, A.	2002	46	20
Eisenman, G.	1957	58	33
Esbensen, K.	2004	167	112
Escriche, I.	2001	349	254
Ferguson, S.	1987	306	217
Ferroni, M.	1997	70	51
Flink, S.	2000	342	233
Franceschini, N.	2004	49	23
Fukunaga, T.	1996	138	106
Gallardo, J.	2003	190	117
Gallardo, J.	2004	192	118
Gallardo, J.	2005 - a	198	119
Gallardo, J.	2005 - b	191	118
García, M.	2006 - a	290	181
Garcia, M.	2006 - b	6, 282	2, 180
García-Acosta, B.	2004	370	325
Gardner, J.W.	1991	93	70
Gardner, J.W.	1992	2	1
Gardner, J.W.	1994	4	2
Gelman, A.	2003	336	230
Getino, J.	1997	275	178
Gil, L.	2006	270	169
Gill, T.	1990	354	276
Goodey, A.	2001	43	20
Grossberg, S.	1980	117	91
Guadarrama, A.	2000	289	181
Guilbault, G.	1988	253	137

Referencias

Gutés, A.	2005 - a	221	125
Gutés, A.	2005 - b	193	118
Gutés, A.	2005 - c	195	118
Gutés, A.	2006 - a	56	25
Gutés, A.	2006 - b	200	119
Gutiérrez. A.	2002	8	2
Gutierrez-Osuna, R.	1999	237	131
Gutiérrez-Osuna, R.	2002	90	60
Hammond, J. B.	2002	334	230
Han, J.	2001	99	75
Hart, J.P.	1994	85	57
Hauptman, P.	1991	32	19
Hauptmann, P.	2000 - a	257	138
Hauptmann, P.	2000 - b	31	18
Hayashi, K.	1990	130	101
Hollingworth, T. A.	1990	317	222
Holmin, S.	2001	213	125
Holmin, S.	2004	224	127
Homola, J.	1999	50	23
Homola, J.	2005	51	23
Horrillo, M. C.	1997	274	178
Huss, H. H.	1976	299	214
Huss, H. H.	1979	305	217
Huss, H. H.	1980	307	217
Huss, H. H.	1995	311	220
Huss, H. H.	1997	298	213
Iliev, B.	2006	351, 228	271, 128
Imamura, T.	1996	136	105
Ivaesson, P.	2001 - a	212	125
Ivarsson, P.	2002 - b	226	127
Ivarsson, P.	2005	223	127
Jackson. J.	1981	92	69
Jackson. J.	1991	94	73
Janata, J.	1998	53	23
Jason, A.	1975	300	215
Jimenez, C.	2002	30	17
Ju, M-JK.	2003	142	106
Kaneki, N.	2004	338, 361	231, 283
Karube, I.	1984	314	221

Kawamura, Y.	1987	11	4
Kenber, P.	1981	63	45
Kent, M.	2004	335	230
Klook, J.	2002	164	111
Köblinger, C.	1992	254	137
Kolody, M.	2003	239	132
Krantz-Rulker, C.	2001	217	125
Kyrana, V. R.	1997	353, 346	275, 252
Lavigne, J. J.	1998	42	20
Lavine B.	1998 – a1	88, 369	59, 323
Lavine. B.	2000	89	59
Lee, J.	2004	23	11
Legin, A.	1993	146	108
Legin, A.	1994	147	108
Legin, A.	1996 - a	154	109
Legin, A.	1996 - b	148	108
Legin, A.	1997	9, 158	2, 110
Legin, A.	1999 - a	162	110
Legin, A.	1999 - b	160	110
Legin, A.	1999 - c	201	120
Legin, A.	2000	159	110
Legin, A.	2002 – a	126, 172	99, 113
Legin, A.	2002 – b	157, 340	110, 232
Legin, A.	2003	156	110
Legin, A.	2004 - a	168	112
Legin, A.	2004 - b	166	112
Legin, A.	2005	169	112
Leonte, I. I.	2006	40	19
Leppävouri, S.	1994	73	56
Li, R.	2000	179	115
Li, Z.	2000	116	90
Lindquist, M.	2001	216	125
Liu, Q.	2006	367	319
Liyama, S.	1995	134	106
Llobet, E.	1999 – a	114, 269	90, 165
Llobet, E.	1999 - b	124	94
Lozano, J. J.	2003 - a	278	179
Lozano, J. J.	2003 - b	279	179
Lozano, J. J.	2005	281	180

Referencias

Luten, J. B.	1997	297	213
Lvova, L.	2002	204	120
Lvova, L.	2003	205	121
Lvova, L.	2004	206	121
Lvova, L.	2006 - a	203	120
Lvova, L.	2006 - b	207	121
Macagnano, A.	2005	324	227
Madou, M. J.	1990	69	50
Manuel, M.	1993	52	21
Marcelloni, F.	2001	111	89
Marchand.		145	107
Mariné-Font, A.	1995	321	224
Martens, H.	1989	104	85
Martí, M. P	2004	292	182
Martínez-Máñez, R.	2005 – a	68, 208	50, 122
Martínez-Máñez, R.	2005 – b	26, 267	11, 159
Martínez-Máñez, R.	2005 - c	268	159
McQueen, J.	1967	97	75
Men, H.	2005	178	114
Mielle, P.	1995	14	6
Mihell, J. A.	1998	24	11
Morales, P.	1996	301, 315	215, 221
Moreno, L.	2006	259	138
Moreno-Barón, L.	2006	199	119
Mortensen, J.	2000	151	108
Mottram, T.	2006	171	112
Mourzina, Y,	2001	163	111
Murray, J.	1969	295	211
Nakamoto, S.	1988	87	58
Nicolisky, B.	1937	57	33
Nomura, T.	1998	33	19
Norman, A.	2003	17	7
Nuzzo, R.	1983	343	233
O'Connell, M.	2001	332	229
Olafsdottir, G.	2004	323	226
Olafsdottir, G.	1997	322	225
O'Sullivan, C.	1999	35	19
Pacquit, A	2006	330	229
Parisi, G.	2002	331	229

Parra, V	2004	231	129
Parra, V	2005 - a	232	129
Parra, V.	2005 - b	233	129
Pascual-Anderson, M. R.	2000	303	216
Pearce, T.C.	1997	115	90
Pearce, T.C.	1998	3	1
Penza, M.	2001 - a	284	180
Penza, M.	2001 - b	283	180
Penza, M.	2003 - a	291	182
Penza, M.	2003 - b	285	181
Penza, M.	2004	286	181
Pérez-Olmos, R.	1997	337	231
Phatak, A.	1997	105	85
Piana, M.	2004	368	323
Pioggia, G.	2006 - a	248	135
Pioggia, G	2006 - b	249	135
Pitt, K.	1981	364	316
Poelsa, I.	1998	25	11
Poprawski, J.	2006	18	7
Porcel, M.	2001	107	85
Possari, R.	2006	341	233
Prudenziati, M	1994	71	52
Rabe, J.	2002	258	138
Ragazzo-Sanchez, J.	2004	293	182
Rantala, T.	1993	81, 86	57, 57
Ripley, B.	1996	96	74
Riul Jr, A.	2002	246	134
Riul Jr. A.	2003 - a	245	134
Riul Jr., A.	2003 - b	244	133
Rodríguez-Méndez, M.L.	1996 - a	287	181
Rodríguez-Méndez, M.L.	1996 - b	288	181
Rodríguez-Mendez, M.L.	2004 - a	234	129
Rodríguez-Mendez, M.L.	2004 - b	48	23
Rösler, S.	1998	256	137
Ros-Lis, J. V.	2006	54	24
Rudniskaya, A.	2001 - a	161	110
Rudnitskaya, A.	2001 - b	150	108
Rudnitskaya, A.	2005	170	112
Rudnitskaya, A.	2006	175	114

Referencias

Ruiz-Capillas, C.	2000	304	216
Saito, T.	1959	313	220
Sakai, H.	2000	141	106
Sancenón, F.	2002	55	24
Santos, J.P.	2000	277	179
Sayago, I.	1999	276	179
Scampicchio, M.	2006	240	132
Schaller, E.	1998	355	282
Schuhmann, C.	1992	84	57
Scorsone, E.	2006	47	20
Seguí, M.J.	2007	21	10
Sehra, G.	2004	252	136
Sergent, J. E.		371	327
Serjeant, E. P.	1984	59	36
Shiers, V.	1996	358	282
Sim Yap, M.	2004	143	106
Skoog, D.		60	39
Smith, R.	2004	344	233
Söderstrom, C.	2003	218	125
Söderstrom, C.	2005	177	114
Söderstrom, C.	2003	219	125
Sohn, Y.	2005	261	140
Soto, J.	2006	22, 61	10, 41
Spinelli, J.	1990	309	219
Stansby, M.	1967	294	209
Taliadourou, D.	2003	348	253
Taniguchi, A.	1999	140	106
Tenenhaus, M.	1998	106	85
Therrien, C.W.	1989	98	75
Toczyłowska, R.	2003	186	116
Toko, K.	1989	129	101
Toko, K.	1996	128	101
Toko, K.	1998 – a1	135, 139	105, 106
Toko, K.	2000 - a	133	106
Toko, K.	2000 - b	132	106
Turner, C.	2003	165	112
Umadevi, P.	1993	83	55
Valle, M.	1998	310	219
Van der Schoot, B.	1986	67	49

Vernat-Rossi, V.	1996	356	282
Vlachos, D.	1996	112	89
Vlasov, Y.	1992	62	45
Vlasov, Y.	1997 - a	19	8
Vlasov, Y.	1997 - b	149	108
Vlasov, Y.	2000	155	109
Vlasov, Y.	2005	10	3
Walta, D	1998	44	20
Wang, P.	1997	15	7
Wang, T.	1994	74	56
Weigel, R.	2002	39	19
Wide, P.	1997	109	89
Wide, P.	1998 - a	225	127
Wide, P.	1998 - b	366	318
Wide, P.	1999	227	128
Wilson, D.	2001	64	45
Winqvist, F.	1993	357	282
Winqvist, F	1997	209	123
Winqvist, F.	1998	210	124
Winqvist, F	2000	211	124
Winqvist, F	2002 - a	220	126
Winqvist, F	2002 - b	127	100
Winqvist, F	2005	222	126
With, F.	1970	308	218
Wold, S.	2001	103	85
Wold. H.	1996	102	84
Xing, X.	1992	72	56
Yamada, H.	1997	137	106
Yano, Y.	1996	359	282
Yano, Y.	2001	360	283
Yea, B	1998	113	90
Zadeh, L.	1965	108	89
Zampolli, S.	2004	13	6
Zhang, C.	2006	260	139
Zhao, C.	2002	329	229
Zheng, J.	2006	263	140
Zhu, L.	2004	16	7