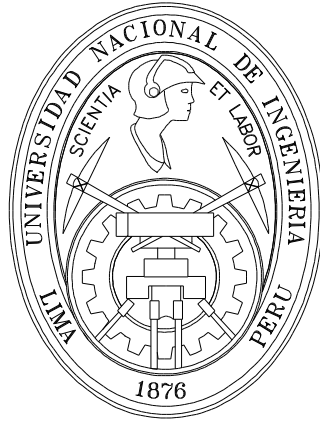


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCIÓN DE POSGRADO Y SEGUNDA ESPECIALIZACIÓN PROFESIONAL



**Sistemas de medición multiparamétricos con
sensores electroquímicos y optoelectrónicos para
la clasificación de muestras.**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON
MENCIÓN EN FÍSICA**

GERMAN YURI COMINA BELLIDO

2010
LIMA - PERÚ

Resumen

En la presente tesis se ha desarrollado el concepto de Sistema de Medición Multiparamétrico y se han visto las potencialidades de éste tipo de sistemas en los sectores de medio ambiente y salud pública, a través del uso de una Lengua Electrónica Voltamétrica (VET) para clasificar agua contaminada con diferentes niveles de *E.Coli*, y de un sistema basado en la técnica Computer Screen Photo-assited Technique (CSPT) para clasificar muestras opacas, similares a las utilizadas en exámenes médicos bio-colorimétricos. En ambos sistemas se usó un algoritmo basado en el análisis por componentes principales (PCA) para la clasificación de las muestras.

La lengua electrónica desarrollada consta de una celda electroquímica con dos electrodos de trabajo (platino y oro), un potencióstato, un software de control y un software de PCA para la clasificación. El sistema logró clasificar muestras de agua contaminada con diferentes concentraciones *E.coli*, tanto para muestras preparadas en el laboratorio, como para muestras reales tomadas de un río. Se mostró que fue suficiente usar un electrodo de trabajo para obtener las señales características de las muestras de agua contaminada. El tiempo que demoró en medir una muestra fue tres minutos, el cual es muy pequeño comparado con la técnica biológica tradicional que toma por lo menos 18h. El prototipo desarrollado es portátil y puede usarse en zonas rurales.

Se usó un sistema CSPT modificado para medir la luz reflejada en muestras opacas similares a las usadas en pruebas médica bio-colorimétricas, a través de la adquisición imágenes de las muestras por una cámara web, mientras el monitor de la PC las iluminó con una secuencia determinada de colores. Se probaron dos métodos para obtener las señales características CSPT. El primero, basado en las intensidades de luz capturadas en los tres canales de la cámara web, el cual permitió una muy buena diferenciación entre muestras, inclusive si las muestras tenían el mismo color pero con diferentes tonalidades. El segundo método, basado en un modelo parecido a la absorbancia, permitió diferenciar a las muestras en base a sus colores y no a las tonalidades. Se usó un espectrofotómetro industrial como instrumento estándar, encontrándose que los espectros característicos tenían una buena correspondencia con las señales obtenidas con el segundo método CSPT. Se utilizó un algoritmo basado en PCA para clasificar las muestras medidas por CSPT y el instrumento estándar, observándose que el CSPT fue superior en la clasificación, respecto al instrumento comercial.

Palabras Clave: Lengua Electrónica, CSPT, PCA, Sistema de medición multiparamétrico.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer al Dr. José Solís por su valiosa asesoría y apoyo constante durante el desarrollo de la presente tesis. Así mismo quisiera agradecer al Dr. Daniel Filippini, por todo el apoyo y la generosidad brindada durante mi estadía en el IFM de la Universidad de Linköping y también por permitirme trabajar en CSPT. También quisiera agradecer de manera muy especial al Dr. Fredrik Winquist y a la Dra. Cristina Krantz-Rülcker por el importante apoyo que me brindaron en el IFM de la Universidad de Linköping, y también por permitirme trabajar en los sistemas de lengua y nariz electrónica.

Un agradecimiento especial al Dr. Walter Estrada por permitirme hacer investigación en el Laboratorio de Películas Delgadas de la Facultad de Ciencias, y por todo el importante apoyo brindado para la realización de ésta tesis.

También quisiera agradecer al la Bióloga Jackelin Venero por su asistencia en la preparación de muestras y análisis biológicos. Al Dr. Hugo Alarcón, por sus valiosos aportes y discusiones. Al Dr. Juan Rodríguez por su muy valiosa asistencia durante el desarrollo de ésta tesis.

Quisiera agradecer también a las instituciones que permitieron el desarrollo de ésta tesis. A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería, al International Science Programme de la Universidad de Uppsala, al Departamento de Física, Química y Biología (IFM) de la Universidad de Linköping y al Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e innovación tecnológica (CONCYTEC).

Dedicada a mi madre y toda mi querida familia.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
1.1 Situación actual de sistemas de medición basados en sensores.	1
1.2 Contaminación ambiental y calidad de agua	1
1.3 Control de Salud y pruebas médicas colorimétricas.	3
2. Sistemas para clasificación de muestras	5
2.1 Sistemas de medición multiparamétricos	5
2.1.1 Sistema sensor.	5
2.2.2 Sistema Electrónico.	8
2.2.3 Algoritmo de reconocimiento de patrones.	8
2.2 Sistemas de medición multiparamétricos con sensores electroquímicos y optoelectrónicos.	16
2.2.1 Lengua Electrónica Voltamperométrica (VET).	16
2.2.1.1 Diseño del sistema sensor.	19
2.2.1.2 Potenciostato.	30
2.2.2 Sistema CSPT de reflectancia.	33
3. Trabajo experimental.	43
3.1 Clasificación de muestras de agua con diferentes niveles de contaminación usando una VET.	44
3.1.1 Fabricación de una VET.	44
3.1.1.1 Sistema sensor.	44
3.1.1.2 Sistema electrónico.	46
3.1.1.3 Software de reconocimiento de patrones.	48
3.1.2 Determinación de la onda de voltaje para el análisis de agua.	49
3.1.3 Preparación de muestras de laboratorio con concentraciones diluidas de E.coli y conteo de colonias por el método de filtración de membrana (MF).	52
3.1.4 Clasificación de agua contaminada preparada en el laboratorio usando la Lengua Electrónica Voltamperométrica.	53
3.1.5 Clasificación de muestras de agua contaminada del río Yaurisque-Cuzco.	56
3.2 Clasificación de Muestras opacas usando CSPT.	62
3.2.1 Muestras opacas.	62
3.2.2 Configuración del hardware.	63
3.2.3 Modulación de la luz incidente y medición de la señal reflejada.	64
3.2.4 Modelos para CSPT basados en reflectancia.	69
3.2.5 Medición de la reflectancia de las muestras opacas usando un espectrofómeto industrial.	77
3.2.6 Clasificación de muestras opacas.	81
4. Conclusiones.	86
5. Bibliografía.	90

A decorative horizontal bar at the bottom of the page, consisting of an orange segment on the left and a blue segment on the right. The text "1. Introducción" is centered in the blue segment.

1. Introducción

1. Introducción.

1.1. Situación actual de sistemas de medición basados en sensores.

La tendencia actual en las técnicas de medición es la de desarrollar sistemas que permitan obtener y procesar información relacionada con atributos como calidad, condición o estado de una muestra o proceso, en vez de medir un solo parámetro, como presión, conductividad, temperatura, etc. [1].

Muchos de estos atributos son apreciables directamente por los sentidos de un observador, pues están relacionados con el olor, sabor, color, textura, etc. de una muestra. Además el observador también puede definir el criterio de clasificación de la muestra. Sin embargo, existen varias razones por las cuales es necesario contar con sistemas automatizados que realicen esta labor. Entre ellas, la reproducibilidad de las observaciones directas es afectada en gran medida por las diferencias de percepción que pueden presentar diferentes observadores, la inviabilidad de tener a un observador entrenado analizando de manera continua una gran cantidad de muestras, o que la muestra sea peligrosa para el observador como son gran parte de las muestras biomédicas. En éste sentido, durante estos últimos veinte años han habido aportes importantes en el desarrollo de Sistemas de Medición Multiparamétricos (SMMP) con el objetivo de clasificar muestras en base a sus atributos como, el sabor (Lengua Electrónica) [2], el olor (Nariz Electrónica) [3] o el color (Computer Screen Photoassisted Technique, CSPT) [4].

Los SMMP tienen varios campos de aplicación, como: control de la contaminación ambiental [5-7], bio-medicina [8-10], agroindustria e industria alimentaria [11-14], entre otros.

1.2. Contaminación ambiental y variables ambientales.

La preservación del medio ambiente a través del monitoreo de la calidad de agua no solo da información actualizada para la formulación de políticas ambientales

correctivas, sino que también favorece a las poblaciones que usualmente consumen aguas no tratadas.

Según la información censal del INEI solo el 12.8% de la población del Perú disfruta de una conexión a la red pública de agua dentro de su vivienda [15]. Estos usuarios de la red pública se encuentran principalmente en las ciudades, donde existe un monitoreo constante de la calidad del agua por parte de la empresa que brinda el servicio. Pero en muchas zonas rurales y urbano marginales, los pobladores tienen que usar agua proveniente de pozos, manantiales, lagos o ríos, para el consumo diario. Esto incrementa de manera exponencial el riesgo de contraer enfermedades debido al uso de agua contaminada.

Para la determinación de la calidad de agua pueden usarse diversas pruebas físicas, químicas y biológicas. Sin embargo para el agua libre de metales pesados, las pruebas bacteriológicas son las más indicadas para determinar la calidad de agua [16].

La presencia de organismos coliformes como la *Estericchia Coli (E.coli)* y *Enterobacter Aragenes*, son muy buenos indicadores de la calidad del agua. Su presencia indica que el agua no es apta para el consumo humano.

Existen diversas pruebas microbiológicas para determinar la presencia de coliformes en agua, entre ellas está la prueba Colilert (CT) y el método de la filtración de membrana (MF) [17,18].

En la prueba comercial Colilert® se añade el reactivo Colilert® a 100 mL de agua. Luego de que se mantiene la mezcla a una temperatura de 35°C durante 24 h y si hay coliformes, la mezcla adquiere un color amarillo.

En el método de filtración de membrana, se hace pasar la muestra de agua a través de un filtro de membrana estéril, el cual retiene a las bacterias. Posteriormente, la membrana se transfiere a un soporte absorbente, el cual contiene al medio de cultivo.

Luego de 18 h de digestión se examina la membrana y se cuentan las unidades formadoras de colonias (U.F.C), las cuales son de de color verde.

Estas pruebas microbiológicas estándar demoran por lo menos 18 h, además necesariamente se requiere un técnico entrenado, y en muchas de las pruebas, equipo adicional como una estufa y un microscopio óptico.

Todo ello hace que estas pruebas tradicionales no puedan monitorear de la calidad del agua en tiempo real y además sea difícil su implementación en zonas rurales. Por ello es necesario contar con un sistema automatizado que permita clasificar muestras de agua de acuerdo a la cantidad de coliformes.

1.3. Control de Salud y pruebas colorimétricas.

Actualmente hay una necesidad de contar con pruebas médicas no-invasivas, rápidas, económicas, fáciles de usar y que funcionen con muestras de secreciones como orina, saliva, etc.

Existe toda una serie de pruebas médicas que usan el cambio de color de un reactivo bioquímico para medir el nivel de un cierto parámetro médico o detectar la presencia de cierto antígeno.

Comercialmente se pueden encontrar diversos productos, por ejemplo Craig Medical Distribution INC, posee el URS-10[®], que consiste en una tira de papel con varios reactivos bioquímicos, que al estar en contacto con una muestra de orina permite determinar, a través de cambios de color, niveles de Glucosa, Protinas, PH, nitritos, Cetonas, Sangre, Bilirrubina, Urobilinógeno, y gravedad específica. TCS Biosciences posee la prueba OptiMAL[®], que consiste en tiras de papel impregnado con reactivos bioquímicos y que permite la detección de malaria a través de cambios de color en el papel.

Actualmente existe mucho interés en el desarrollo de pruebas colorimétricas de fácil uso, para la detección de diversas enfermedades, en especial las de elevado nivel de contagio y letalidad como Tuberculosis y Malaria [19,20]. El uso de lenguas y narices electrónicas colorimétricas también tiene un gran potencial en este campo [21].


Una de las dificultades para el uso de arreglos colorimétricos es la de contar con un sistema lector, económico y fácil de usar, que permita la medida multiparamétrica en base al color de las tiras opacas de papel reactivo y que tenga la posibilidad de análisis con el objetivo de clasificar muestras.

Para que este concepto sea viable es muy conveniente que el hardware necesario para realizar las mediciones esté basado en las plataformas más comunes como PC o teléfonos celulares, sin hardware adicional como tarjetas de adquisición o sistemas embebidos.

El objetivo de la presente Tesis es el desarrollo y uso de sistemas de medición multiparamétricos para la clasificación muestras de agua contaminada con *E.coli* y muestras coloreadas opacas.

En la presente tesis se presentan dos sistemas de medición multiparamétricos. El primero, basado en sensores electroquímicos (Lengua Electrónica), permitió clasificar agua contaminada con *E.coli*. El segundo, basado en sensores optoelectrónicos (CSPT), permitió la clasificación de muestras opacas usando la reflectancia. El trabajo se realizó en la Facultad de Ciencias en la Universidad Nacional de Ingeniería en el Perú y en el Departamento de Física, Química y Biología de la Universidad de Linköping en Suecia.

Hasta el momento se han publicado dos artículos científicos. Un artículo en la revista "Sensors and Actuators B." [4], y un artículo en la revista nacional "Revista de investigación de Física" [5]. Actualmente se ha sometido un artículo basado en la lengua electrónica para su publicación en una revista internacional.



2. Sistemas para clasificación de muestras

2. Sistemas para clasificación de muestras.

2.1 Sistemas de medición multiparamétricos.

El término sistema multisensor se ha aplicado en numerosas publicaciones referidas a los conceptos de narices y lenguas electrónicas, denotando el uso de varios sensores formando un arreglo para el reconocimiento de muestras. Sin embargo hay ocasiones en que una lengua o nariz electrónica puede estar constituida por un solo sensor, pero cuya señal de respuesta tiene múltiples parámetros. Janata [22], propone una división de sensores, usando el término "Higher-Order Sensors", donde un sensor que mide un solo parámetro (ej. Temperatura) es un sensor de primer orden. Conforme se incrementan otras variables de medida (longitud, tiempo, etc), el sensor será de un orden superior (segundo orden, tercer orden, etc.). Esto lo hace para poder crear una conexión entre la respuesta de éstos "Higher-Order Sensors" y los parámetros de entrada de los algoritmos de reconocimiento utilizados en las lenguas y narices electrónicas.

En el presente trabajo se propone el uso del término: "Sistema de Medición Multiparamétrico", para denotar un sistema (nariz electrónica, lengua electrónica, CSPT, etc.) que utiliza un conjunto de parámetros. Estos parámetros pueden ser definidos por los sensores (parámetros: temperatura, presión, humedad, etc.), pero además pueden ser definidos por conveniencia (parámetros: color de muestra, tiempo de toma de datos, etc.). De tal manera que sus valores son característicos de la muestra, y son utilizados para clasificarla y/o cuantificarla.

El concepto así presentado, tiene la ventaja de incluir a sistemas que pueden ser multisensor o no, además de incluir a sistemas que usen sensores de cualquier orden definido por Janata.

Se define un sistema de medición multiparamétrico (SMMP) al conjunto formado por: un sistema sensor, sistemas electrónicos y de software, que tiene como objetivo clasificar y/o cuantificar muestras en base a sus atributos.

2.1.1 Sistema sensor.

Está conformado por un arreglo de sensores o un único sensor con salida multiparamétrica.

Este sistema sensor interactúa directamente con la muestra y entrega en su salida un conjunto de señales características de voltaje, corriente, intensidad de luz, etc.

En muchos tipos de lengua y nariz electrónica se utiliza un arreglo de sensores. Los sensores del arreglo deben ser diferentes y cada sensor debería reaccionar con la mayor cantidad de los elementos que componen el líquido o gas.

Esta no especificidad de los sensores, garantiza que las señales características de respuesta en el SMMP sean diferentes, a pesar que los sensores estén interactuando con muestras muy parecidas. Estas señales características se las agrupa en un vector que caracteriza a la muestra, como se puede observar en la Figura 1.

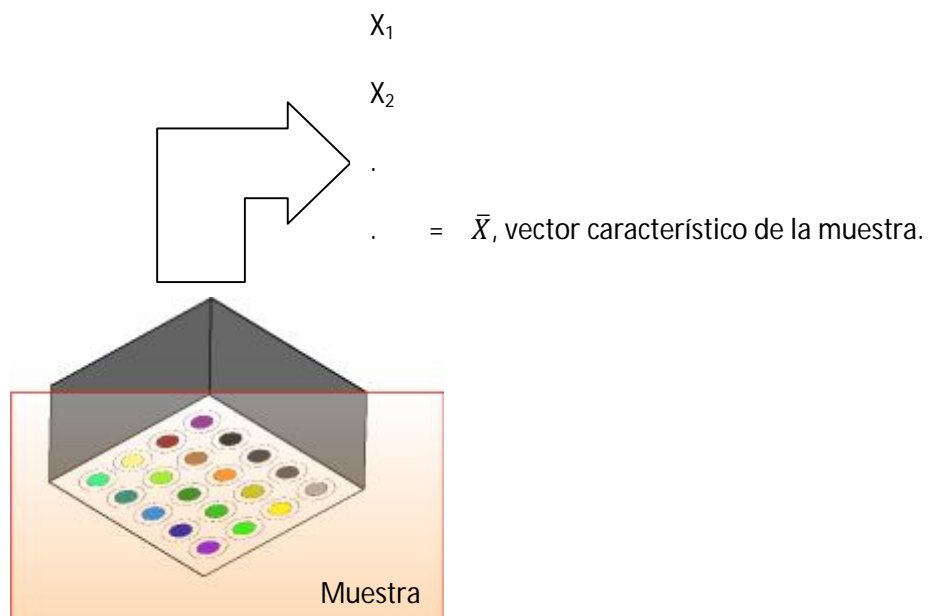


Figura 1. Arreglo de sensores interactuando con una muestra. El vector respuesta es característico de la muestra.

Dependiendo de la técnica por usar, los parámetros se pueden definir por ejemplo como la intensidad de la señal a tiempos determinados $t_i, i \in [1, N]$, de tal manera

que si la interacción entre el sensor y la muestra da como resultado la señal $S(t)$. Ésta muestra estaría representada por el vector $\bar{S}(t_i), i \in [1, N]$.

Ésta técnica es muy usada en lenguas electrónicas voltamperométricas, inclusive cuando se usan a la vez más de dos sensores multiparamétricos [23].

Otra opción para la definición de los parámetros es cuando el sensor funciona bajo una técnica donde la señal de salida se puede apreciar mejor si se la representa espectralmente.

De ésta manera la salida de respuesta del sensor está en función de la frecuencia. En éste caso se definen frecuencias determinadas $\phi_i, i \in [1, N]$. De tal manera que si la interacción entre el sensor y la muestra da como resultado la señal $V(\phi)$. Ésta muestra estaría representada por el vector $\bar{V}(\phi_i), i \in [1, N]$.

Ésta técnica es muy usada cuando se usa la técnica de ruido, en una nariz o lengua electrónica [24].

También es posible hacer que ϕ_i no represente una frecuencia, sino un color de iluminación de la muestra, éste es el caso de la técnica CSPT [4,25].

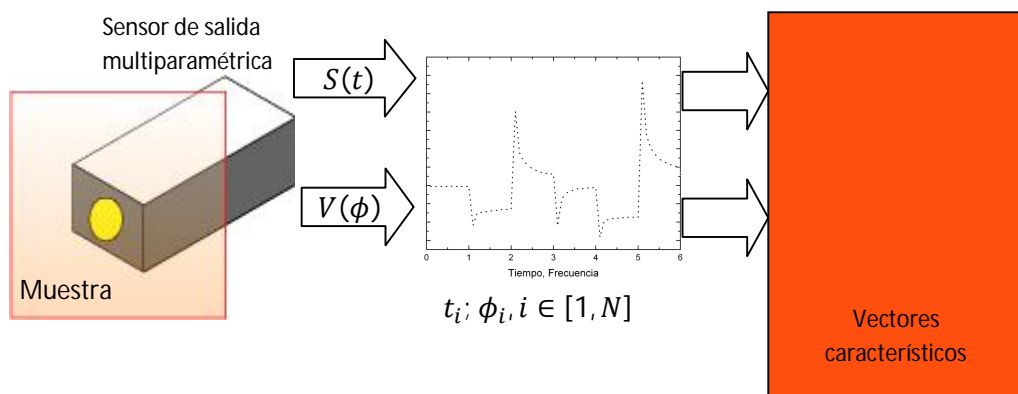


Figura 2. Sensor de salida multiparamétrica interactuando con una muestra. Los vectores S y V dependen de la técnica usada por el sensor y son característicos de la muestra.

En muchos trabajos se usa la combinación de arreglo de sensores que tienen salida multiparamétrica para el análisis de muestras.

En el presente trabajo se utilizó una lengua electrónica para determinar la calidad de agua, esta lengua electrónica estaba basada en un arreglo formado por dos elementos sensores cada uno de ellos tratado como un sensor multiparamétrico. Mostrándose que para la determinación de la calidad de agua, es suficiente usar uno de ellos.

En el caso del CSPT, el sensor fue una cámara web la cual capturaba imágenes de las muestras cuando éstas estaban siendo iluminadas por una pantalla de computadora. En el presente trabajo se demostró por primera vez el uso de CSPT por reflectancia para diferenciar muestras opacas.

2.1.2 Sistema electrónico.

El sistema electrónico y el software asociado se diseñan ad-hoc a los sensores y a las técnicas de medición usadas. También en ésta etapa, se puede realizar un post procesamiento de las señales proveniente del sistema sensor, para obtener los vectores característicos de las muestras.

En el presente trabajo se usó en la lengua electrónica un potenciómetro para obtener las señales características de agua contaminada con E.coli y en el sistema CSPT se usaron monitor y la webcam de una PC para obtener las señales características de impresiones de colores similares a las usadas en pruebas médicas bio-colorimétricas.

2.1.3 Algoritmo de reconocimiento de patrones.

Es el elemento del sistema de medición multiparamétrico que permite clasificar a las muestras en base a sus vectores característicos.

Existen varios métodos para el reconocimiento de patrones, como redes neuronales, estructuras ocultas de Markov y análisis multivariado. Sin embargo en el presente trabajo se usará el análisis multivariado y específicamente la técnica de análisis por componentes principales (PCA), debido a su buena performance cuando se utiliza con vectores representativos que tienen muchas componentes.

El análisis multivariado es un conjunto de técnicas estadísticas que permiten la exploración, clasificación, discriminación, predicción y regresión de datos de múltiples variables.

Las aplicaciones del análisis de datos usando métodos multivariados son bastante amplias, como por ejemplo en el análisis de olor y sabor en narices y lenguas electrónicas [2, 6, 26], en la determinación de variables de control ambiental, como la demanda química de oxígeno (COD) [27], en el reconocimiento automático de rostros [28], etc.

Los objetivos del análisis multivariado se pueden dividir en tres grupos los cuales definen diferentes técnicas [29]:

- Descripción de datos (técnica de modelos para la exploración de datos).
- Clasificación y discriminación (técnica de análisis por componentes principales (PCA)).
- Predicción y regresión (técnica de regresión por cuadrados mínimos (PLS), técnica de regresión de componentes principales (PCR)).

El conjunto de datos obtenido con un Sistema de Medición Multiparamétrico (SMMP) se puede ordenar en una matriz de la forma:

$$X_{i,k} \quad i \in [1, n], k \in [1, p] \quad (1)$$

Donde las "i" filas de la matriz corresponden al número de mediciones realizadas, y las "k" columnas representan el número de parámetros definidos en la medición multiparamétrica.

Por ejemplo, en la lengua electrónica desarrollada en la presente tesis, se usaron 60 parámetros de medida y para el monitoreo de la descontaminación de agua se midieron 5 muestras, por tanto en éste caso $n = 5$ y $p = 60$.

En la matriz de datos $X_{i,k}$, a las mediciones "i" se le conoce con el nombre de "Objetos", y a los parámetros "k" se les conoce con el nombre de "Variables".

Cada objeto se puede representar por un punto en el espacio "p-dimensional". Por tanto todas las mediciones forman un conjunto de puntos en el espacio "p-dimensional". Por ejemplo si existiesen solo tres variables ($p=3$), los objetos que representan a 11 mediciones, se podrían observar en el espacio tridimensional (x_1, x_2, x_3), ver Figura 3 (a).

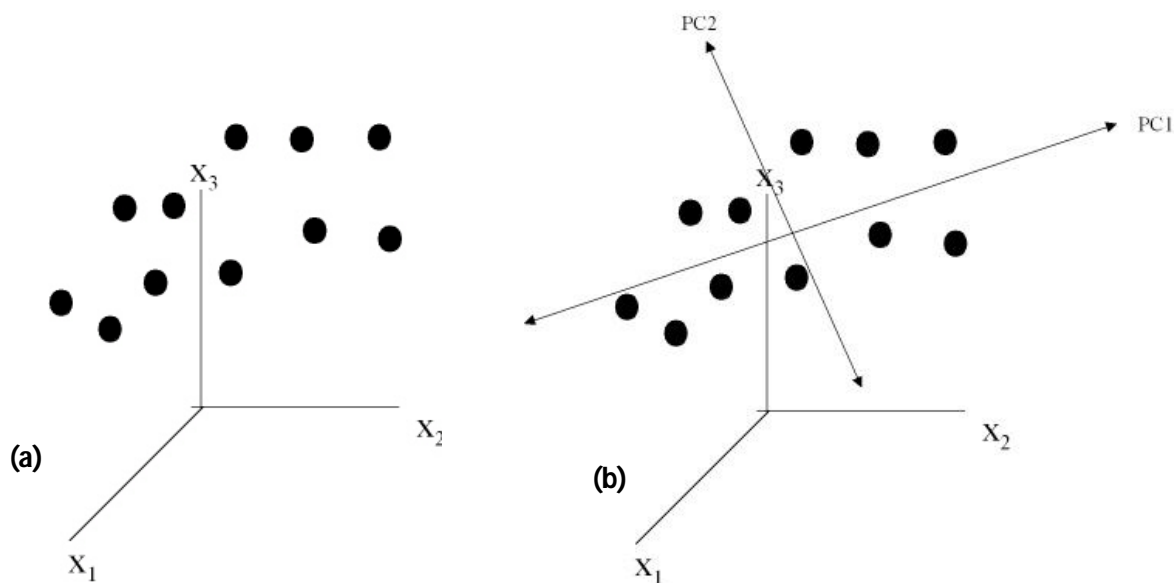


Figura 3. (a) representación de 11 objetos en el espacio definido por los $p=3$ parámetros. (b) Visualización de las dos primeras componentes principales PC1 y PC2

El objetivo del Análisis por Componentes Principales (PCA) es substituir la representación de esos objetos del espacio "p-dimensional" a un nuevo espacio llamado espacio de componentes principales. Ésta transformación tiene dos ventajas, la primera es la reducción del número de componentes de "p" a 2 ó 3. Además de que la dirección de los ejes del espacio de componentes principales sigue la dirección de la máxima separación de los puntos respecto a un punto central o punto medio del

conjunto de objetos (máxima varianza). Para el ejemplo muy básico donde $p=3$, en la Figura 3(b) se observan a la primera y segunda componente principal (PC1, y PC2).

Las componentes principales (PC1, PC2,...) son mutuamente ortogonales [30].

En PCA es muy común centrar la matriz X , de manera de trasladar el centro de coordenadas al punto medio o "centro de gravedad" del conjunto de puntos [30], de tal manera que:

$$X = x_{ik}^0 = x_{ik} - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{ik} \quad (2)$$

Las componentes principales son vectores cuya dirección apunta en la dirección de la máxima varianza. Éstos vectores pueden ser definidos por la combinación lineal de "p" vectores unitarios \vec{e}_k correspondientes a las "p" variables de tal manera que:

$$\vec{p}_a = \sum_{k=1}^p p_{k,a} \vec{e}_k \quad (3)$$

Donde "a" es el número de la componente principal $a=1,2,\dots$; con la condición que $a < p$. En general el máximo número de componentes principales para la matriz $X_{n,p}$ es el menor número entre $(n-1)$ y $(p-1)$, [30].

Los coeficientes $p_{k,a}$ se denominan "cargas" y existen "p" cargas por componente principal. Éstos coeficientes relacionan a las componentes principales (PC) con las variables de la medición multiparamétrica (x_{ik}).

La proyección de cada objeto sobre cada componente principal define a los términos $t_{i,a}$ llamados "puntuaciones" y que son las distancias desde el origen del sistema de componentes principales hasta el punto del objeto proyectado sobre la componente principal "a", ver Figura 4.

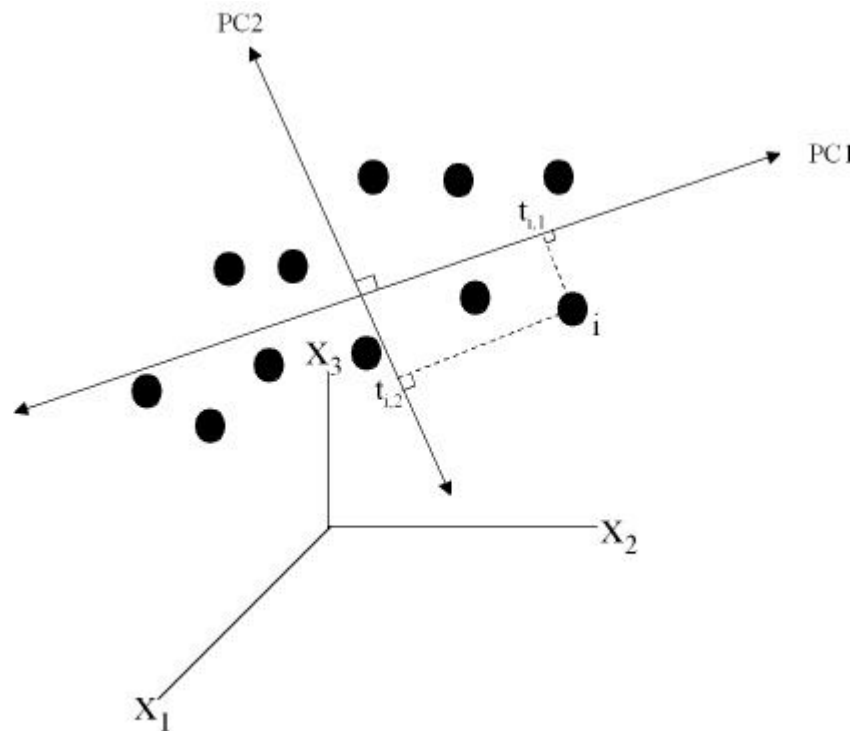


Figura 4. Proyección de los puntos sobre cada una de las componentes principales.

El gráfico de “puntuaciones” es el que permite la visualización de la clasificación de muestras. Éste gráfico de “puntuaciones” se forma usando las componentes principales como ejes y las puntuaciones $t_{i,a}$ como coordenadas de los nuevos puntos sobre el plano PC1-PC2, por ejemplo. En la presente tesis se usó éste gráfico de puntuaciones de dos dimensiones (PC2 vs PC1) para clasificar agua contaminada con E.coli con la lengua electrónica y también para clasificar muestras opacas usando CSPT.

En PCA se asume que la matriz X puede descomponerse como la suma de dos matrices, la primera llamada de “Estructura”, la cual que contiene vectores formados por las “cargas” y las “puntuaciones”. Y la segunda llamada de “Ruido” que contiene a la parte de los datos cuya varianza no puede ser representada por las componentes principales contenidas en la matriz de estructura.

El modelo PCA asume que la matriz de estructura es de la forma TP^T , de tal manera que:

$$X = TP^T + E \quad (4)$$

O en forma equivalente:

$$X = \sum_{a=1}^A t_{i,a} p_{k,a}^T + E \quad (5)$$

El PCA usa el algoritmo NIPALS (Non-linear Iterative Projections by Alternating Least-Squares), inventado por Herman Wold en 1966, para calcular numéricamente las matrices de puntuación y de carga. El algoritmo se puede observar en la Figura 5.

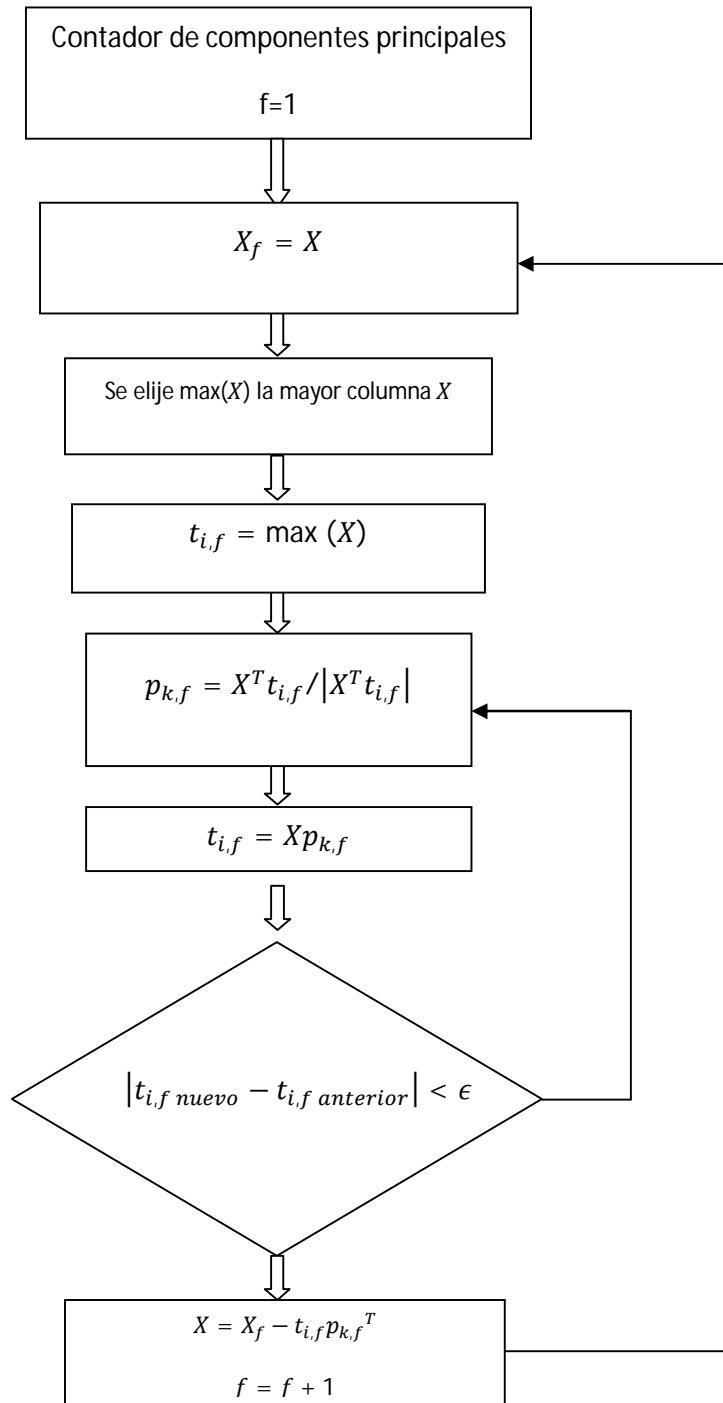


Figura 5. Diagrama de flujo del algoritmo NIPALS.

El parámetro de convergencia " ϵ " (ver Figura 5) es del orden de 10^{-6} , lo que asegura que la matriz $t_{i,f}$ ha alcanzado una solución estable [30].

El Toolbox Statistics de Matlab® posee las rutinas necesarias para realizar el análisis NIPALS de PCA y obtener los valores de carga y la varianza contenida en cada componente principal, las cuales se usan para realizar gráficas de puntuaciones como la mostrada en la Figura 6.

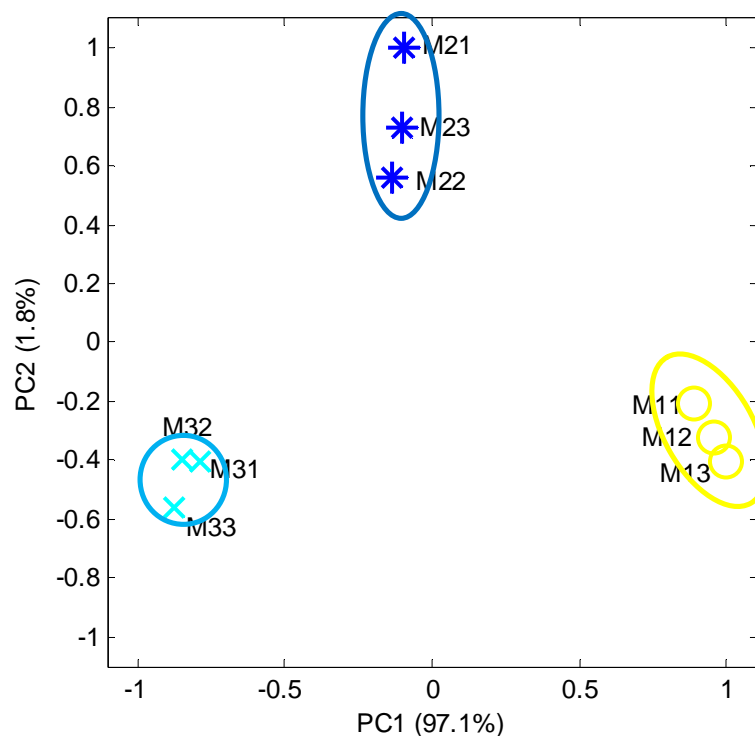


Figura 6. Gráfico PCA para 9 objetos donde se observan que los objetos de la misma naturaleza se agrupan en "clusters".

Esta herramienta (PCA) se usó para clasificar a las muestras de los SMMP de la presente tesis de una manera gráfica. Ésta reducción de variables desde p a solo dos permitió una diferenciación fácil entre mediciones. En una gráfica PCA de "puntuaciones", los puntos muy cercanos, agrupados en clusters (ver Figura 6), tienen valores semejantes de medidas multiparamétricas.

Si se desea relacionar éstos puntos con atributos específicos, como concentración de *E.coli* o color de una muestra, se deben tener métodos estándar para medir la concentración de *E.coli* y el color de la muestra. De ésta manera se puede relacionar la

distancia relativa entre puntos o su posición con el valor del parámetro deseado. Esto permite desarrollar sistemas que tengan un hardware común, y que solo se modifique el software para que pueda medir un cierto atributo de una sustancia, como calidad de agua o color de una muestra.

La Figura 7 muestra el esquema del algoritmo utilizado en el presente trabajo.

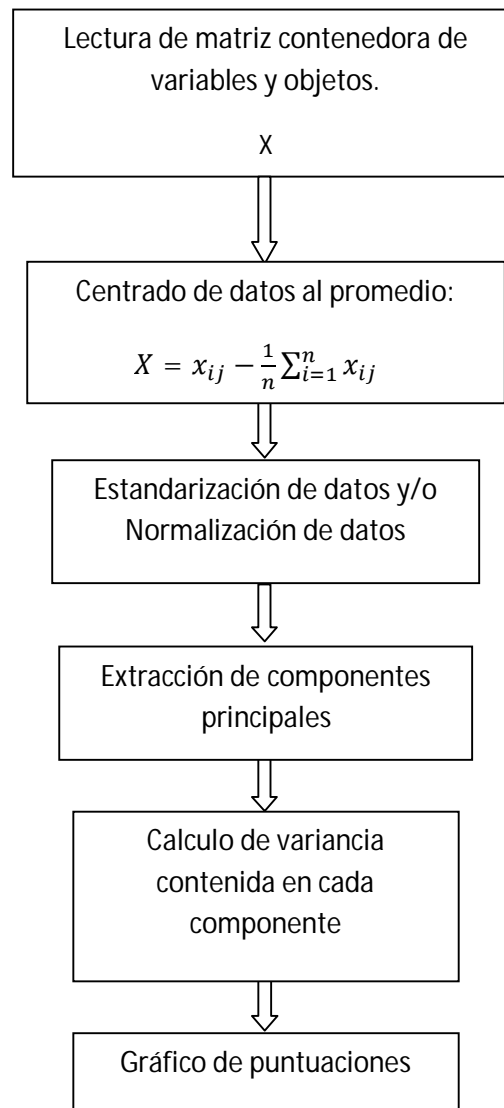


Figura 7. Algoritmo del programa de análisis multivariado.

En la Figura 8, se presenta un diagrama general de un Sistema de Medición Multiparamétrico.

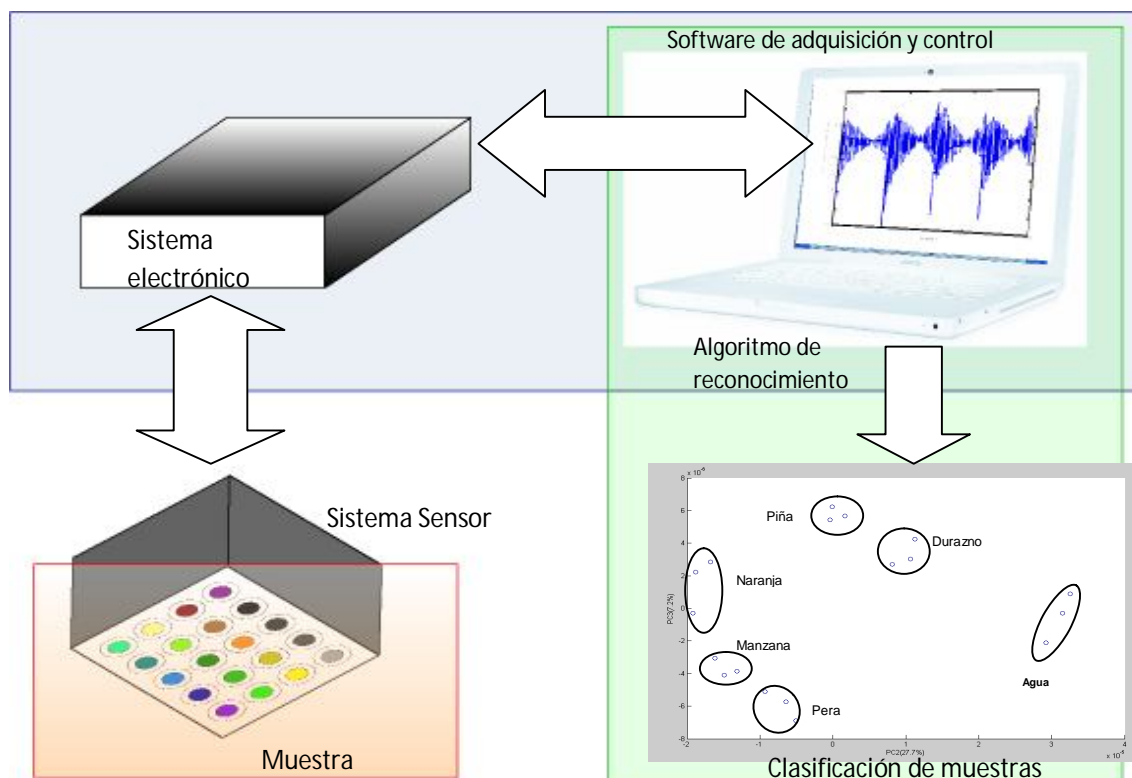


Figura 8. Esquema general de un sistema de medición multiparamétrico para clasificación de muestras.

2.2. Sistemas de Medición multiparamétricos con sensores electroquímicos y optoelectrónicos.

El sistema de medición multiparamétrico (SMMP) con sensores electroquímicos desarrollado en la presente tesis ha sido la Lengua Electrónica Voltamperométrica y el SMMP con sensores optoelectrónicos es el sistema CSPT (computer screen photoassisted technique) de reflectancia.

2.2.1 Lengua Electrónica Voltamperométrica. (VET).

Una lengua electrónica es un sistema de medición multiparamétrico que interactúa con muestras líquidas con el objetivo de clasificarlas o caracterizarlas.

Desde 1985 han habido esfuerzos por desarrollar sistemas multisensor y multiparamétricos para analizar líquidos. En los primeros trabajos, los sensores usados

fueron celdas electroquímicas con electrodos selectivos a iones y además análisis multivariado para el reconocimiento de las muestras [31].

K. Hayashi y K.Toko en 1990 desarrollaron el primer "sensor de gusto" [32]. El sistema sensor de éste "sensor del gusto" estaba compuesto por un arreglo de ocho membranas lípido/polímero y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. El conjunto se sumergía en el líquido por analizar y se medía la diferencia de potencial entre cada una de las ocho membranas y el electrodo de referencia. Se registraba el potencial en función del tiempo $V(t_i)$.

El conjunto de todas las ocho señales multiparamétricas $V_k(t_i), k = [1, \dots, 8]$, servía para clasificar las muestras gráficamente.

En ese trabajo se acuñó el término "sensor del gusto" y esto tiene que ver con la filosofía de imitar el mecanismo de la lengua biológica de los mamíferos. Los sensores del arreglo (membranas lípido/polímero) se eligieron por que las interacciones que existen entre la lengua biológica de los mamíferos y los líquidos se dan a través de membranas lípidas, de tal manera de diferenciar los cinco sabores básicos: ácido (como el producido por los iones de hidrógeno del HCL, ácido acético, ácido cítrico, etc.), salado (producido principalmente por NaCl), dulce (producido por la sacarosa, glucosa, etc.), amargo (producido por la cafeína y el $MgCl_2$) y sabroso o umami (termino en japonés para sabroso), producido por el glutamato monosodico contenido en algas o el disodio iocinato contenido en los peces y carnes o el disodio guanilato contenido en las setas [33].

Sin embargo estos conceptos involucran tener siempre en el sistema sensor transductores específicos y altamente selectivos a elementos ligados a los cinco sabores, en el caso del "sensor de gusto", o en general ligados a ciertos iones específicos. Esto presenta el problema de que el sistema no pueda detectar diferencias sutiles entre muestras, si estas diferencias se dan en iones no detectados por los sensores selectivos.

En 1995, Vlasov, Legin, D'Amico y Di Natale propusieron usar sensores químicos no específicos y pobremente selectivos, además del análisis de reconocimiento de patrones para analizar líquidos. A éste sistema lo denominaron "Lengua Electrónica".

La idea es utilizar sensores que reaccionen con la mayor cantidad de elementos que constituyen el líquido, de tal manera que la señal multiparamétrica del sensor cambie con la mayor cantidad de elementos del líquido. Si el sistema sensor está formado por un arreglo, se procura que los sensores tengan sensibilidad cruzada, es decir que cada sensor reaccione con un conjunto de elementos del líquido. Esto proporciona mejoras en la reproducibilidad y estabilidad en la medida [34].

Durante todo éste tiempo se han diseñado lenguas electrónicas con diferentes tipos de sensores: sensores en base a celdas electroquímicas con electrodos potenciométricos [34], electrodos voltamétricos [35-36], sensores acústicos [37], entre otros.

En la presente tesis se desarrolló una lengua electrónica voltamperométrica similar a la reportada por F. Winqvist et al. [35].

La lengua electrónica voltamperométrica consta de una celda electroquímica de tres electrodos, compuesta por un arreglo de electrodos de trabajo de diferentes metales, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia [35].

La técnica usada en el sistema sensor es voltametría de pulsos, en la cual se aplica una serie de pulsos de potencial al sistema sensor, y se mide la corriente que pasa a través de los electrodos. Esta corriente es función de la naturaleza del líquido que se analiza.

Utilizando como herramienta el análisis multivariacional, se puede, distinguir sabores, y también detectar y medir la concentración de un cierto material en el líquido. En la Figura 9 se observa el diagrama esquemático de la lengua electrónica desarrollada por F. Winqvist.

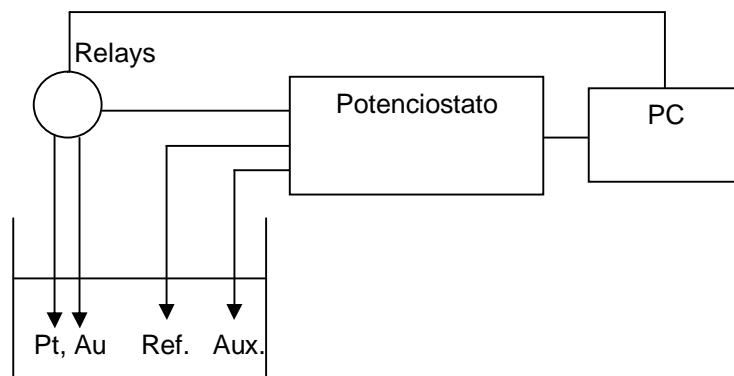


Figura 9. Diagrama de la Lengua electrónica voltamperométrica [35].

En la presente tesis se eligió éste tipo de Lengua Electrónica por varios motivos:

- La técnica usada en el sistema sensor es voltametría de pulsos, la cual tiene una excelente sensibilidad y resolución.
- Es posible configurar el tipo de electrodo de trabajo, la amplitud y duración del potencial aplicado, además del número de pulsos que forma la señal de voltaje.
- Los sensores son electrodos hechos con metales nobles sin ningún tipo de procesamiento adicional y como sistema electrónico usa un potenciostato, lo que facilita el desarrollo.

La lengua electrónica voltamperométrica desarrollada en la presente tesis, es una modificación de la reportada en la referencia [35] y se usó para clasificar muestras de agua contaminada con *E.coli*. El prototipo fue construido íntegramente en el Laboratorio de Películas Delgadas de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería en Lima-Perú.

2.2.1.1 Diseño del sistema sensor.

El sistema sensor consiste en una celda electroquímica de varios electrodos de trabajo.

En la presente tesis se decidió usar una celda de dos electrodos: trabajo-auxiliar, en vez de la de tres electrodos trabajo-auxiliar-referencia [35]. El principal motivo para

esta decisión fue el hecho que los electrodos de referencia usan una membrana de vidrio con poca resistencia mecánica a golpes o presiones altas y como se deseaba contar con un sistema sensor robusto capaz de resistir estrés mecánico debido a corrientes de agua o caídas, se decidió por prescindir de éste electrodo. Éste hecho también fue reportado por P.Ivarsson et al. [38], cuando usó una lengua electrónica voltamperométrica para monitorear los ciclos de enjuagado en una lavadora.

En la presente tesis se desarrolló un sistema sensor con una configuración monoplanar, donde las superficies de los electrodos se encuentran en un mismo plano, como se muestra en la Figura 10.

La celda tiene dos electrodos de trabajo uno de oro y el otro de platino y el electrodo auxiliar es de acero inoxidable. Los electrodos de trabajo están soportados en el centro de la estructura de acero inoxidable poracrílico dental, mayores detalles sobre la fabricación se dan en el capítulo 3.

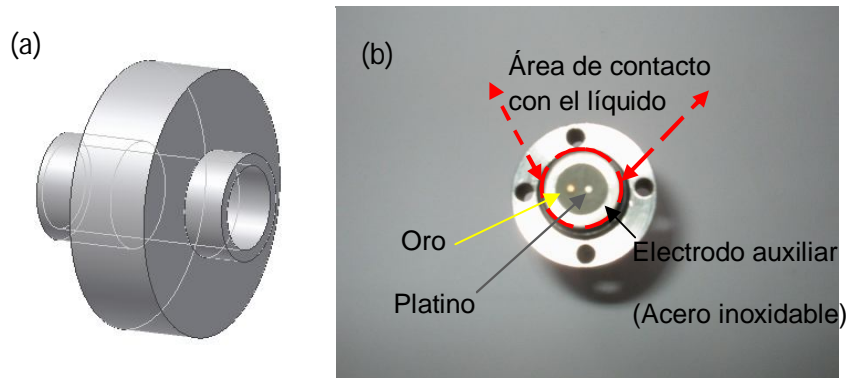


Figura 10. (a) Diseño CAD de la estructura del electrodo auxiliar, (b) vista superior del conjunto donde se muestran a los dos electrodos de trabajo soportados poracrílico dental al electrodo auxiliar. Los agujeros sirven para la fijación mecánica del sensor.

Las áreas activas de los electrodos se muestran en la Figura 10(b). El área activa del electrodo auxiliar tiene forma de anillo mientras la de los electrodos de trabajo tiene forma de disco.

La técnica de voltametría de pulsos, consiste en aplicar entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar una serie de voltajes, la cual forma una onda de excitación. Al

mismo tiempo se mide la corriente que pasa por el electrodo de trabajo. En la Figura 11, se muestra una onda de excitación.

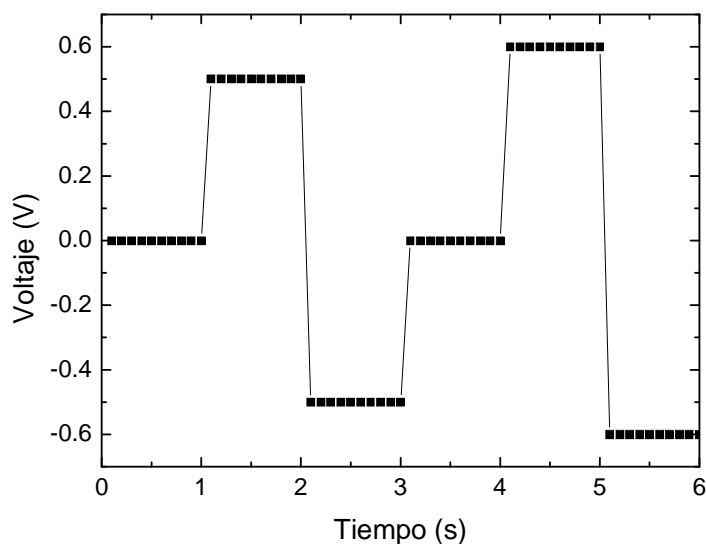


Figura 11. Diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y electrodo auxiliar en función del tiempo (onda de excitación).

La Figura 12 muestra al sistema sensor para medidas voltamperométricas, esta configuración corresponde a una celda voltamperométrica de dos electrodos la cual consiste varios electrodos de trabajo (WE), y un electrodo auxiliar (AUX). Se mide la corriente debido a una reacción electroquímica entre un electrodo de trabajo y tierra del potencióstato, el voltaje se aplica entre los electrodos de referencia y de trabajo.

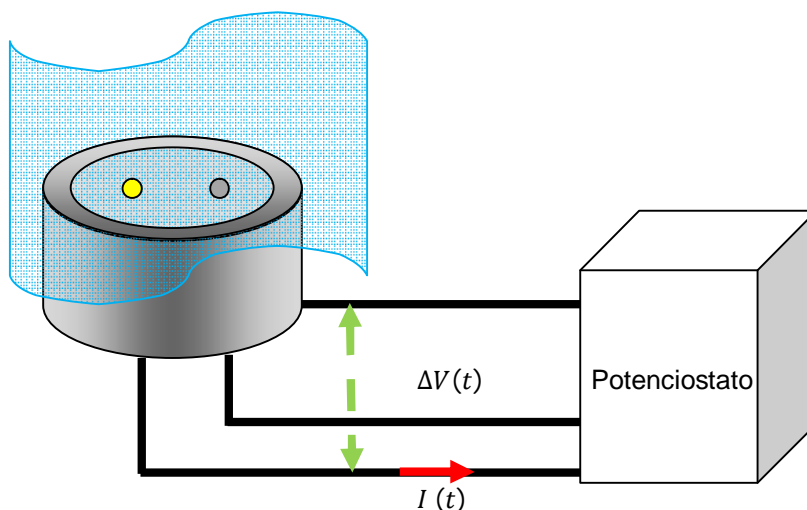


Figura 12. Esquema del sistema sensor tomando medidas en un tiempo "t" y usando el electrodo de oro.

Se utilizó el software COMSOL Multiphysics 3.2, para obtener, a través de una simulación, la distribución macroscópica del campo eléctrico y del potencial para la estructura geométrica del sistema sensor.

Se consideró que en un tiempo fijo, el sistema se comportará como un sistema electrostático, con el electrodo de trabajo conectado a un potencial negativo y el electrodo auxiliar a uno positivo.

Se consideraron los siguientes parámetros en la simulación:

Para el electrodo de Oro:

Geometría: disco.

Material: Oro, seleccionado de la librería del software.

Densidad espacial de carga: -0.000002 C/cm^3 (*)

Para el electrodo de Platino:

Geometría: disco.

Material: platino, seleccionado de la librería del software.

Densidad espacial de carga: 0.00 C/cm^3 (*)

Para el electrodo auxiliar:

Geometría: anillo.

Material: acero ANSI 4340, seleccionado de la librería del software.

Densidad espacial de carga: 0.000002 C/cm^3 (*)

Para el agua:

Geometría: paralelepípedo, justo encima de los electrodos.

Conductividad: 0.07 S/m .

Permitividad eléctrica relativa: 80

Densidad espacial de carga: 0.00 C/cm^3

(*). Si bien es impropio hablar de distribución volumétrica de carga en un metal (C/cm^3), para fines de simulación se ha configurado el espesor del electrodo en 0.01 unidades mientras la columna de agua que está por encima tiene 1.00 unidades de altura. Por otro lado el software no permite definir en el módulo la densidad superficial de carga.

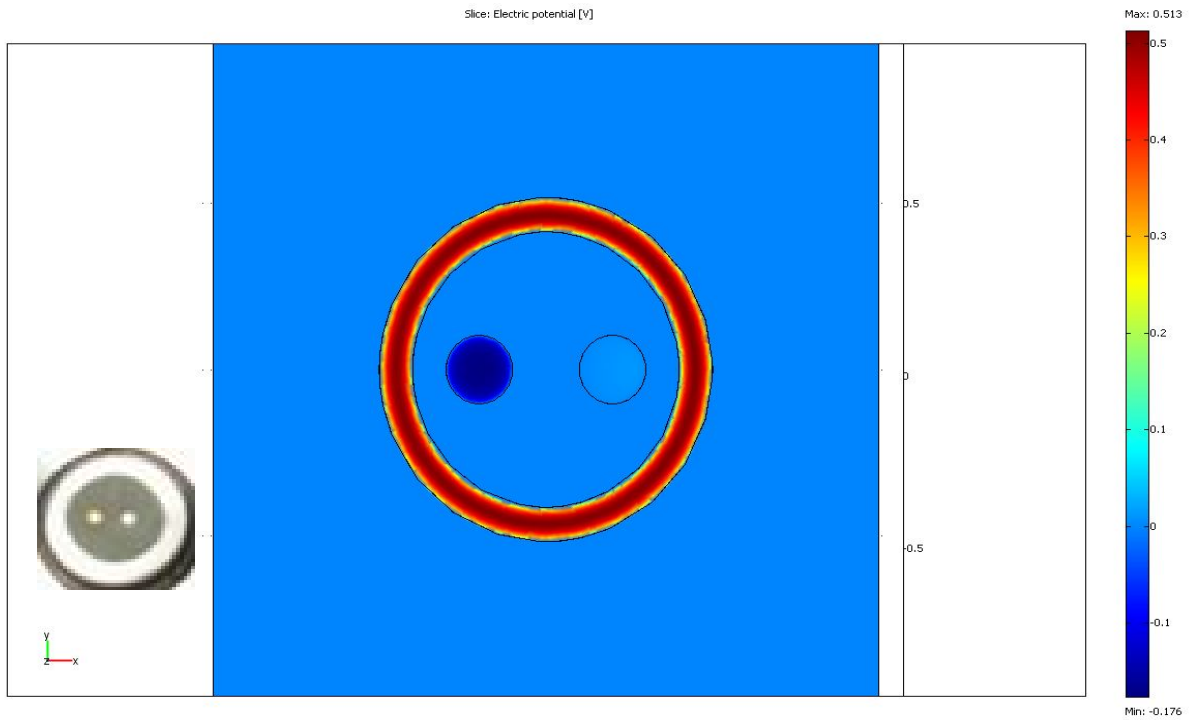


Figura 13. Vista de la distribución del potencial sobre los electrodos.

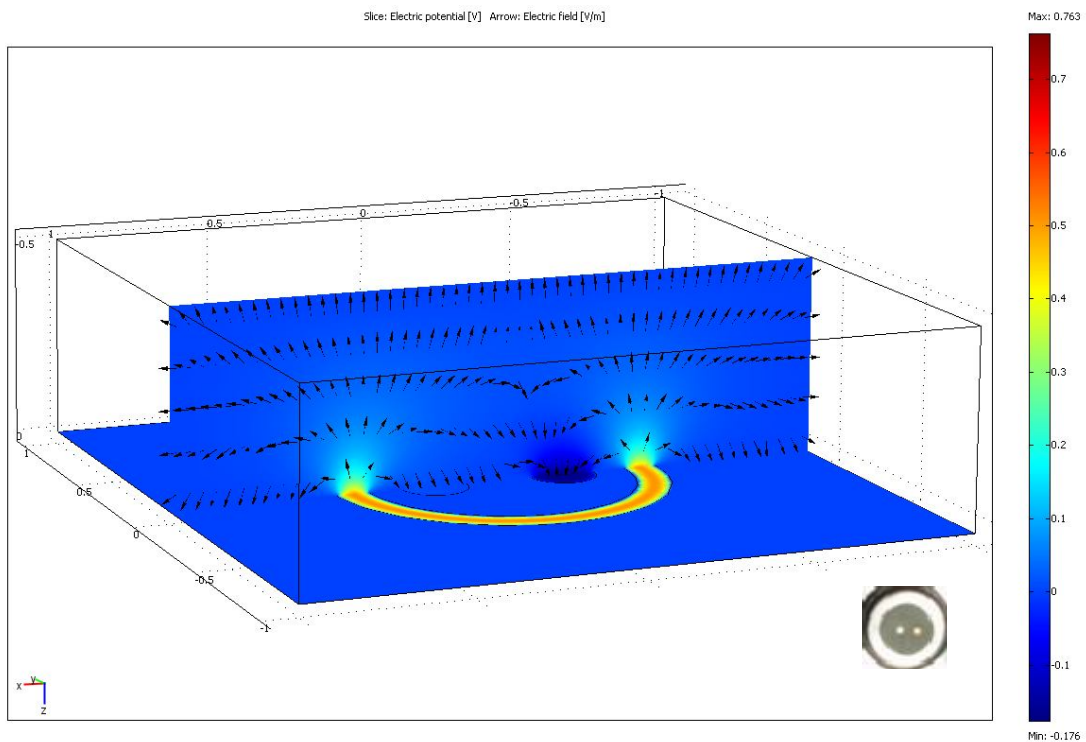


Figura 14. Vista de la distribución de potencial y vectores de campo eléctrico con longitud normalizada.

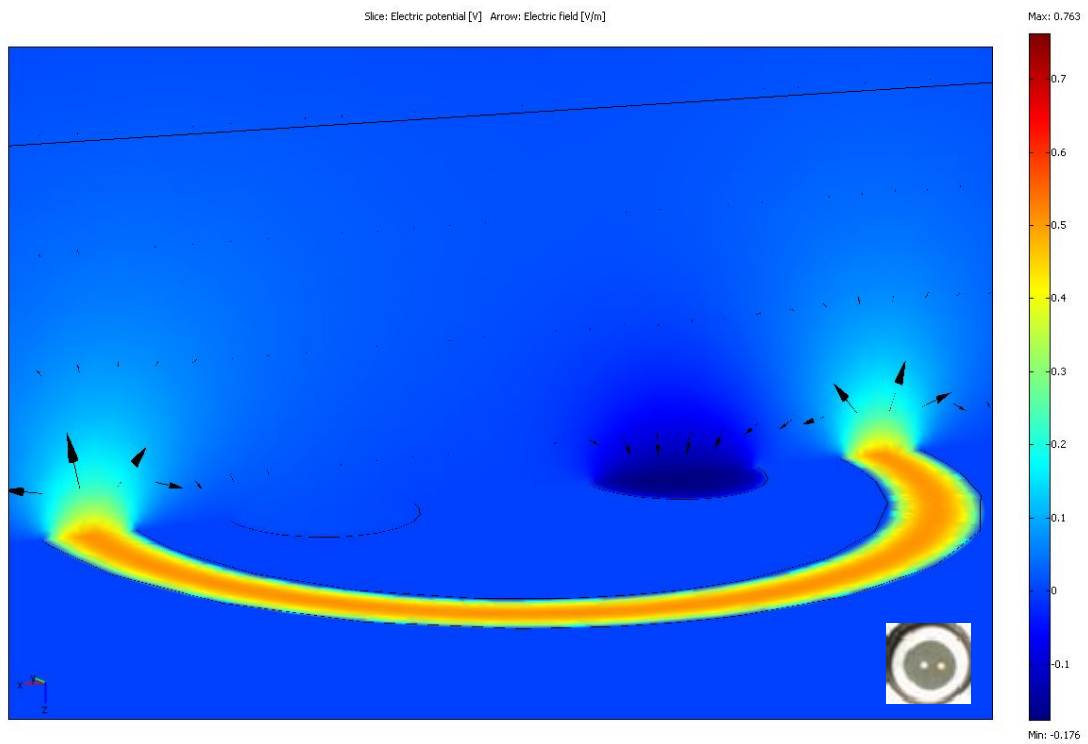


Figura 15. Ampliación de la vista de la distribución de potencial y vectores de campo eléctrico con longitud proporcional a su módulo.

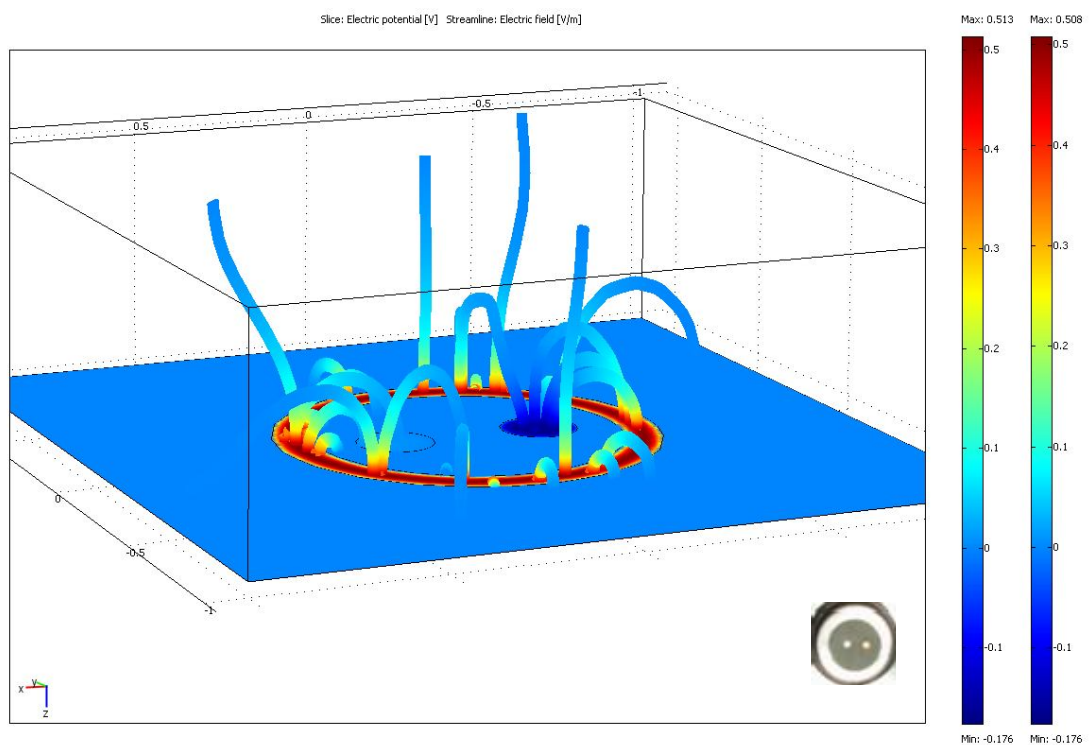


Figura 16. Vista de las líneas de campo y la distribución del campo eléctrico.

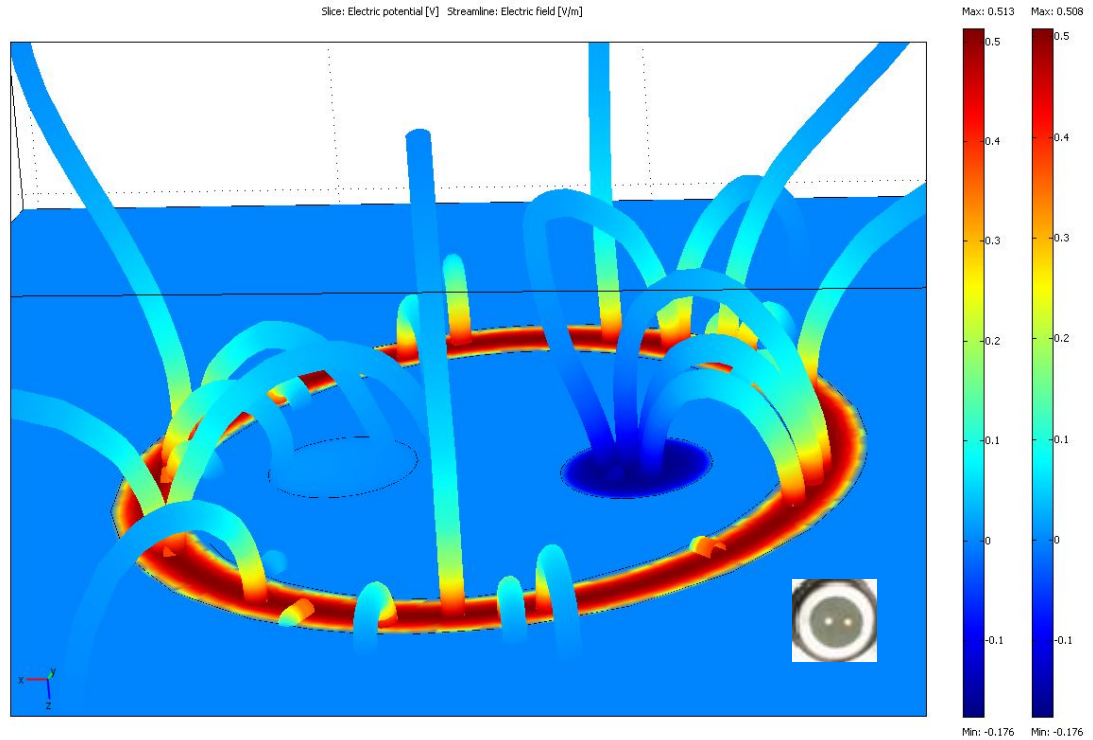


Figura 17. Ampliación de la vista de las líneas de campo y la distribución del campo eléctrico.

Las simulaciones para la configuración geométrica de los electrodos del sistema sensor verifican que el valor del potencial, tiene un valor alto cercano a los electrodos y desaparece a distancias lejanas de los mismos.

En todas las figuras (Figuras 13-17) se observa que el electrodo que no tiene un potencial asociado, aparece como si tuviese un potencial ligeramente mayor a cero. Esto puede deberse al efecto de una polarización en el conductor debida a la presencia de conductores cargados. En la Figura 15 se observa que los vectores de campo son casi nulos para distancias alejadas de los electrodos.

Por todo lo anterior se considera que todas las interacciones entre el líquido y el sensor para la técnica de voltametría de pulsos se dan en zonas muy cercanas a la superficie de los electrodos.

La onda de excitación inicialmente tiene un valor de potencial para el cual hay muy poca probabilidad que ocurran reacciones en la vecindad del electrodo de trabajo. Luego, conforme la onda de excitación cambia de valor, la diferencia de potencial

entre los electrodos de trabajo y auxiliar cambia. Debido a ello aparece una corriente que fluye hacia el electrodo de trabajo. Ésta corriente depende de las interacciones microscópicas que ocurren en la interfase metal-líquido del electrodo de trabajo y la muestra.

Las muestras líquidas reales (aguas de ríos, desechos líquidos de procesos industriales, bebidas comerciales, etc.) contienen una variedad muy grande de especies químicas, las cuales interactúan con los electrodos durante la medición, todas o parte de ellas interactúan con el electrodo de trabajo dando una señal de corriente característica de la muestra analizada.

Por ejemplo, cuando el sistema sensor se sumergió en jugo de naranja comercial y se aplicó la onda de voltaje de la Figura 12, se obtuvo la señal de corriente que se muestra en la Figura 18, en el electrodo de oro.

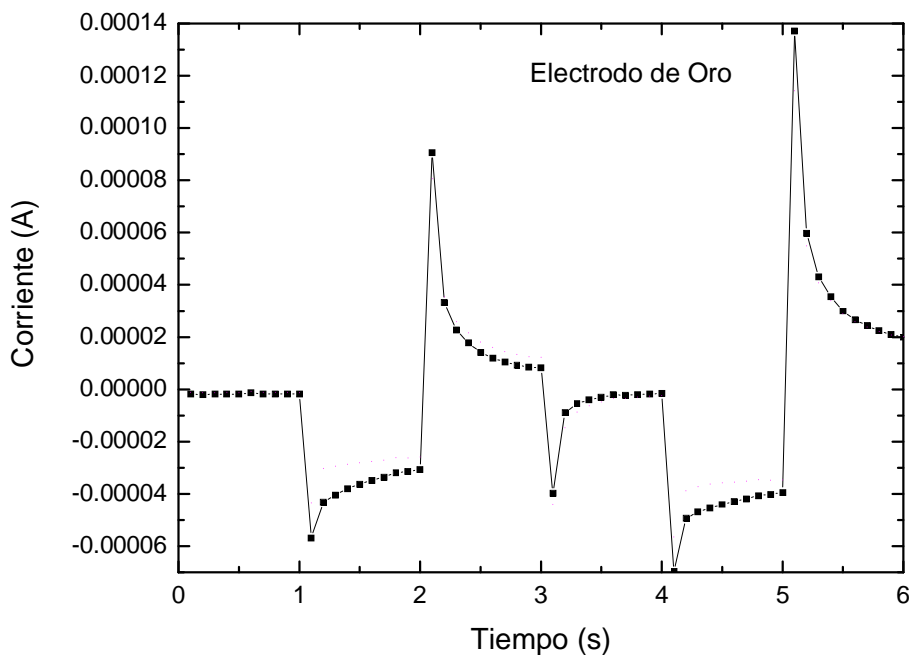
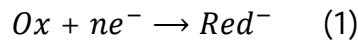


Figura 18. Señal de corriente obtenida para jugo de naranja comercial usando el electrodo de oro.

Cuando se aplica un potencial al electrodo de trabajo, aparecen dos tipos de interacciones, la primera corresponde a las reacciones de reducción y oxidación (redox) y la segunda corresponde a un reordenamiento de cargas sobre la superficie del electrodo.

Si una especie química se reduce en la superficie del electrodo, la reacción puede ser escrita como [36]:



Donde *Ox* es la forma oxidada y *Red* es la forma reducida de la especie química.

En equilibrio, ésta reacción redox tiene un potencial llamado potencial estándar (E_0). El potencial del electrodo en equilibrio ($E_{Electrodo}$) puede ser usado para establecer una relación entre la concentración de la forma oxidada (C_o) y la forma reducida (C_r) de la especie química, de acuerdo a la relación de Nernst [36]:

$$E_{Electrodo} = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{C_o}{C_r} \right) \quad (2)$$

La corriente redox (i_r), tiene un valor inicial grande cuando los compuestos cerca a la superficie del electrodo se oxidan o reducen, pero decae con el tiempo. La corriente decae de acuerdo a la ecuación de Cottrell [36]:

$$i_r = \frac{nFADC}{(\pi Dt)^{1/2}} \quad (3)$$

Donde A es el área del electrodo de trabajo, D es la constante de difusión y C es la concentración de la especie química. Para una concentración constante, la ecuación (3) se simplifica a [36]:

$$i_r = K \frac{1}{t^{1/2}} \quad (4)$$

Donde K es una constante.

Al aplicar un pulso de potencial de la onda de excitación (ver Figura 12), las especies cargadas y los dipolos que hay en el líquido se reorientan en regiones muy cercanas a la superficie del electrodo de trabajo, formando la doble capa de Helmholtz.

Un modelo simple de la doble capa formada en la vecindad de un electrodo metálico se presenta en la Figura 19. Hay una capa formada por moléculas de agua sobre la superficie del electrodo. Si éste electrodo está a un potencial negativo, los átomos de hidrógeno de las moléculas adsorbidas están orientados hacia el electrodo. Sin embargo esto no impide que compuestos neutros, o aniones específicos puedan también ser adsorbidos por la superficie, éste hecho hace que se desplacen algunas moléculas de agua adsorbidas en la superficie. Los cationes solvatados también son atraídos al electrodo, sin embargo no se puede decir que son adsorbidos por la superficie debido a la presencia de las moléculas de agua que rodean a estos cationes.

Si la superficie del electrodo tiene una polaridad positiva, los átomos de oxígeno presentes en las moléculas de agua son atraídos al electrodo, de esa manera las moléculas de agua son adsorbidas por el electrodo. También compuestos neutros y aniones específicos son adsorbidos por el electrodo. De manera similar al caso anterior aniones solvatados son atraídos por el electrodo pero no son adsorbidos.

En el electrodo de trabajo la corriente de carga de la doble capa (i_c) inicialmente se incrementa rápidamente mientras se configuran las capas y luego decae exponencialmente hasta que la corriente alcanza el nivel de la corriente redox.

Ésta corriente (i_c), tiene un comportamiento similar a la corriente de carga de un capacitor en serie con un resistor como se indica en la ecuación [36]:

$$i_c = \frac{E * e^{(-\frac{t}{R_b} * C_{dc})}}{R_b} \quad (5)$$

Donde R_b es la resistencia eléctrica de la solución en zonas alejadas de la superficie de los electrodos (zona bulk), t es el tiempo y C_{dc} un equivalente a la capacitancia que tendría el electrodo debido a la doble capa.

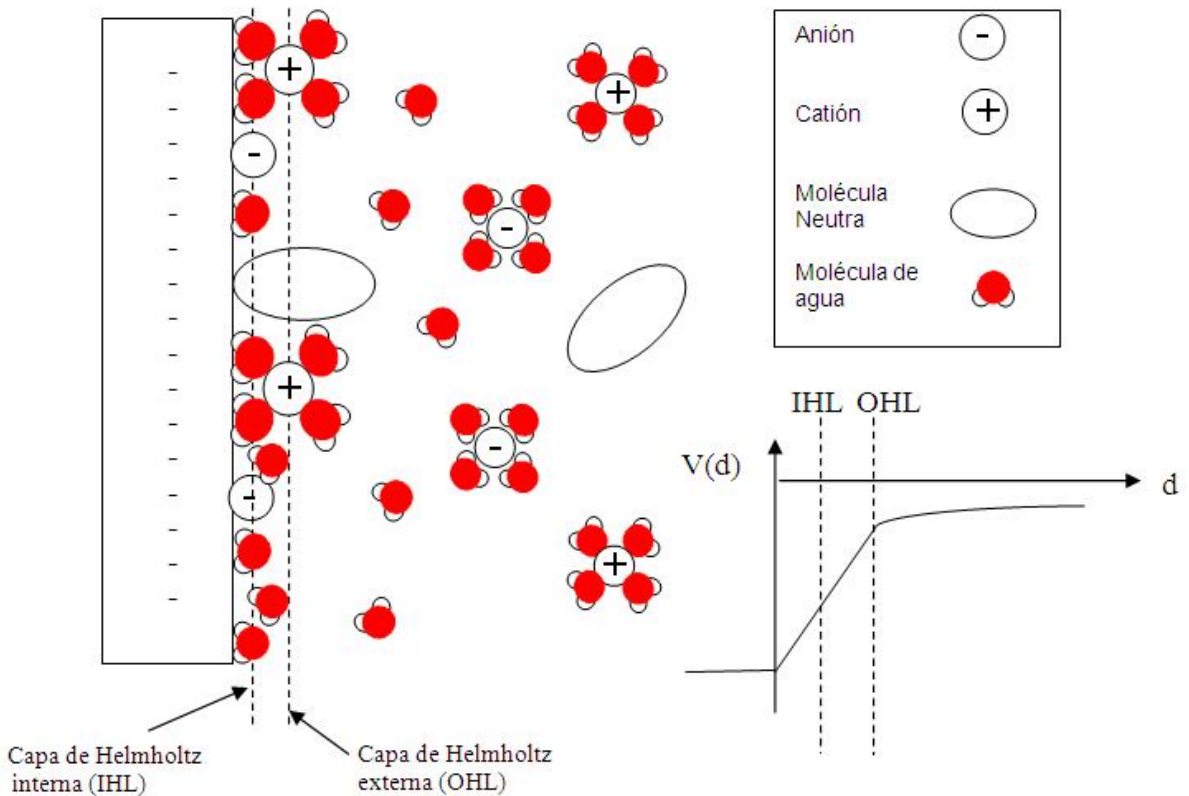


Figura 19. Estructura de la doble capa, sobre el electrodo de trabajo que tiene un potencial negativo.

Todo el sistema sensor por tanto podría ser modelado. Considerando, que el comportamiento de la doble capa es de característica capacitiva, se puede modelar como un capacitor de valor C_{dc} . Que es posible también la existencia de corrientes redox, lo que haría que el capacitor se pueda descargar. Ello se puede modelar con elementos de descarga como una resistencia de valor R_{dc} conectada en paralelo al capacitor C_{dc} . Además que en la zona sucesiva (capa difusa) y la zona bulk no existe separación de carga, por tanto no tiene comportamiento capacitivo de tal manera que se pueden modelar como una resistencia eléctrica de valor R_b . El electrodo auxiliar

también presenta una doble capa y se podría modelar como una resistencia y un condensador.

Por tanto la impedancia total del sistema es la suma de las impedancias del electrodo de trabajo (Z_W), líquido (Z_B) y electrodo auxiliar (Z_{AUX}).

$$Z = Z_W + Z_B + Z_{AUX} \quad (6)$$

Sin embargo la impedancia de un electrodo es inversamente proporcional a su área [22] y como el área del electrodo auxiliar es mucho mayor que la del electrodo de trabajo, entonces la ecuación (6) queda expresada como:

$$Z = Z_W + Z_B \quad (7)$$

Todo el sistema entonces se podría simular por el circuito equivalente mostrado en la Figura 20.

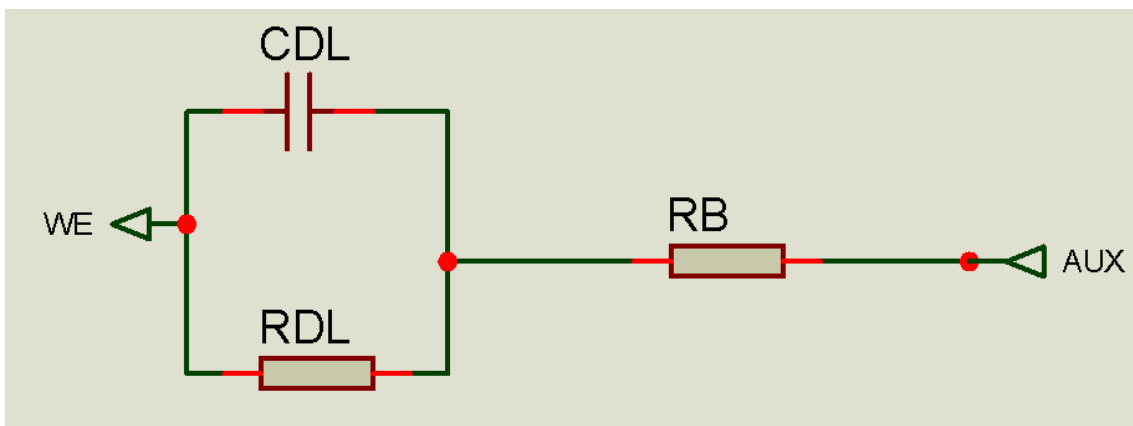


Figura 20. Equivalente eléctrico para el sistema compuesto por electrodo de trabajo – muestra líquida - electrodo auxiliar.

2.2.1.2 Potenciostato.

Un potenciostato es un instrumento que permite la generación y la medición de voltajes y corrientes de valores pequeños.

Para el presente trabajo se utilizó el potencióstato Uniscan® modelo PG560 para construir la lengua electrónica. Éste potencióstato tiene la posibilidad de realizar experimentos de voltimetría de pulsos (cronoamperometría) y usar varios electrodos de trabajo, además de ser totalmente programable. Detalles de la configuración y programación se dará en la parte experimental de la tesis.

En la Figura 21 se observa el diagrama esquemático general de un potencióstato. La onda de excitación se genera a través de un generador de señales o en la práctica un microcontrolador con un convertidor digital analógico. La señal ingresa al amplificador U1:A configurado como amplificador inversor con ganancia 1. La señal invertida se aplica al electrodo Auxiliar. El amplificador U1:B está configurado para darle una señal de referencia al amplificador U1:A. El amplificador U2:A está configurado como convertidor de corriente a voltaje, debido a ésta configuración, la entrada inversora siempre está a nivel de tierra. Ésta entrada es la que está conectada al electrodo de trabajo. La señal de corriente se mide a la salida del amplificador U2:A.

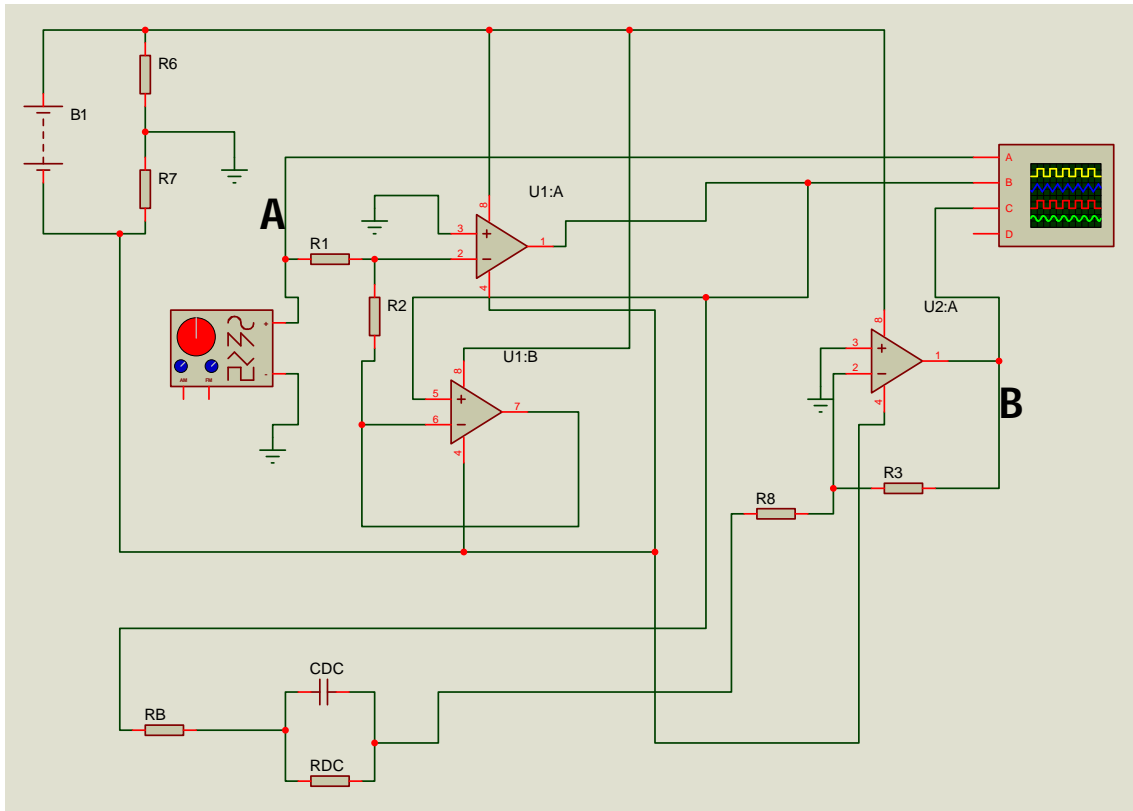


Figura 21. Diagrama esquemático de un potencióstato.

Este circuito se simuló en Lab Center Electronics Proteus®, verificando que para el circuito equivalente propuesto en la Figura 20, se obtiene una respuesta de corriente (punto B, ver Figura 22) similar a la experimental (ver Figura 18), cuando se le da una serie de voltajes (Punto A, ver Figura 22) similar a la onda de excitación (ver Figura 12).

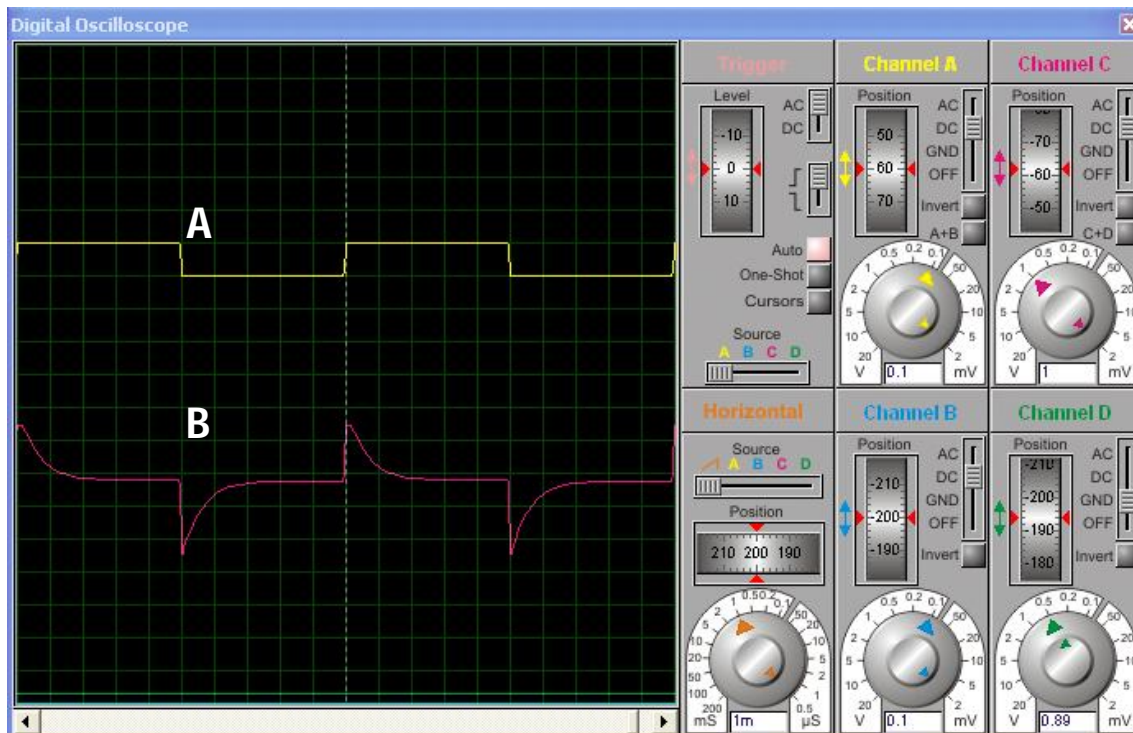


Figura 22. Resultado de la simulación del circuito equivalente al sistema electrodo de trabajo- liquido muestra – electrodo auxiliar medida en el circuito de un potencistato general.

La lengua electrónica diseñada en la presente tesis es un sistema multisensor con las siguientes características:

Sistema sensor:

Arreglo de dos sensores multiparamétricos formados por una celda electroquímica con dos electrodos de trabajo (oro y platino).

Sistema electrónico:

Basado en el potencistato Uniscan® PG560, conectado a una PC compatible.

La respuesta del sistema sensor es un vector v_i característico para una muestra "i":

$$v_i = [I_{Au,i,1}, \dots, I_{Au,i,k}, I_{Pt,i,1}, \dots, I_{Pt,i,k}] \quad (8)$$

Donde:

v_i : Vector de respuesta de la lengua electrónica para la muestra "i".

$I_{Au,i,k}$: k-esima corriente del electrodo de Au, para la muestra i-esima.

$I_{Pt,i,k}$: k-esima corriente del electrodo de Pt, para la muestra i-esima.

2.2.2 Sistema CSPT de reflectancia.

CSPT (Computer Screen Photo-assisted Technique) es un método que utiliza pantallas de computadora como fuente de luz y webcams como detectores de imágenes para la evaluación óptica de pruebas biológicas y químicas de diverso tipo. Esta técnica fue desarrollada por D.Filippini en la Universidad de Linköping, Suecia [39,40].

La disponibilidad y versatilidad del hardware necesario para hacer mediciones con CSPT hace que éste método sea muy atractivo para la evaluación de múltiples parámetros.

El CSPT usaba exclusivamente transmitancia para evaluar muestras. En el presente trabajo, se usó el CSPT para diferenciar muestras a través de la reflectancia.

La Figura 23 muestra el esquema general del hardware CSPT para clasificación de muestras por reflectancia.

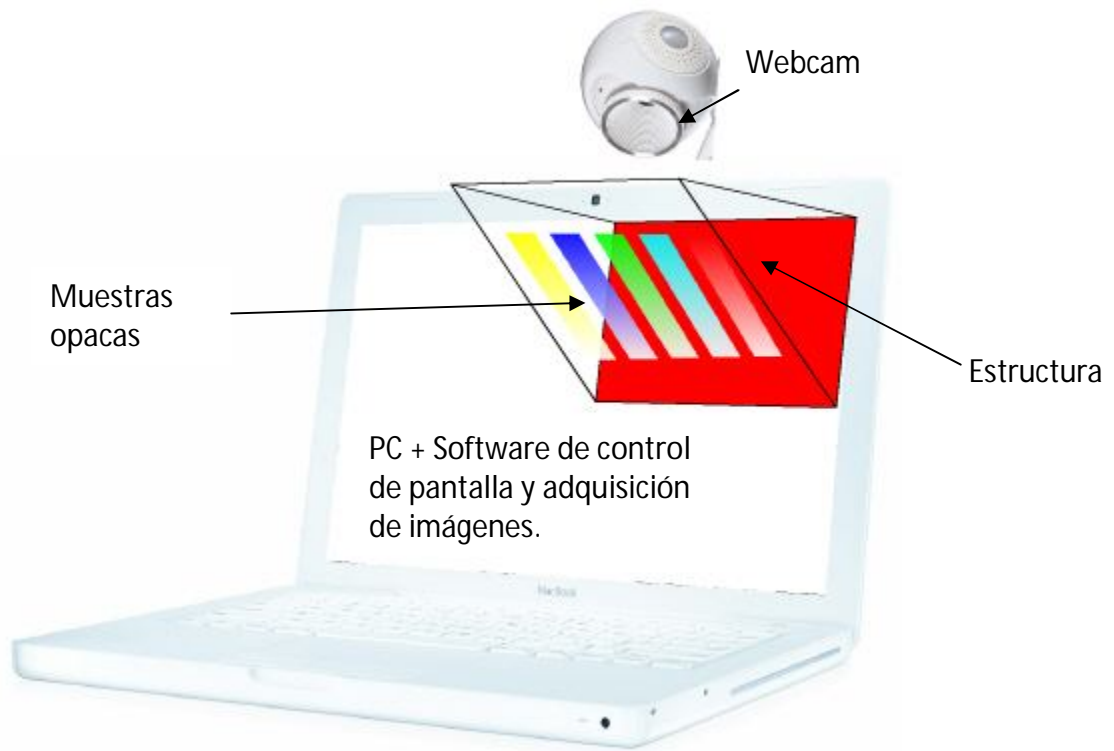


Figura 23. Diagrama de la configuración del hardware para la clasificación de muestras opacas por CSPT.

La teoría del color indica que todos los colores se pueden generar en base a tres colores primarios. La combinación de estos tres colores se puede dar de forma activa, es decir a través de la combinación de luces de tres colores.

El modelo RGB (R, rojo ; G, verde; B, azul) indica que todos los colores se pueden generar a través de la combinación de luces de color rojo, verde y azul de diferentes intensidades. Éste modelo es utilizado para generar los colores en las pantalla de LED, LCD, Plasma, etc. Además los sistemas de captura de imágenes como las cámaras digitales (webcam) también usan éste modelo para codificar la imagen en una matriz de datos digitales.

Los valores de la intensidad de luz de los colores rojo (R), verde (G) y azul (B) crean un espacio matemático llamado espacio de color (ver Figura 23). Los valores de intensidad van desde 0% hasta 100%, sin embargo dependiendo del software usado para

controlar los colores del monitor estos valores pueden ser representados por un número entre 0 y 1, ó un número entero entre 0 y 255.

En el presente trabajo se usará un número entero 0 a 255 y en el formato de la ecuación (9):

$$Color = [r, g, b]; r, g, b \in [0..255] \quad (9)$$

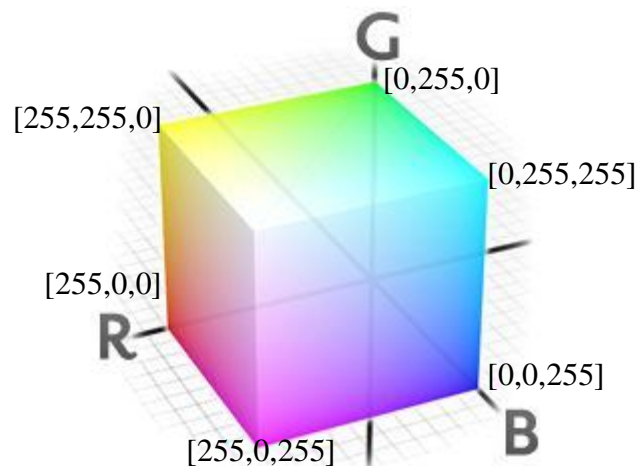


Figura 24. Espacio RGB para los colores generados por el monitor.

Los colores generados por una pantalla de una computadora puede ser programada directamente por cualquier lenguaje de programación adecuado para el sistema operativo usado.

De ésta manera se puede generar cualquier secuencia de colores la cual se usa para iluminar a las muestras.

Un pixel se define como la mínima cantidad de imagen que puede ser controlada por el software. El tamaño de un pixel no necesariamente es el mismo siempre, dos fotos vistas en un mismo monitor pero tomadas con cámaras de diferente resolución podrían verse del mismo tamaño del monitor.

La resolución máxima de un monitor consta del producto del número de los elementos más pequeños donde cada uno de ellos puede cambiar de color de acuerdo a la ecuación (9). Por ejemplo una resolución de 1024x768 pixels significa que la pantalla posee 1024x768 elementos, Éste elemento consta de tres emisores de luz, uno de color rojo otro verde y otro azul (ver Figura 25). Cada uno de estos emisores de luz puede cambiar de intensidad independientemente por software.

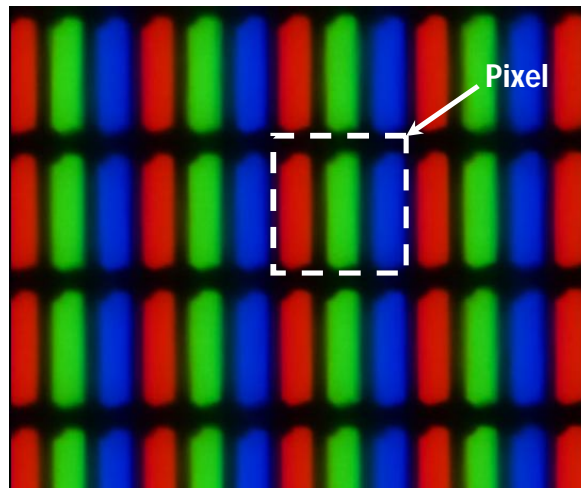


Figura 25. Emisores de luz programables de un monitor LCD.

El color emitido por un monitor es la combinación lineal de la irradiancia de los tres colores primarios $R(\lambda)$, $G(\lambda)$ y $B(\lambda)$, de tal manera que la secuencia arbitraria de los q colores de iluminación del CSPT se puede generar por [41]:

$$C_q(\lambda) = r_q \cdot R(\lambda) + g_q \cdot G(\lambda) + b_q \cdot B(\lambda) \quad (10)$$

Donde los parámetros r_q, g_q, b_q son los moduladores de la iluminación q . Donde $q \in [1..S]$, $\lambda \in [390nm, 700nm]$. Donde S es el número de colores emitidos.

Una webcam está compuesta por un sistema óptico, un sensor CMOS y el software necesario para el control de la cámara. Las siglas CMOS significan Complementary Metal Oxide Semiconductor que es la tecnología de fabricación que se usa para producir éstos sensores.

El sistema óptico está formado por una o varias lentes que enfocan al objeto sobre la superficie del sensor CMOS. Además de las lentes existe un filtro que impide el paso de luz con una longitud de onda por encima de 700nm. La respuesta espectral de una webcam por lo general está entre 390nm y 700nm.

El sensor de imagen CMOS es una matriz de fotodiodos aunada a un sistema electrónico que permite la digitalización de una imagen.

En la Figura 26 se muestra el esquema de una webcam donde se muestra el sensor CMOS.

El sensor de imagen CMOS está formado por un conjunto de fotodiodos y convertidores corriente voltaje (I/V) ordenados en "M" filas y "N" columnas. Cuando se enfoca la imagen sobre el sensor CMOS, cada uno de los fotodiodos recibe luz con cierta intensidad. La luz llega a la juntura del fotodiodo, se genera una interacción fotón-electrón, cada fotón le da la energía necesaria a un electrón para que pueda vencer la barrera de potencial definida en la juntura, generándose una corriente. A mayor intensidad de luz se incrementa la probabilidad de que un electrón venza la barrera de potencia y alcance la banda de conducción, por tanto el número de interacciones también se incrementa, incrementándose el voltaje a la salida de conversor I/V. Por tanto a mayor intensidad de luz mayor voltaje.

Los circuitos de acceso a fila y columna permiten obtener el valor de voltaje de cada elemento ubicado en cierta fila y columna. Éste voltaje ingresa a un convertidor analógico-digital el cual transforma éste voltaje en una palabra digital. Los circuitos de sincronización, oscilador y de control permitan acceder en secuencia a todos los elementos fotodiodo-convertidor, permitiendo obtener una matriz de datos digitales de voltajes ($p_{i,j}$) que representan a la imagen del objeto. La imagen entonces se puede representar por una matriz I:

$$I = p_{i,j} ; i \in [1..M], j \in [1..N] \quad (11)$$

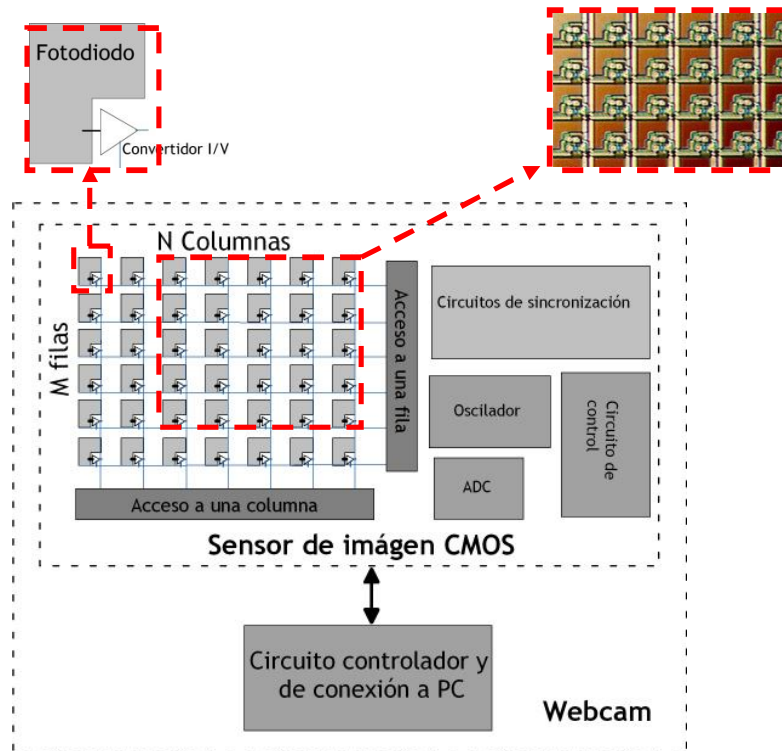


Figura 26. Diagrama simplificado de una Webcam.

La imagen I, así generada es una imagen en escala de grises y no tiene ninguna información acerca del color del objeto.

Se utiliza nuevamente el modelo de color RGB para registrar una imagen a color. En éste caso la filosofía de trabajo consiste en que el sensor de imagen se comporte como la retina del ojo humano, donde para cada posición (i,j) deberían existir tres sensores, cada uno de ellos sensible a una región del espectro electromagnético entre 400nm y 600nm. De ésta manera tener uno de ellos que sea sensible a la luz con longitud de onda baja ("rojo", máximo de absorción entre 564-580nm) el cual correspondería al pigmento bio-fotosensible "L" de un cono de la retina. El siguiente, a la luz con longitud de onda media ("verde", máximo de absorción entre 534-545nm) el cual correspondería al pigmento bio-fotosensible "M". Y el último sensible a la luz con longitud de onda pequeñas ("azul", máximo de absorción entre 420-440nm) el cual correspondería al pigmento bio-fotosensible "S".

Por ello los sensores de imagen CMOS a color poseen un recubrimiento delgado fabricado sobre el arreglo de fotodiodos, llamado "Filtro de Bayer" (ver Figura 27). De tal manera que cada fotodiodo está cubierto por un recubrimiento que solo deja pasar un rango de longitudes de onda entre 390nm y 700nm, de la misma manera que sucede en el ojo humano. Cada fotodiodo está detrás de un filtro rojo (R), o verde (G) o azul (B).

La imposibilidad de colocar en una misma posición (i,j) tres fotodiodos con filtro RGB, hace que se requiera interpolar valores de fotodiodos cercanos para cada posición (i,j) y esté representada por una terna de valores $(r_{i,j}, g_{i,j}, b_{i,j})$. De tal manera que una imagen a color cuya resolución es $M \times N$, está representada por la hyper-matriz $I_{M \times N \times 3}$ donde:

$$I_{M \times N \times 3} = [r_{i,j}, g_{i,j}, b_{i,j}]; i \in [1..M], j \in [1..N] \quad (12)$$

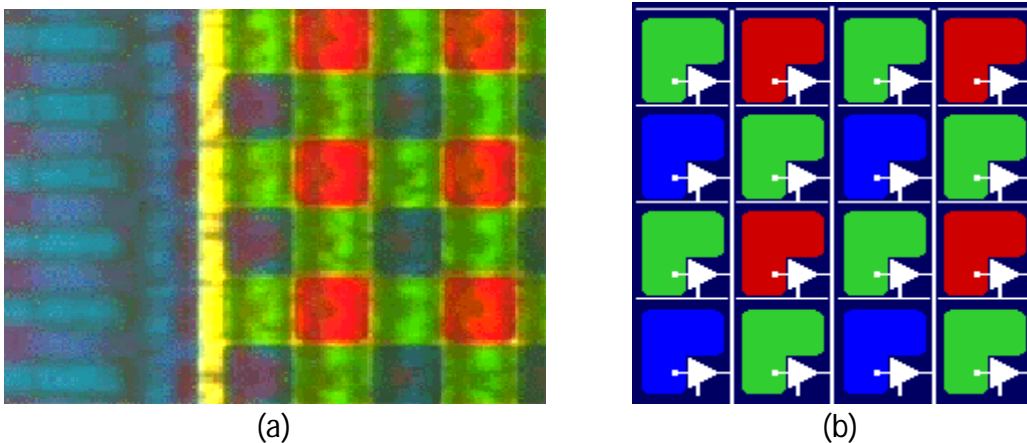


Figura 27. (a) Filtro de bayer colocado sobre el arreglo de fotodiodos del sensor de imagen CMOS. (b) Esquema de los fotodiodos y convertidores.

En la técnica CSPT la muestra se ilumina con la luz de la pantalla de la computadora, la secuencia de colores de iluminación de la muestra es totalmente programable, de tal manera que la iluminación se optimiza en base a la muestra [41].

Se toma un video de la muestra mientras el color de la iluminación cambia en forma sincronizada. Para cada iluminación $C_q(\lambda)$ existe una imagen $I_{M \times N \times 3}$.

El monitor ilumina la muestra con luz de color “ $C_q(\lambda)$ ”, existe una interacción entre la luz y la muestra. La luz que sale de la muestra es función de la reflectancia “ $\Gamma(\lambda)$ ”, para cada fotodiodo del arreglo se tiene una terna de funciones correspondientes al filtro de Bayer [$F_R(\lambda), F_G(\lambda), F_B(\lambda)$] y además los fotodiodos del arreglo del sensor de imagen tienen una respuesta espectral $D(\lambda)$. Por tanto las intensidades para cada posición y para cada canal se calculan por [41]:

$$I_R(q) = \int C_q(\lambda) * \Gamma(\lambda) * F_R(\lambda) * D(\lambda) * d\lambda \quad (13)$$

$$I_G(q) = \int C_q(\lambda) * \Gamma(\lambda) * F_G(\lambda) * D(\lambda) * d\lambda \quad (14)$$

$$I_B(q) = \int C_q(\lambda) * \Gamma(\lambda) * F_B(\lambda) * D(\lambda) * d\lambda \quad (15)$$

Donde $q \in [1..S]$, $\lambda \in [390\text{nm}, 700\text{nm}]$.

En la imagen se definen áreas de interés, las cuales se diseñan de acuerdo a lo que se desea medir en la muestra y la técnica óptica usada (transmisión, reflexión, fluorescencia, SPR, etc). Estas áreas de interés definen el arreglo de sensores de un sistema multiparamétrico de medición y los valores I_R, I_G, I_B se combinan para dar como respuesta un vector característico de la región definida en la muestra. .

Por ejemplo si se tuviese una muestra como la que se observa en la Figura 28 (a), se pueden definir cinco regiones de interés (ver Figura 28 (b)) y los pixels encerrados en estas regiones se analizan usando las ecuaciones (13), (14) y (15).

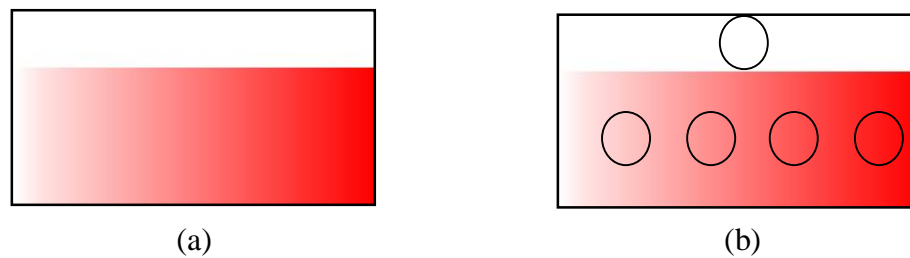


Figura 28. (a) Muestra de ejemplo, (b) Muestra donde se observan que se han definido cinco regiones de interés.

Se puede realizar promedios dentro de las regiones de interés (ver Figura 28), de tal manera que para cada región se tiene un solo vector de la forma:

$$I_m = [I_R(q), I_G(q), I_B(q)], \forall q \in [1..S] \quad (16)$$

Este vector posee $3q$ componentes y es un vector representativo del área de interés "m". Por lo general el área de interés coincide con los elementos activos del test a evaluar, por ejemplo coincidiría con las áreas que contienen a los componentes bioquímicos que cambian de color en un test de papel para análisis médicos o en un sensor de nariz optoelectrónica [21] (ver Figura 29).

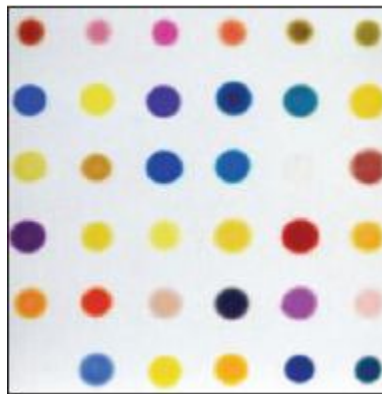


Figura 29. Sensor de una nariz optoelectrónica desarrollada por Suslick [21].

CSPT por tanto puede ser clasificado como un sistema de medición multiparamétrico el cual permite la clasificación de muestras por sus características espectrales. Los sensores multiparamétricos del arreglo (áreas de interés en la imagen) quedan definidos por el usuario y puede definir tantos como la resolución de la cámara lo permita. La respuesta del Sistema de Medición Multiparamétrico CSPT consta de un vector $I_m(q)$ de $3q$ componentes para cada área de interés.

CSPT es una arquitectura abierta, es decir se pueden utilizar diferente tipos de sensores activos, desde el mostrado en la Figura 29, el cual cambia la absorbancia espectral de cada uno de sus componentes en función al gas hasta exámenes médicos de diverso tipo, pasando por pruebas que se basan en fluorescencia y "surface plasmon resonance".

En el presente trabajo se muestra parte del cálculo de la referencia [4] en donde por primera vez se demostró que CSPT podía diferenciar muestras opacas.

Se uso el sensor de color comercial Honeywell CRS301 (ver Figura 30) como instrumento patrón para la diferenciación de muestras opacas. Éste instrumento es un espectrofotómetro de reflexión para el espectro visible con rango entre 400nm y 700nm con una resolución aproximada de 3nm.

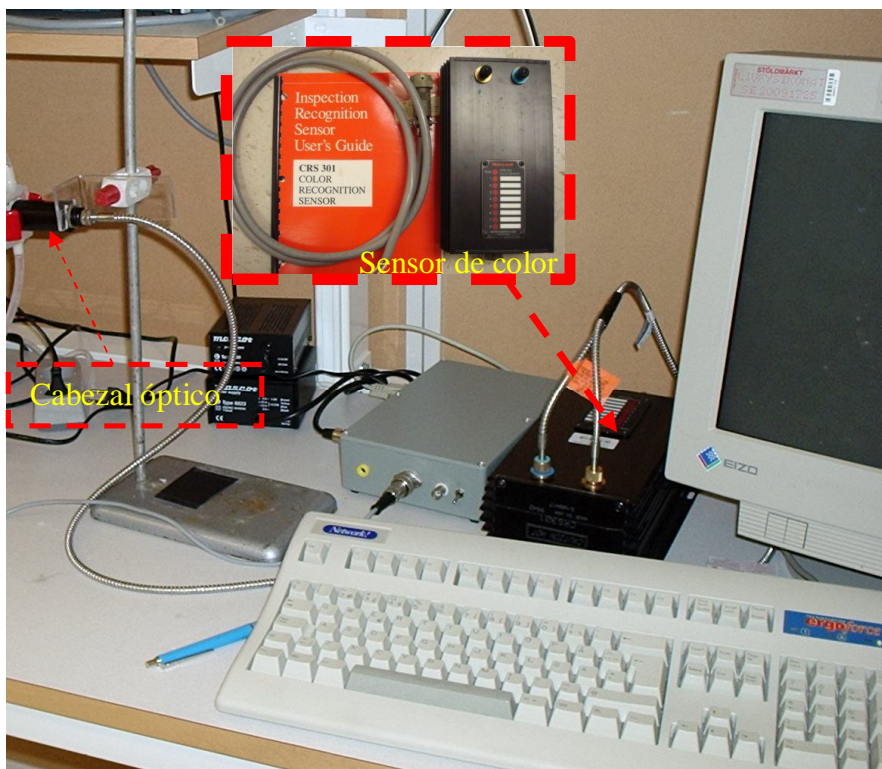


Figura 30. Sensor de color comercial Honeywell CRS301.



3. Trabajo Experimental

3. Trabajo experimental.

Se desarrollaron y usaron los siguientes sistemas de medición multiparamétricos (SMMP):

- Lengua Electrónica Voltamperométrica.
- Sistema CSPT basado en reflectancia.

Por ser SMMP, ambos sistemas poseen la misma estructura:

- un sistema sensor de salida multiparamétrica.
- una electrónica asociada y propia a cada uno de los sistemas.
- un software de análisis PCA, el cual fue el mismo para ambos sistemas.

La Lengua Electrónica Voltamétrica (VET) se utilizó para clasificar agua contaminada con E.coli, esto está relacionado con el atributo calidad de agua como se mencionó en el Capítulo 1.2. La señal proveniente del sensor en contacto una muestra estuvo compuesta por 60 valores de corriente, los cuales definieron el vector característico de la muestra el cual se usó como entrada en el software PCA. De esta manera se generaron la gráficas de puntuaciones de componentes principales.

Se usó el método microbiológico estándar (MF) como patrón para la medición de la concentración de E.coli en todas las muestras medidas con la lengua electrónica.

De tal manera que considerando las medidas patrones, se demostró lengua electrónica pudo clasificar muestras contaminadas con E.coli.

El sistema CSPT basado en reflectancia, demostró por primera vez que es posible usar la técnica CSPT para clasificar muestras opacas. Las muestras opacas usadas en la presente tesis fueron impresiones sobre papel blanco de diferentes colores (amarillo, azul, verde, cian y rojo) y cada impresión tuvo un gradiente de tonalidad que varió

desde el máximo del tono de color conseguido con la impresora hasta que no existía color y solo quedaba el papel blanco.

Las muestras opacas así fabricadas poseen la mismas características ópticas que las pruebas médicas bio-colorimétricas las cuales consisten en impresiones de un compuesto sobre papel blanco. Éste compuesto cambia de color de acuerdo a lo que se desea analizar, como se mencionó en el Capítulo 1.3.

Con el sistema CSPT, se usó el monitor de la PC para iluminar las muestras con luz de diferente color y al mismo tiempo se adquirió una imagen del conjunto de las muestras con la webcam, en sincronía con cada color de iluminación.

Luego de un procesamiento digital de imágenes se obtuvo el vector característico para cada muestra. Éstos vectores característicos se usaron como entrada del software PCA, obteniendo la gráfica de puntuaciones de componentes principales, encontrándose que el sistema CSPT pudo clasificar las muestras. También se midieron las muestras con un “sensor de color” industrial encontrándose que el sistema CSPT pudo clasificar a las muestras opacas con mejor performance que el “sensor de color” comercial.

Ambos sistemas, Lengua electrónica y CSPT, poseen la misma estructura debido a que ambos son sistemas de medición multiparamétrica. En la presente tesis se ha demostrado el uso de éstos dos sistemas para clasificación de muestras que tienen gran potencial en los campos de control ambiental y salud pública.

3.1. Clasificación de muestras contaminadas con *E.coli* usando una Lengua Electrónica Voltamperométrica (VET).

3.1.1. Fabricación de una VET.

3.1.1.1 Sistema sensor.

Se fabricó el cabezal sensor con las consideraciones de diseño vistas en el capítulo 2.2 (ver Figura 31). La estructura de soporte es de acero inoxidable y funciona como

electrodo auxiliar (AUX). Los electrodos de trabajo se fabricaron con alambre de oro (Premion®, 1mm de diámetro, con una pureza de 99.985%) y platino (World Precision Instruments Inc, 1mm de diámetro, Item PTP406). El aislante que soporta a los electrodos de trabajo en la estructura del electrodo auxiliar es acrílico dental (3M ESPE Valux Plus).

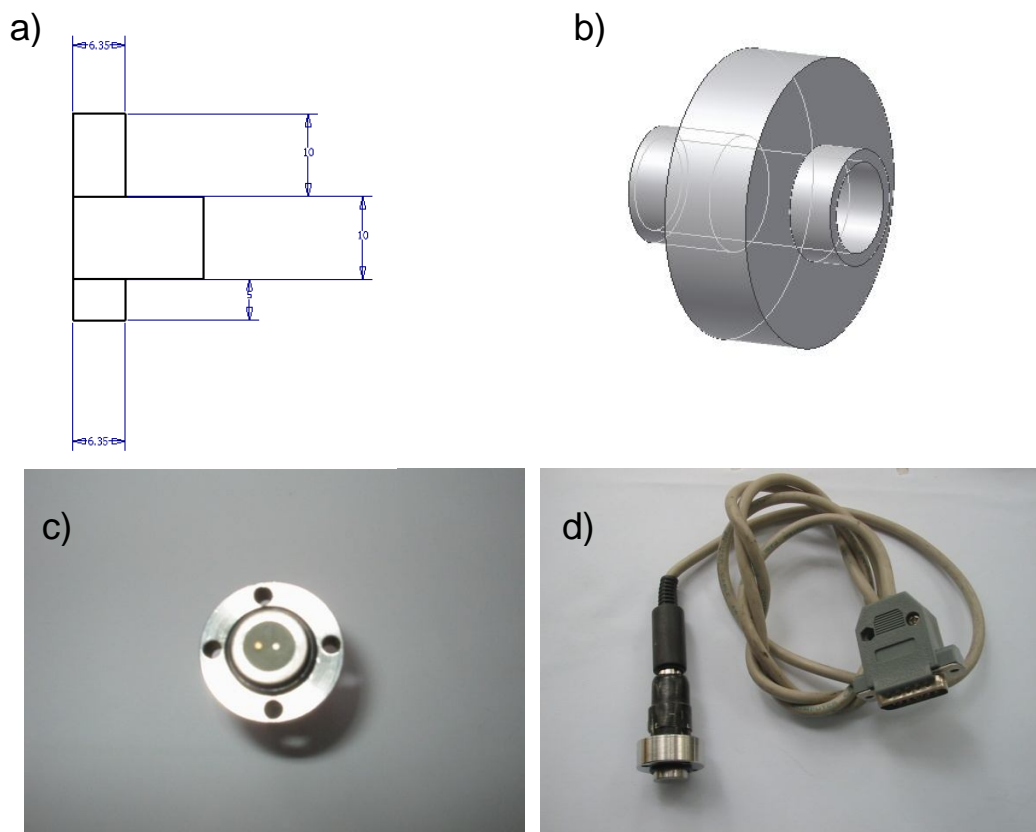


Figura 31. Electrodo diseñado para el sistema, (a) Vista lateral parcial, (b) Vista 3D, (c) Fotografía de la parte superior del sistema, y (d) Fotografía del sistema sensor y conexión eléctrica.

Para automatizar la medición de líquidos e incrementar la reproducibilidad en la toma de muestras, se fabricó una cámara de líquidos la cual consiste de una estructura hecha en Teflon® (ver Figura 32), y una bomba para líquidos (Hargraves LTC series W311-11). El sistema posee cinco entradas, durante el proyecto solo se usó la entrada horizontal. El volumen de líquido contenido en la cámara ubicada justo debajo del área activa del sensor es 1.9cm^3 .

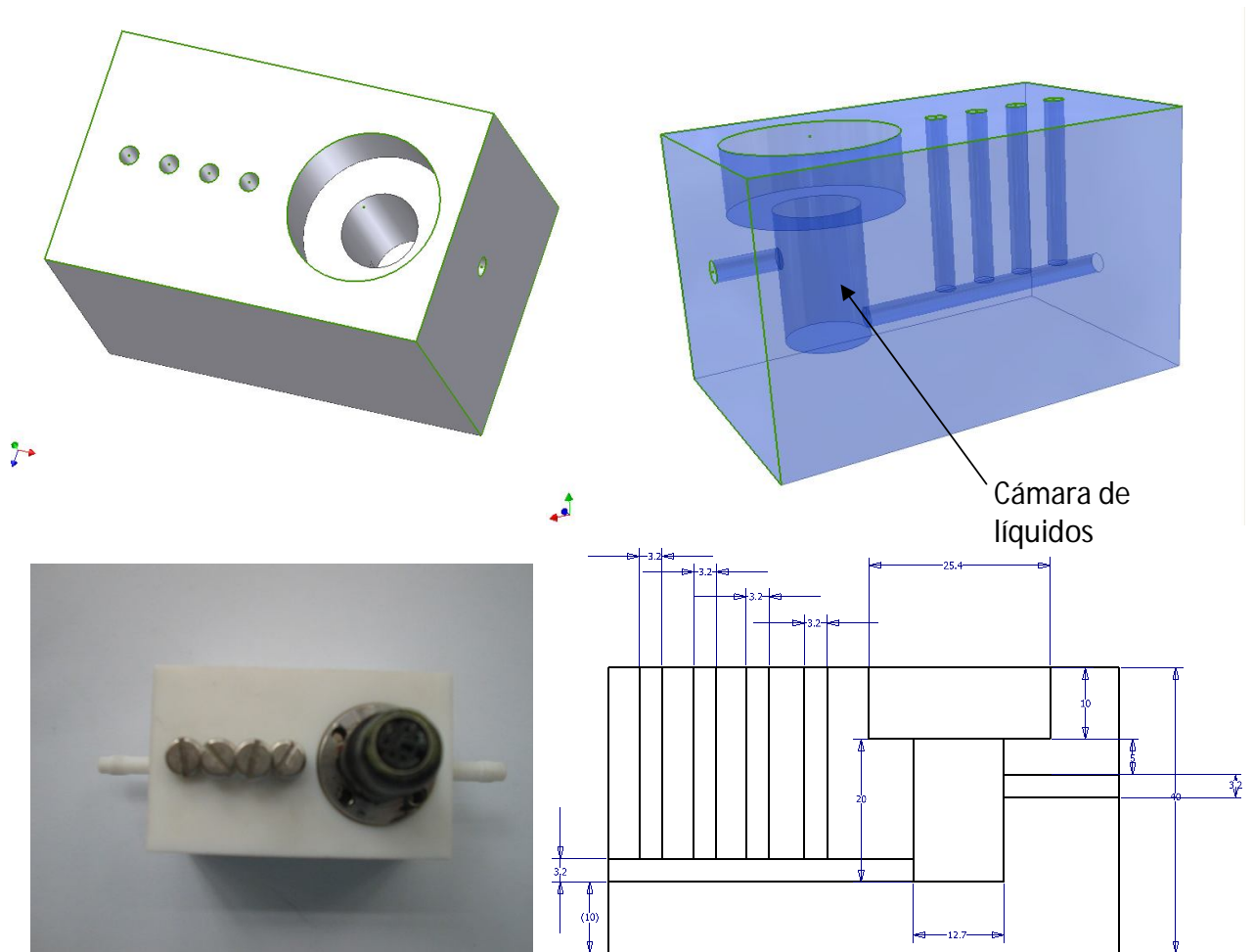


Figura 32. Celda electroquímica diseñada para el prototipo de sistema de medida de calidad de agua.

3.1.1.2 Sistema electrónico.

Se utilizó un potencióstato portátil (Uniscan PG580) con entrada para múltiples electrodos de trabajo conectado con a una PC (HP pavilion ze5600 con adaptador Trendnet SU-9 RS232) para realizar las mediciones.

El potencióstato posee su propia librería OCX, lo que permite programarlo fácilmente.

Se usó la conectividad de LabVIEW® a través de ActiveX para programar el potencióstato, de tal manera de configurar el "modo" del potencióstato en Cronoamperometría, la forma de la onda de voltaje de excitación, la razón de muestreo, el rango de voltaje, el número de mediciones a ser realizadas y el nombre

del archivo para guardar los datos (ver Figura 33). El formato en el archivo ordena los datos de corriente en columnas y el tiempo de cada dato en filas. Existen tantas columnas como medidas se realizan.

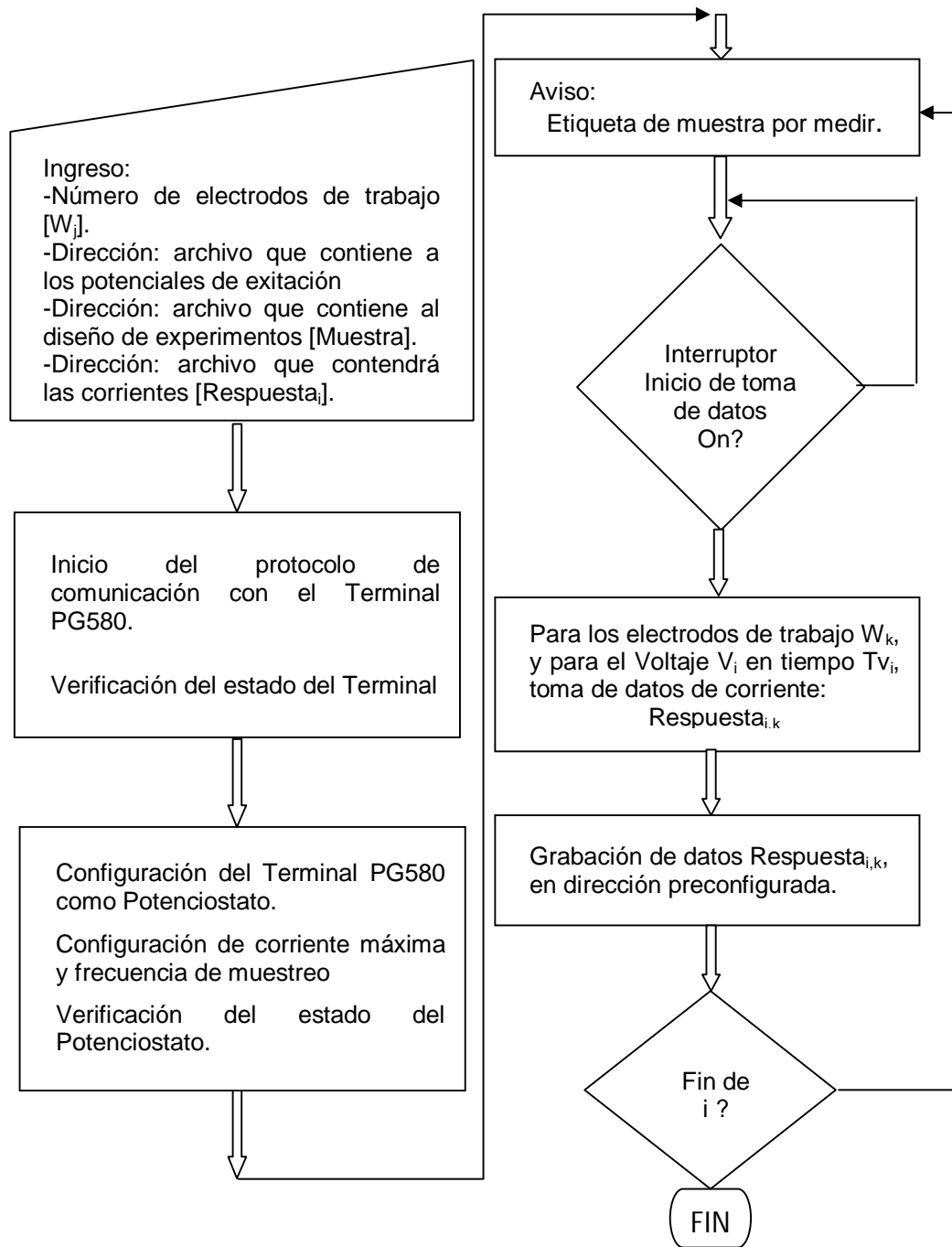
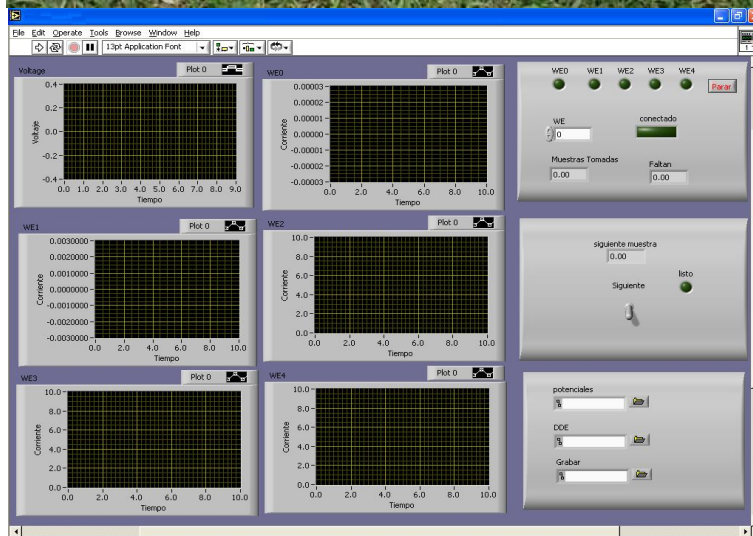


Figura 33. Algoritmo de para el control de potenciostato.

La Figura 34(a), muestra la fotografía del prototipo desarrollado y la Figura 34(b), muestra la pantalla del software de adquisición desarrollado en LabView.



(a)



(b)

Figura 34. (a) Foto del sistema desarrollado, (b) Pantalla principal del software desarrollado en LabView.

3.1.1.3 Software de reconocimiento de patrones

Se desarrolló un software en Matlab® que realiza el análisis PCA de las muestras en base al esquema del algoritmo presentado en la sección 2.4. La matriz conteniendo los datos de corriente es la entrada a éste programa.

Cada patrón característico de corriente, para cada electrodo de trabajo está compuesto por valores discretos de corriente. Cada valor se toma a un tiempo preciso

(0.1 s) y los 60 tiempos de la medición son las "variables" del análisis PCA. Cada medición corresponde a los "objetos" del análisis PCA.

El software da como respuesta la gráfica de anotaciones PCA en 2D, y el valor de la varianza para la componente principal 1 (PC1) y la componente principal 2 (PC2). De tal manera que si en el gráfico de anotaciones, un punto que representa a una medida está en una posición cercana a un cluster formado por medidas de agua con buena calidad, se puede inferir que el agua de ésta medida es de buena calidad.

3.1.2. Determinación de la onda de voltaje para el análisis de agua.

Se usó voltametría cíclica para evaluar el comportamiento electroquímico de agua contaminada con *E.coli*, este procedimiento sirvió para estimar los valores de voltaje en la onda que se usará en el potencióstato configurado en el modo cronoamperometría.

Se cultivaron bacterias *E.coli* (ATCC10536) en una placa Petri y fueron incubadas por 18 horas a 37°C. Luego se añadieron 3mL de agua limpia y se mezcló el conjunto. Posteriormente se tomaron 100 µL de ésta mezcla y se combinaron con 160mL de agua limpia. Finalmente se añadieron éstos 160mL de agua contaminada a 5L de agua limpia. Obteniéndose agua contaminada con *E.coli*. Luego de 2.5 horas de su preparación se tomó una muestra para ser analizada por el método de filtración de membrana (MF), descrita en la sección 1.2, encontrándose una concentración mayor 800CFU/10mL. Éste valor se reporta como incontable x CFU/10mL.

Se analizaron muestras de agua limpia y contaminada usando Voltametría Cíclica para cada electrodo de trabajo.

El voltaje de trabajo se configuró entre -0.8V y 0.8V, con una razón de incremento de 20mV/s.

Se desarrollaron dos mediciones, a 2.5h y 3.5h luego de que se prepararon las muestras de agua contaminada, observándose que hay una reproducibilidad en las curvas corriente-voltaje para ambos electrodos (Figuras 35 y 36).

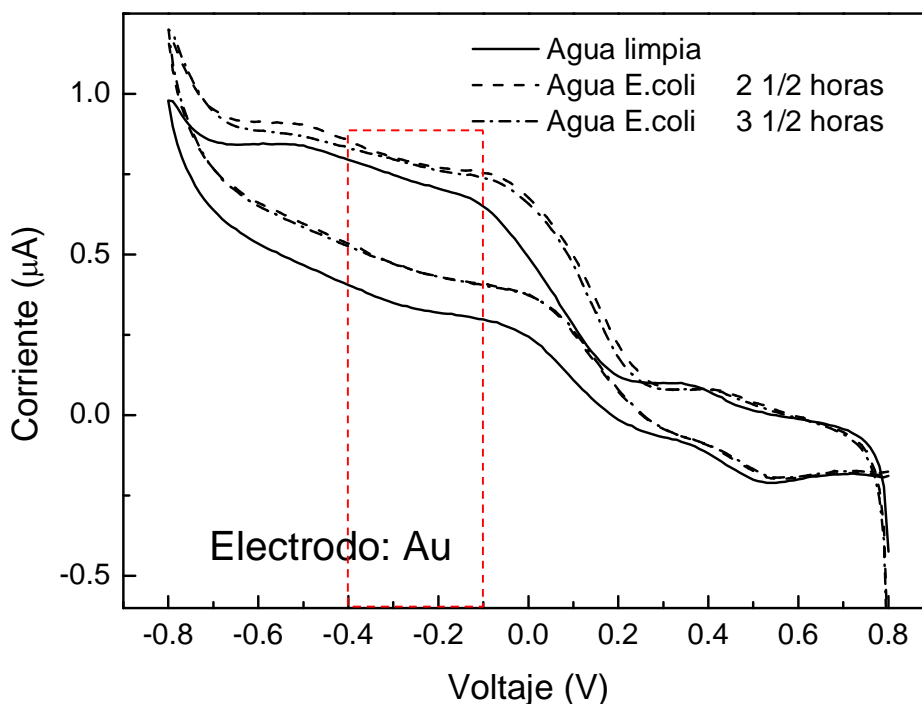


Figura 35. Comportamiento electroquímico de agua contaminada con *E.coli* para el Electrodo de Au.

Se observa en las Figuras 35 y 36, que existe una diferencia notable entre agua contaminada y limpia entre -0.4V y -0.1V. Para el electrodo de oro y para el electrodo de platino, se elige ésta zona (-0.4V y -0.1V) como zona de análisis.

En ésta región se observa que las diferencias entre valores de corriente no dependen del sentido de incremento del voltaje, sin embargo el caso del platino si depende del sentido del incremento del voltaje.

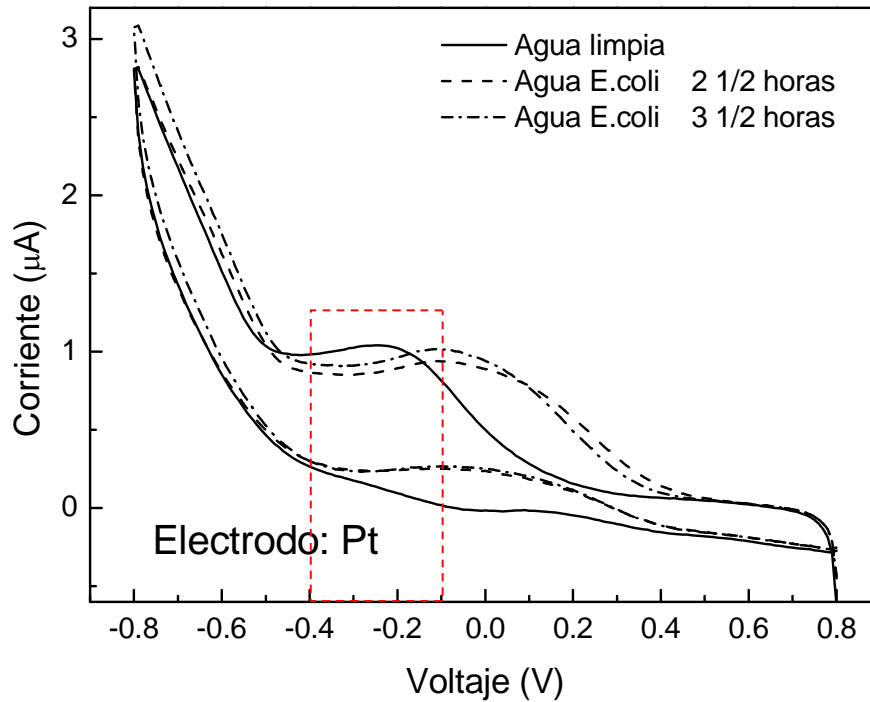


Figura 36. Comportamiento electroquímico de agua contaminada con *E.coli* para el Electrodo de Pt.

Teniendo en consideración la región donde se observan diferencias entre los voltogramas de las Figuras 35 y 36, se definió la onda de excitación para el sistema sensor de la lengua electrónica como se muestra en la Figura 37.

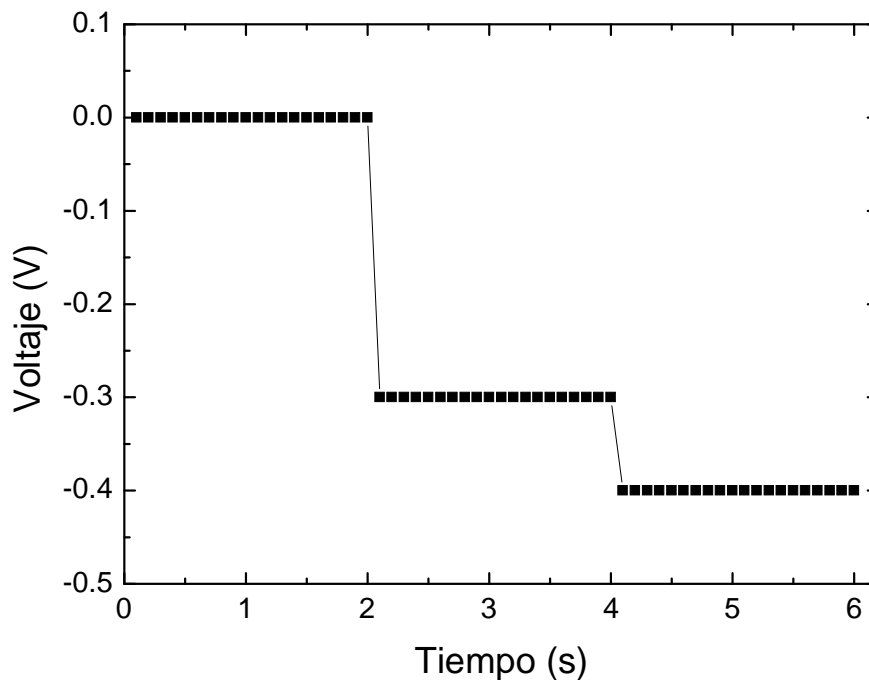


Figura 37. Onda de voltajes usada por la lengua electrónica para analizar agua contaminada con *E.coli*.

3.1.3. Preparación de muestras de laboratorio con concentraciones diluidas de *E.coli* y conteo de colonias por el método de filtración de membrana (MF).

El procedimiento para la preparación de diluciones de agua contaminada es el estándar que se realiza en el Laboratorio de Películas Delgadas FC-UNI y su procedimiento es el siguiente:

Se cultivan bacterias *E.coli* (ATCC10536) como se detalló en 3.1.2. En éste caso 100mL de esa agua contaminada corresponde a la dilución 10^{-1} .

Se rotulan 2 frascos que contienen 9.9 mL de agua destilada estéril para realizar las diluciones. Luego se toman 100 μ L del agua contaminada con la ayuda de una micropipeta y se añade su contenido al primer frasco mezclándose suavemente, esto corresponde a una dilución 10^{-2} .

Posteriormente se vuelve a tomar 100 μ L de esta dilución 10^{-2} y se agrega al segundo frasco de agua destilada estéril mezclándose suavemente, esto corresponde a una dilución 10^{-4} .

Éstas tres diluciones se agregaron a 5L de agua obteniéndose las muestras de laboratorio para ser analizadas.

En el presente trabajo se usó el método de filtración de membrana (MF) mencionado en la sección 1.2. Para caracterizar microbiológicamente las muestras de agua.

En éste método se toma una muestra de agua contaminada y se filtra con una membrana, luego esta membrana se coloca sobre placas a la cual se le ha añadido 1.75 mL de Lauril sulfato.

Después de colocar la membrana con la muestra en la placa, se deja unos minutos al ambiente y luego se lleva a la incubadora a 37°C por un espacio de entre 19 - 20 h. Al cabo de ese tiempo se realiza el conteo o lectura de las unidades formadoras de colonia por 10 mL (UFC/10mL). Si el número de UFC/10 mL exceden a 800 se considera incontable como lo indica el método.

Se reporta el valor de UFC/10 mL expresando el número de colonias por la dilución a la que se ha trabajado (x dilución 10^{-d}). La esterilización del equipo de filtración se realiza por la incineración con alcohol metílico. Para desinfectar superficies y otros se usa alcohol etílico.

En el caso de la medidas en campo de la concentración de *E.coli*, se usó el sistema comercial portátil Oxfam -Delagua®.

3.1.4. Clasificación de agua contaminada preparada en el laboratorio usando la Lengua Electrónica Voltamperométrica.

Se analizó agua contaminada con diferentes concentraciones de *E.coli* usando la lengua electrónica desarrollada y con el método MF como método estándar.

Se prepararon tres muestras de agua contaminada con *E.coli*. La concentración de *E.coli* para cada muestra se observa en la tabla 1.

Tabla1. Agua contaminada con *E.coli* preparada en el Laboratorio.

Muestra	M3	M2	M1
Nivel de contaminación	Alto	Medio	Bajo
(CFU / 10ml. <i>E.coli</i>) x (dilución 10 ^{-d})	Incontable x 10 ⁻¹	Incontable x 10 ⁻²	554 x 10 ⁻⁴

Se midieron tres muestras de agua (M1,M2,M3) con la lengua electrónica tres veces en forma aleatoria. Las condiciones de laboratorio fueron: $T = 25^{\circ}\text{C}$, Humedad=67% RH. La Figura 38 (a) y (b) muestra la corriente para las tres muestras de agua.

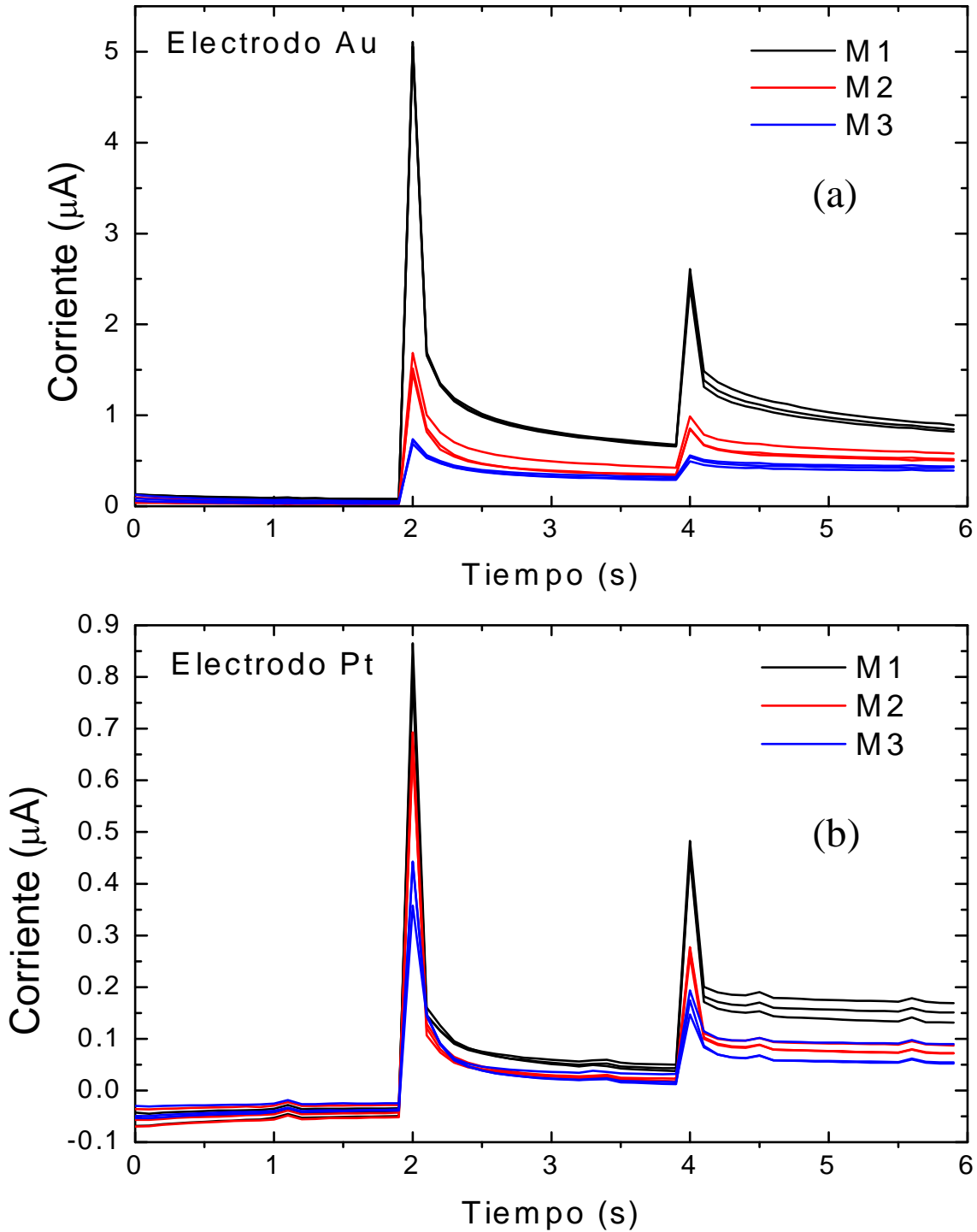


Figura 38. Señal de corriente en el (a) electrodo de oro, (b) electrodo de platino, para las tres muestras de agua, medidas tres veces cada una.

Los datos fueron analizados usando el software de análisis desarrollado. Cada medición de corriente define 60 variables y cada una de las nueve mediciones es un objeto en el análisis PCA.

En la Figuras 39 y 40 se muestran los gráficos PCA de anotaciones para cada electrodo.

En la notación M_{ij} , "i" representa el número de la muestra y "j" el número de veces que fue medida la muestra M_i .

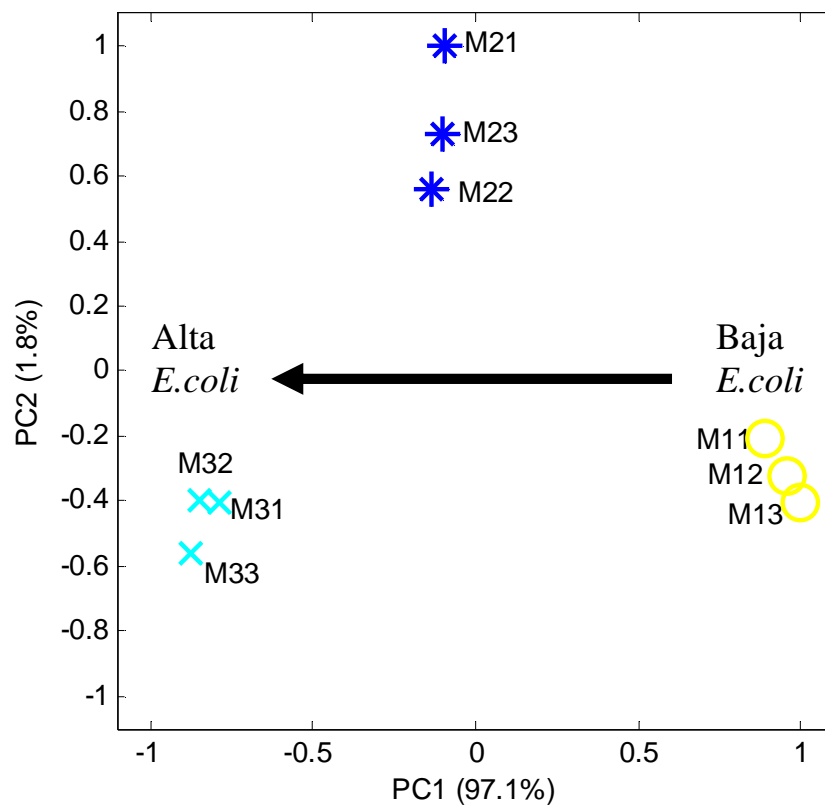


Figura 39. Gráfico de anotaciones PCA para las muestras M1, M2 y M3 medidas tres veces cada una en forma aleatoria usando el electrodo de oro.

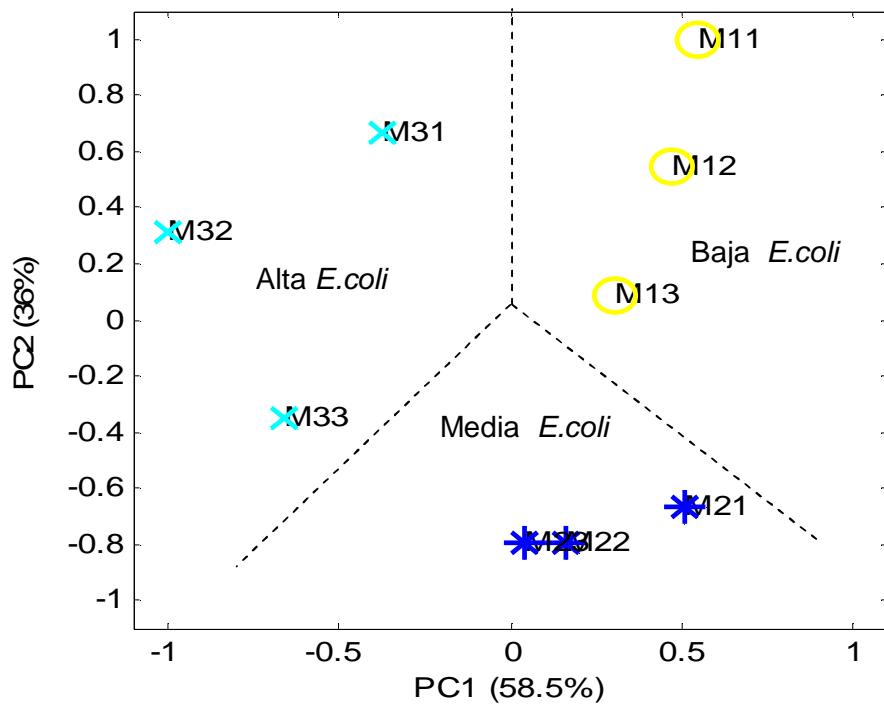


Figura 40. Gráfico de anotaciones PCA para las muestras M1, M2 y M3 medidas tres veces cada una en forma aleatoria usando el electrodo de platino

3.1.5 Clasificación de muestras de agua contaminada del río Yaurisque – Cuzco.

Luego que se optimizó la lengua electrónica para clasificar muestras de agua contaminada fabricadas en el laboratorio (Figuras 39 y 40), se decidió realizar medidas en una localidad rural en el Perú.

Las mediciones de campo se realizaron en el distrito de Yaurisque, ubicado a unos 48 km de la ciudad de Cusco (Latitud de 13° 39' 37.24"S, Longitud 71° 55' 6.59" O, Altitud de 3330 msnm). A la altura que se ubica Yaurisque, el agua de consumo humano no tiene ningún tipo de tratamiento.

Sobre el río Yaurisque desembocan los desagües de la posta médica y del colegio del lugar. El trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Centro de Capacitación de Desarrollo, CECADE, de Cusco (ver Figura 41).



Figura 41. Fotografía de Yaurisque indicando el lugar de medición.

Se usaron las baterías del potenciómetro y de la laptop para que el sistema funcione sin necesidad de conectarlo a la red eléctrica (ver Figura 42).



Figura 42. Fotografía del sistema en Yaurisque. Se observan a la lengua electrónica y las botellas conteniendo agua del río Yaurisque y expuestas a la radiación solar usadas para descontaminación usando el método DSAUI.

Se usó el método de desinfección solar en unidades independientes (DSAUI) [42] para descontaminar agua del río Yaurisque. En éste método se llenan con agua contaminada botellas de plástico (recipientes de bebidas comerciales), y luego se las expone a la radiación solar por un tiempo determinado. Debido a las radiaciones UV-A y térmica la cantidad de unidades formadoras de colonia se reduce dramáticamente. Ésta tecnología se usa en muchos países de América latina [43]

Se usó el kit comercial para pruebas microbiológicas Oxfam-Delagua®, para realizar el conteo de UFC por el método de método de filtración de membrana (MF) del agua del río Yaurisque durante su desinfección por el método DSAUI. La prueba mostró la presencia de *E.coli* y pseudomonas.

Se llenaron seis botellas con agua del río. El proceso de descontaminación duró 4 horas y comenzó a las 10 AM. Cada hora se abrió una botella y el agua se dividió en dos partes. Una parte para ser analizada por el kit Delagua®, y la otra para ser analizada por la lengua electrónica.

Los resultados del análisis microbiológico obtenido con el kit Delagua® indican que la concentración de *E.coli* baja notablemente en esas cuatro horas de descontaminación (ver tabla 2).

Tabla2. Concentración de *E.coli* medida con MF durante la descontaminación DSAUI.

Tiempo	CFU/10 ml
Inicio	117 x 10 <i>E.coli</i> ; 190 x 10 Pseudomonas sp.
T1 1 hora	60 x10 <i>E. coli</i> ; 71 x 10 Pseudomonas sp.
T2 2 horas	19 x 10 <i>E.coli</i>
T3 3 horas	4 x 10 <i>E.coli</i> ; 4x 10 Pseudomonas
T4 4 horas	2 x10 <i>E.coli</i>

Debido a que el kit Oxfam-Delagua® usa MF, toma por lo menos 18 horas en tener el valor de la concentración de *E.coli*.

En forma paralela se midieron las muestras de agua utilizando la lengua electrónica. La lengua necesita 15 S para obtener la señal de corriente para cada muestra.

Las señales de corriente obtenidas para cada hora y para cada electrodo durante el proceso de descontaminación se muestran en las Figuras 43 y 44.

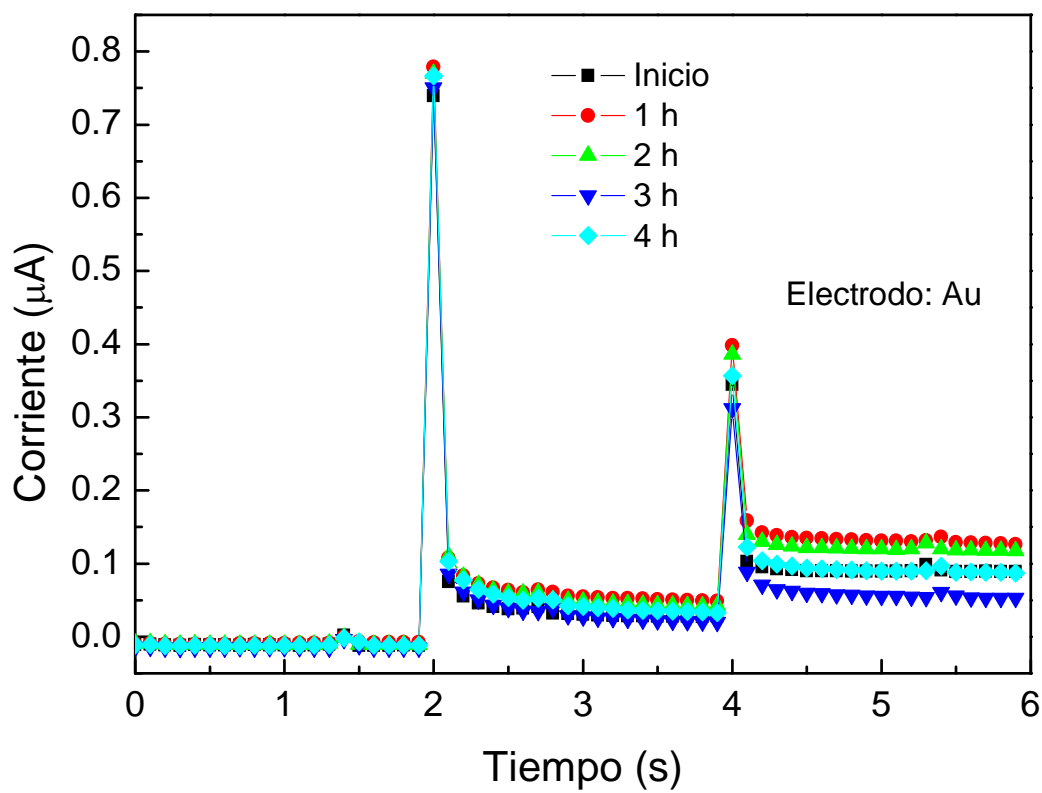


Figura 43. Señales de corriente usando el electrodo de oro, mientras se descontaminaba el agua del río Yaurisque.

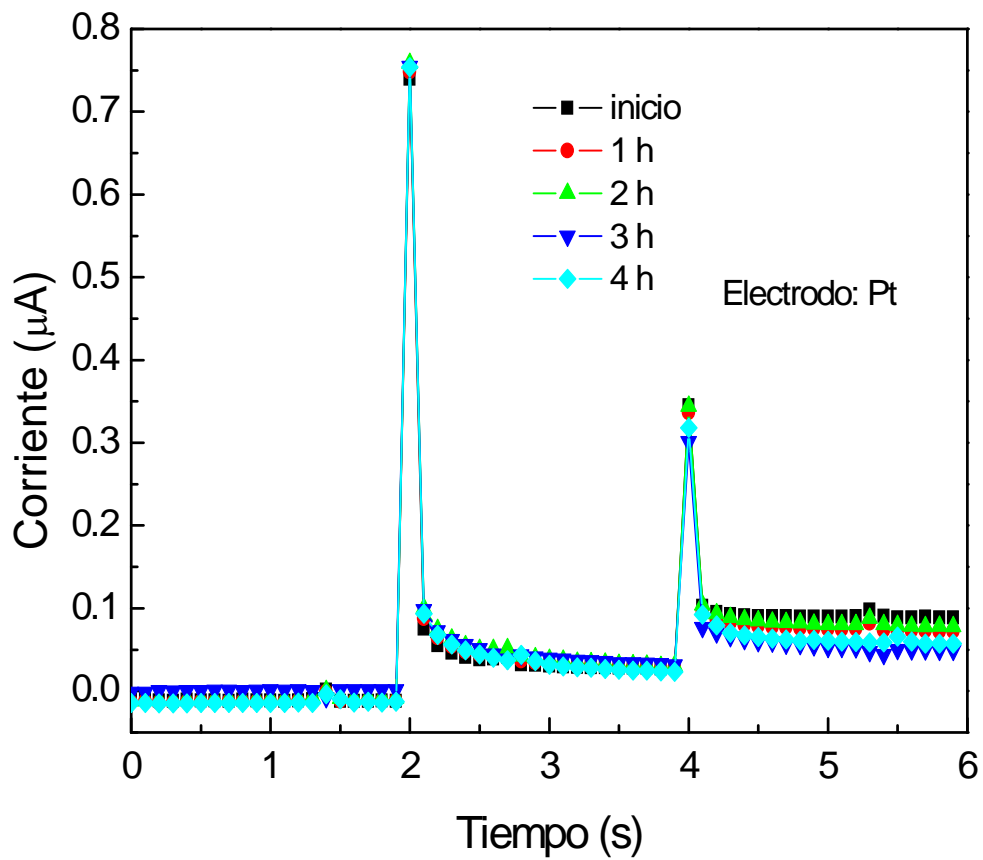


Figura 44. Señales de corriente usando el electrodo de platino, mientras se descontaminaba el agua del río Yaurisque.

Se analizaron los datos usando el software desarrollado de PCA. En la matriz de datos para PCA se tienen cinco objetos que representan a las cinco mediciones hechas cada hora, y se tienen 60 variables obtenidas por discretización de la señal de corriente como se describió en el capítulo anterior. En las Figuras 45 y 46 se tienen los gráficos de anotaciones PCA para los electrodos de oro y de platino.

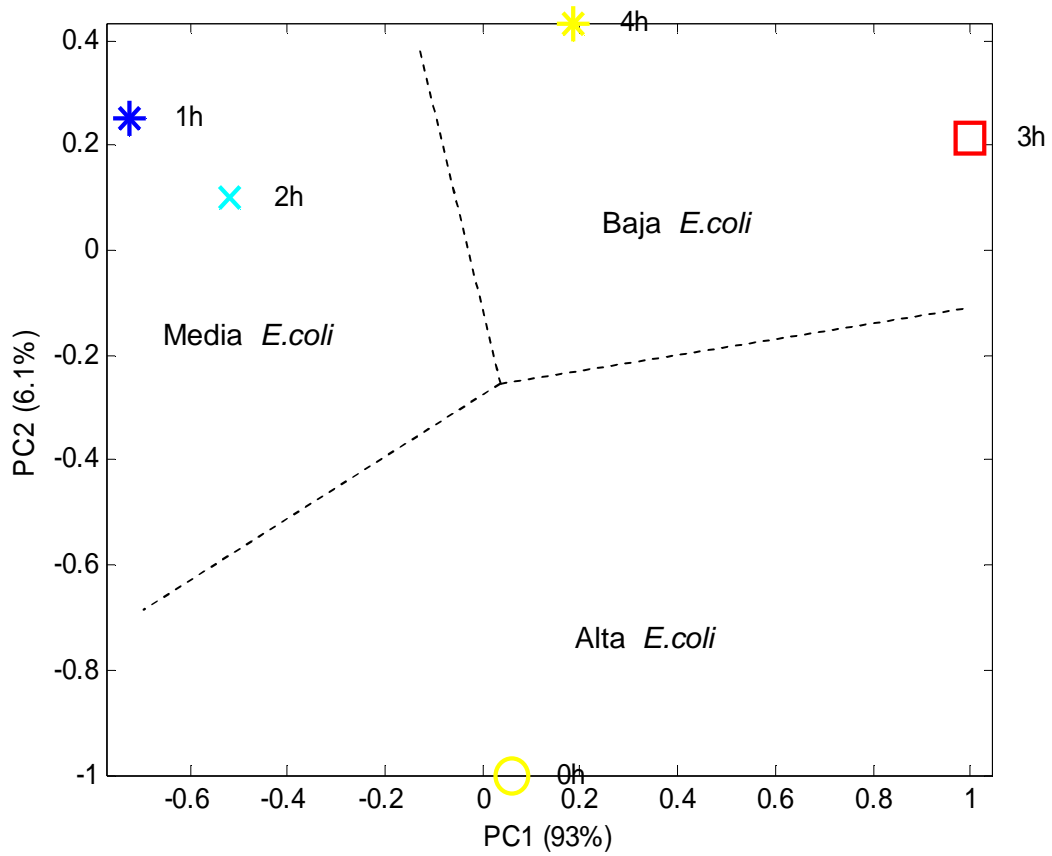


Figura 45. Gráfico PCA de anotaciones durante el proceso de descontaminación DSAUI, midiendo el electrodo de oro.

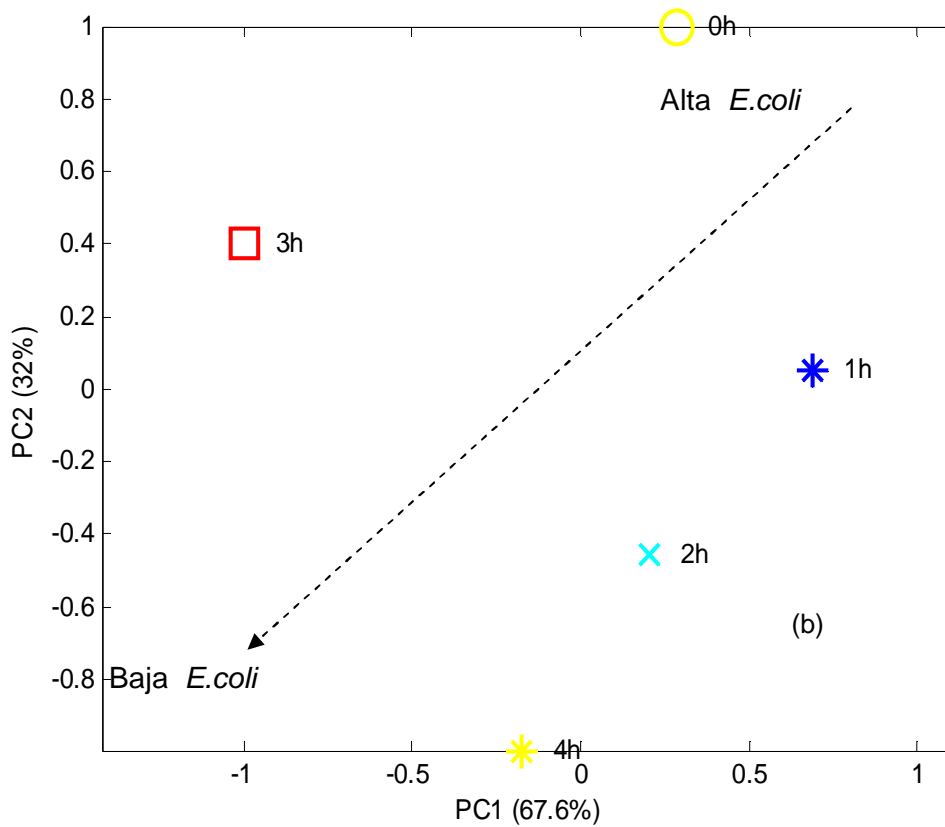


Figura 46. Gráfico PCA de anotaciones durante el proceso de descontaminación DSAUI, midiendo el electrodo de platino.

3.2. Clasificación de muestras opacas usando el sistema CSPT basado en reflectancia.

3.2.1 Muestras opacas.

Como se comentó en la sección 1.3, actualmente existe la tendencia de desarrollar exámenes médicos no invasivos y económicos que se basen en pruebas colorimétricas.

En éste tipo de pruebas existe una estructura opaca que sirve de soporte (muchas veces una tira de papel), donde hay zonas de pintadas con reactivos bioquímicos, los cuales cambian de color en función a lo que se quiere analizar.

Se fabricaron un grupo de muestras opacas de diferentes colores. Se usó una impresora láser para imprimir sobre papel blanco cinco muestras de colores: amarillo (Y), azul (B), verde (G), cian (C) y rojo (R). El tono en cada una varía desde un máximo del tono de color hasta que no exista color y quede solo el papel blanco como se muestra en la Figura 47. El color de las muestras depende de la naturaleza de las mismas para absorber o reflejar luz con ciertas longitudes de onda. El color es un atributo que en éste caso es apreciable a simple vista. Un observador puede determinar cuál es amarilla, azul, verde, cian o roja y que partes tienen mayor o menor tonalidad. En la parte superior se tiene la mayor tonalidad y en la inferior se tiene la menor tonalidad en esa zona los colores de las muestras se acercan al color blanco.

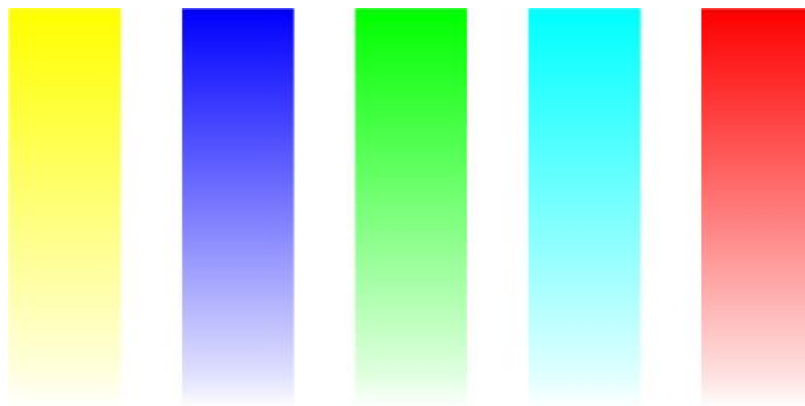


Figura 47. Muestras opacas medidas con CSPT en base a reflectancia.

3.2.2 Configuración del hardware.

Como fuente de iluminación se utilizó un área igual a 130mmx80mm de la pantalla LCD de una computadora portátil (SonyVaio PCG-FX505) con una resolución de 1024x768 y una frecuencia de refresco de 60Hz.

La pantalla iluminó a las muestras que se encuentran en un soporte de muestras adherido a ésta (ver figura 48).

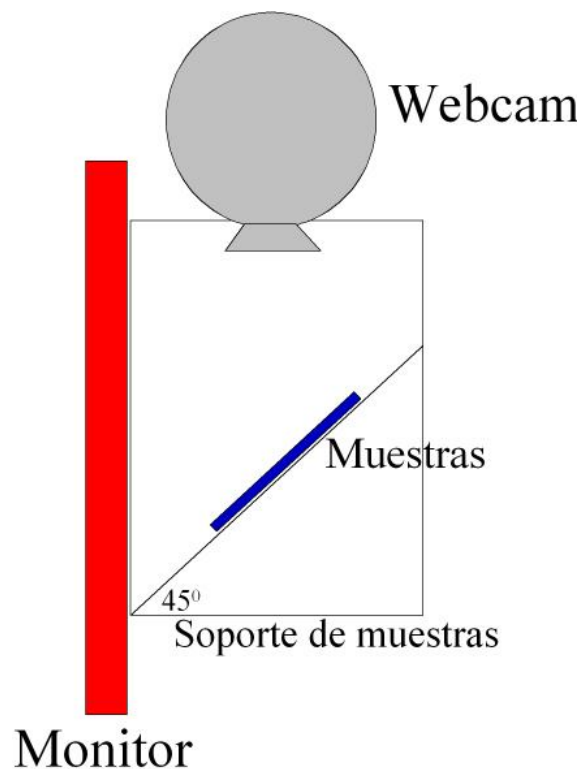


Figura 48. Esquema de la configuración del hardware del CSPT para realizar mediciones de reflectancia.

El soporte de muestras provee de una protección contra la luz exterior y además sirve de soporte para la cámara web, la cual apunta hacia abajo, enfocando a las muestras. En éste arreglo las muestras están colocadas a 45° respecto a la pantalla y al plano de la cámara.

Para la evaluación de las muestras con CSPT, se generó en la pantalla una secuencia de 256 colores para iluminar a las muestras. Éstos colores (1 color/s)

variaron desde el rojo oscuro hasta el violeta, tratando de reproducir el espectro de luz visible percibido por el ojo humano.

Se utilizó una cámara web (Philips PCVC740K ToU Cam Pro) con una resolución de 320x240 píxeles, 20% de brillo, con ganancia mínima y una velocidad de toma de imágenes de 1/33s, para capturar a las muestras iluminadas. La captura de cada imagen se realizó en sincronía con el color de iluminación.

Se utilizó un programa escrito en Matlab® especialmente para CSPT y desarrollado previamente por D.Filippini, el cual controla la iluminación de la pantalla y la adquisición de imágenes de la cámara.

3.2.3. Modulación de la luz incidente y medición de la señal reflejada.

La modulación de la luz crea una trayectoria en el espacio RGB como se muestra en la Figura 49.

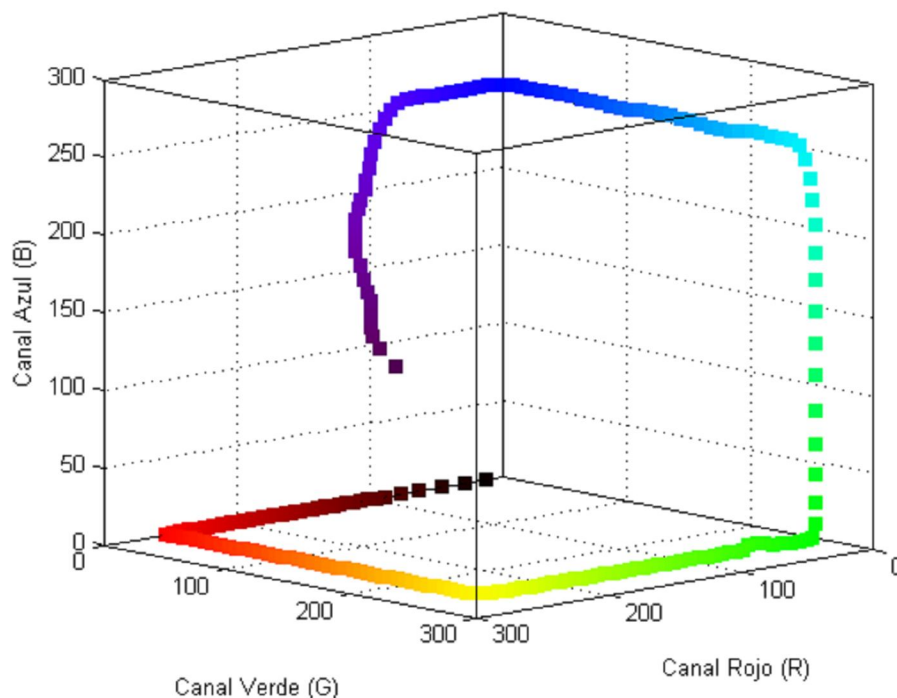


Figura 49. Trayectoria de la modulación de luz usada en CSPT para reflectancia. El color de los marcadores corresponde al color de la iluminación.

Se combinó cada frame capturado con una imagen máscara formada por las circunferencias mostradas en las Figura 50. Estas circunferencias definen las regiones de análisis.

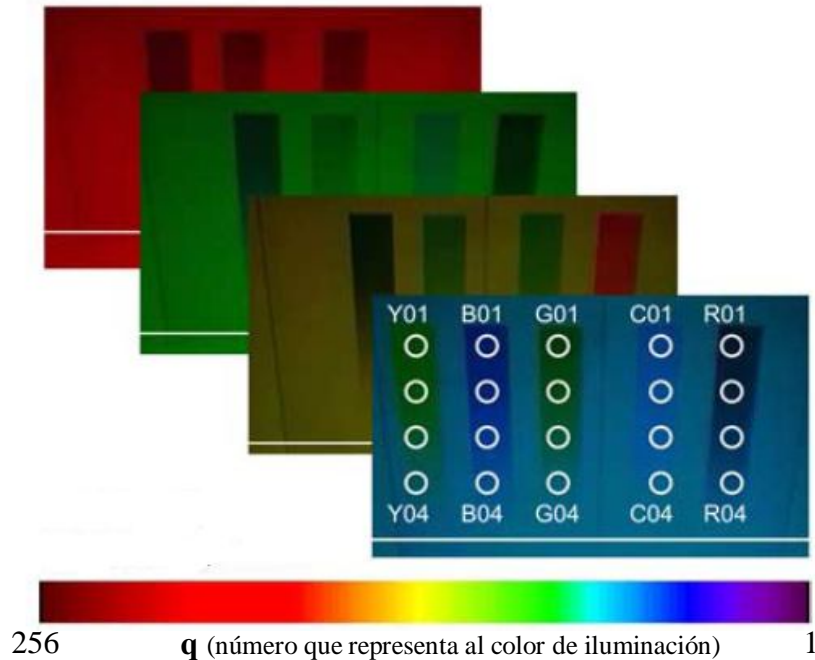


Figura 50. Muestras iluminadas con diferentes colores de modulación donde se muestran las circunferencias que definen las regiones de análisis.

Para el análisis se usaron solamente los píxeles del frame cuyas posiciones se encontraban dentro de la circunferencia (80 píxeles en éste trabajo) y se halló el promedio de las intensidades para cada uno de los tres canales de la cámara web.

De tal manera que toda la información recolectada para "N" muestras (20 en éste caso) iluminadas con "S" colores diferentes (256 en éste caso) y observadas a través de los tres canales de la cámara, se puede representar por la hipermatriz de intensidades reflejadas $I_{i,q,k}$ donde $i \in [1..N]$, $q \in [1..S]$, $k \in [1,2,3]$.

Para asegurar la universalidad del procedimiento, y hacerlo independientemente de la marca o modelo del monitor y cámara usados, se tomó como referencia la superficie blanca del papel, y usando el mismo procedimiento anterior se midió la intensidad de reflexión dando como resultado la hipermatriz de referencia $I_{0,i,q,k}$.

Las medidas, en el espacio de color 3D, pueden representarse como perturbaciones que sufre la trayectoria de iluminación (Figura 50) y estas perturbaciones son una función de la reflectancia espectral de las muestras. En la Figura 51 se muestran las trayectorias 3D de las señales medidas, el color de los marcadores corresponde al color de iluminación.

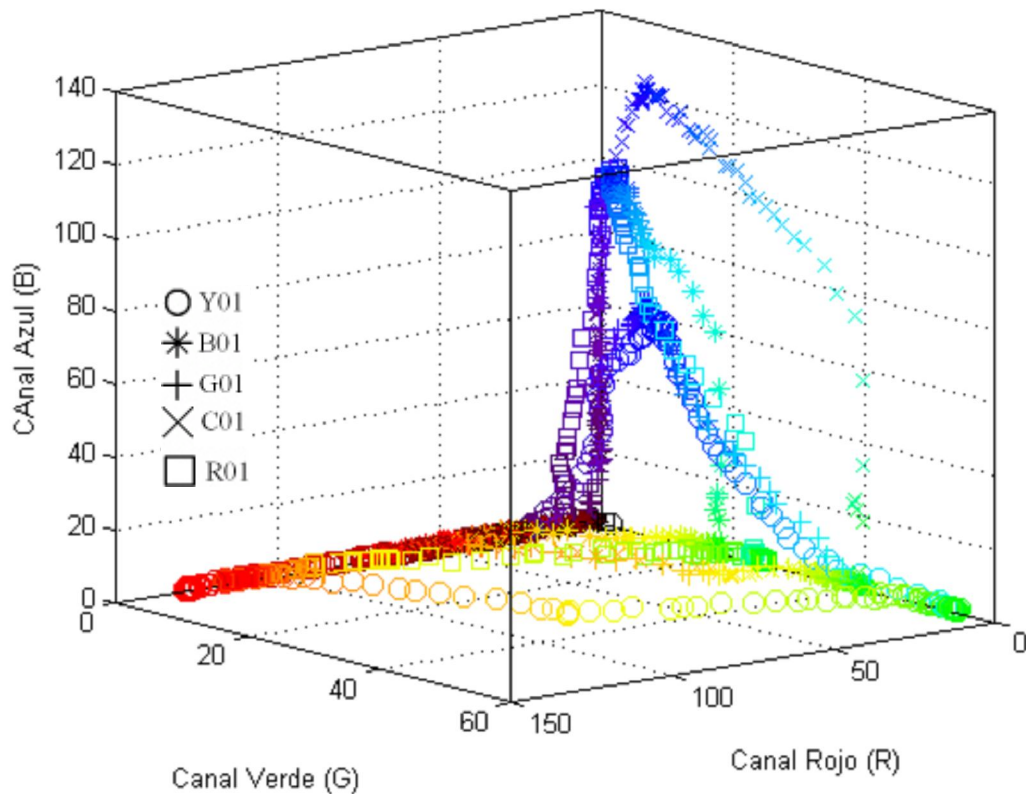


Figura 51. Señales medidas con el CSPT para las posiciones Y01, B01, G01, C01, R01, en el espacio RGB.

En las Figuras 52, 53 y 54 se muestran las proyecciones 2D de las señales medidas. En la Figura 52, se muestran las señales medidas solo para los canales verde y azul de la webcam.

Un material opaco no transmite luz, solamente la refleja o la absorbe y para una longitud de onda, se cumple la siguiente igualdad:

$$I(\lambda) = R(\lambda) + A(\lambda) \quad (22)$$

Donde:

I : Intensidad luz incidente.

R : Intensidad luz reflejada.

A : Intensidad luz absorbida.

Por tanto de la ecuación (22) se infiere que, cuando se ilumina una muestra opaca con luz de intensidad constante, éste material absorbe luz de manera eficiente, si la luz que refleja tiene una intensidad pequeña.

Como se observa en la Figura 52, cuando las muestras se iluminan con luz azul, la muestra amarilla Y01 (círculos abiertos) absorbe luz de color azul con mayor eficiencia que las muestras de color azul B01 (*) o cian C01 (X), es por ello que la muestra amarilla posee menor amplitud en el plano azul-verde.

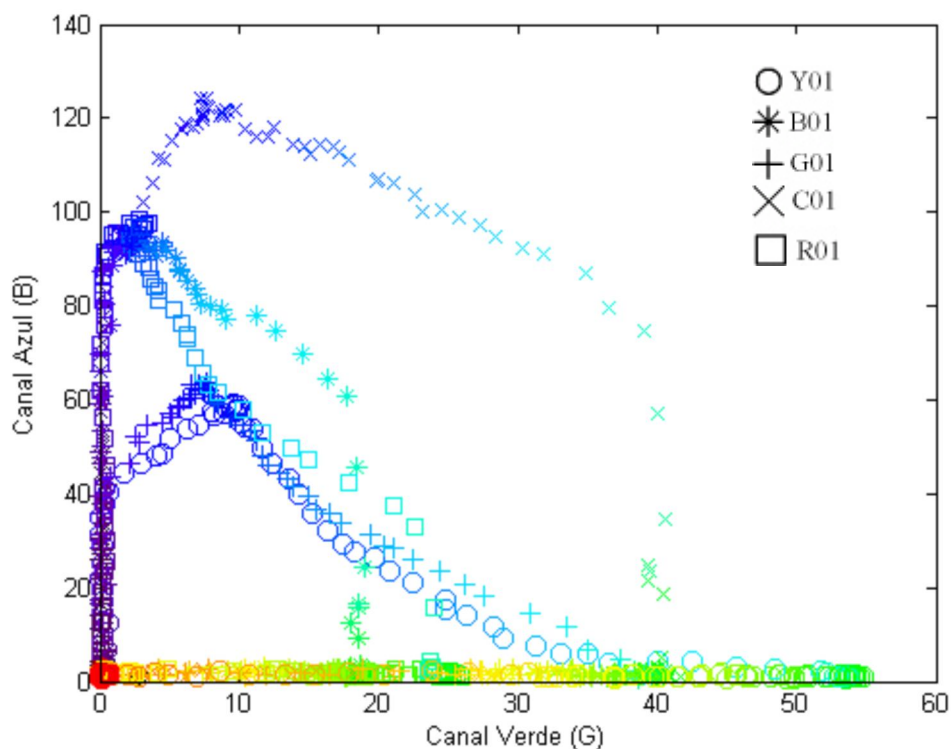


Figura 52. Proyección de la trayectoria de respuesta, presentada en la Figura 51, en el plano azul-verde. El color del marcador indica el color de la iluminación.

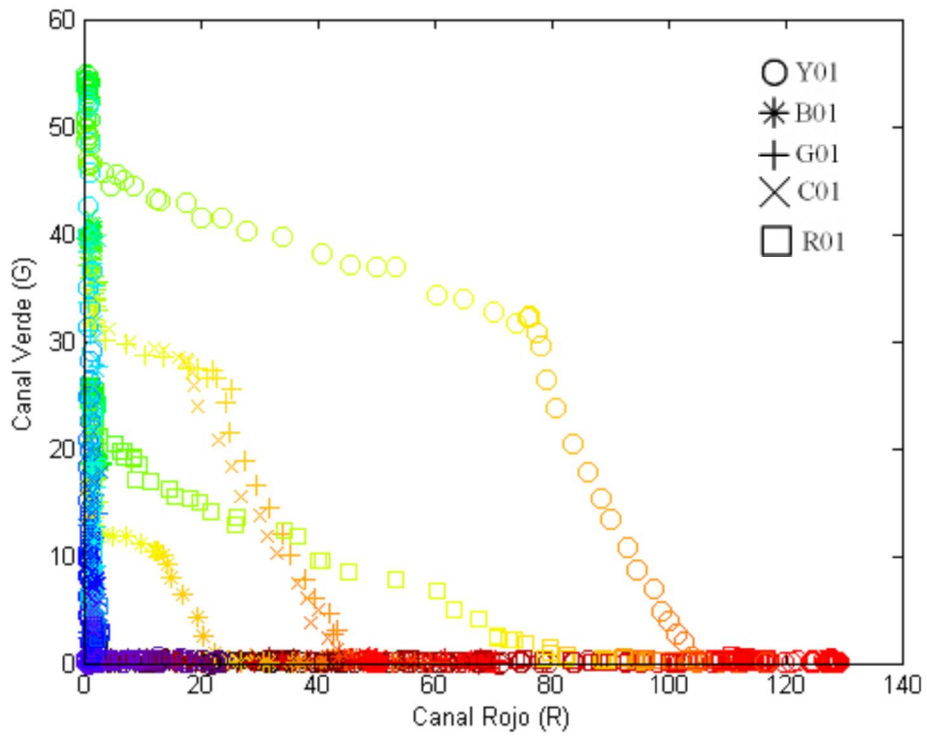


Figura 53. Proyección de la trayectoria de respuesta, presentada en la Figura 51, en el plano verde-rojo. El color del marcador indica el color de la iluminación.

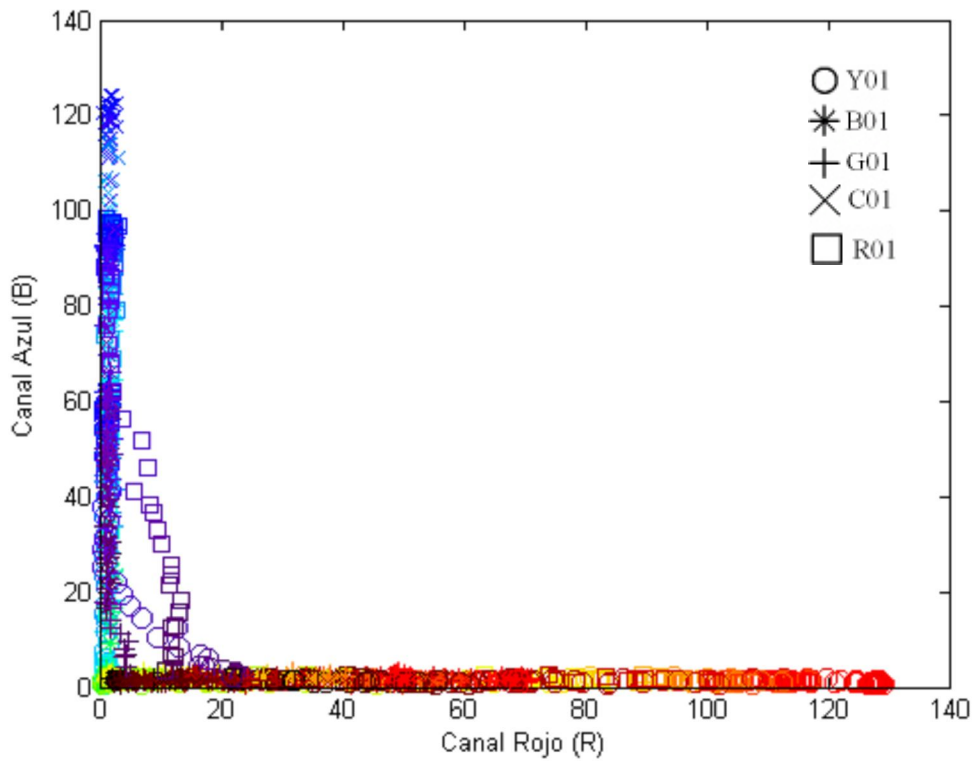


Figura 54. Proyección de la trayectoria de respuesta, presentada en la Figura 51, en el plano verde-rojo. El color del marcador indica el color de la iluminación.

Utilizando el mismo análisis, en el plano verde-rojo (ver Figura 53), una muestra amarilla (Y01) presenta menor absorción de luz cuando es iluminada con luz amarilla, teniendo mayor amplitud en éste plano. Algo similar sucede para una muestra azul (B01) iluminada con luz azul, ésta muestra presentará menor absorción teniendo mayor amplitud en el plano azul-rojo (ver Figura 54).

También la extensión de esas proyecciones indica el color de la muestra. Por ejemplo, en la Figura 52 la muestra cian (X), la cual también refleja luz verde, tiene mayor amplitud en el canal verde que la muestra azul (*).

3.2.4. Modelos para CSPT basados en reflectancia.

Existen dos posibles procedimientos por los cuales se pueden obtener señales características que sirvan para diferenciar éstas muestras opacas. El primero implica separar las señales características de las muestras coloreadas de las perturbaciones generadas por la plataforma de medición, de ésta manera se tendrían que evaluar solo las señales que caracterizan exclusiva y absolutamente a las muestras. Sin embargo una forma más robusta y al mismo tiempo práctica consiste en medir las muestras y usar patrones para calibrar el sistema por comparación.

La técnica CSPT permite configurar fácilmente la plataforma para incrementar su poder de clasificación, por ejemplo adaptando la secuencia de iluminación a un arreglo colorimétrico, configurar adecuadamente los parámetros de la webcam, o como en el presente trabajo, explorar diferentes estrategias de procesamiento de señal adecuadas para cada arreglo.

En el primer caso, o método A, las trayectorias de iluminación como las que se muestran en la Figura 49 se usaron para la clasificación. En la Figura 50 se observa que la parte inferior del conjunto de las muestras luce más clara que la parte superior. Estas variaciones son debidas a la posición de las muestras y el ángulo de

visión de la cámara. Estas variaciones producen un fondo de imagen no uniforme el cual debe ser corregido.

Una posible solución a éste problema consiste en restar las intensidades de referencia ($I_{oi,q,k}$) colectadas en puntos próximos a los puntos de la muestra, como se hizo para el caso de fluorescencia con CSPT [44]. Sin embargo éste método produce mayor error cuanto más claras sean las muestras (más cercanos sean los colores entre la muestra y la referencia).

Para mejorar ello se usaron los valores de referencia para compensar el cambio de intensidades en cada posición para cada canal de la cámara y para cada color de iluminación. De tal manera para cada canal "k" y para cada color de iluminación "q", se calculo la intensidad mínima y se sustrajo de la intensidad de referencia $I_{oi,q,k}$:

$$I'_{oi,q,1} = I_{oi,q,1} - \min(I_{oi,\forall q,1}) \quad (23)$$

$$I'_{oi,q,2} = I_{oi,q,2} - \min(I_{oi,\forall q,2}) \quad (24)$$

$$I'_{oi,q,3} = I_{oi,q,3} - \min(I_{oi,\forall q,3}) \quad (25)$$

Por tanto la hipermatriz de correlación se construye como:

$$\Delta_{i,q,1} = \frac{I'_{oi,q,1}}{\max(I_{oi,\forall q,1})} \quad (26)$$

$$\Delta_{i,q,2} = \frac{I'_{oi,q,2}}{\max(I_{oi,\forall q,3})} \quad (27)$$

$$\Delta_{i,q,3} = \frac{I'_{oi,q,3}}{\min(I_{oi,\forall q,3})} \quad (28)$$

Las intensidades corregidas se calcularon como:

$$r_{i,q,k} = \frac{I_{i,q,k}}{1+\Delta_{i,q,k}}, \quad k \in [1,2,3] \quad (29)$$

Para mayor facilidad en el procesamiento se construyó un vector conformado por las intensidades reflejadas en los tres canales de la webcam, de tal manera que:

$$\vec{R}_{i,q,k} = \{r_{i,q,1}, r_{i,q,2}, r_{i,q,3}\} \quad (30)$$

En las figuras 55, 56, 57, 58, 59 se muestran las señales $R_{i,q,k}$ para cinco muestras de colores las cuales corresponden a las señales características CSPT obtenidas con el método A.

Como se observa en las gráficas, $R_{i,q,k}$ se representa respecto a cada uno de los colores de iluminación (q) y además a los tres canales de la webcam (k). Es por ello que los colores de iluminación se repiten tres veces en el eje x

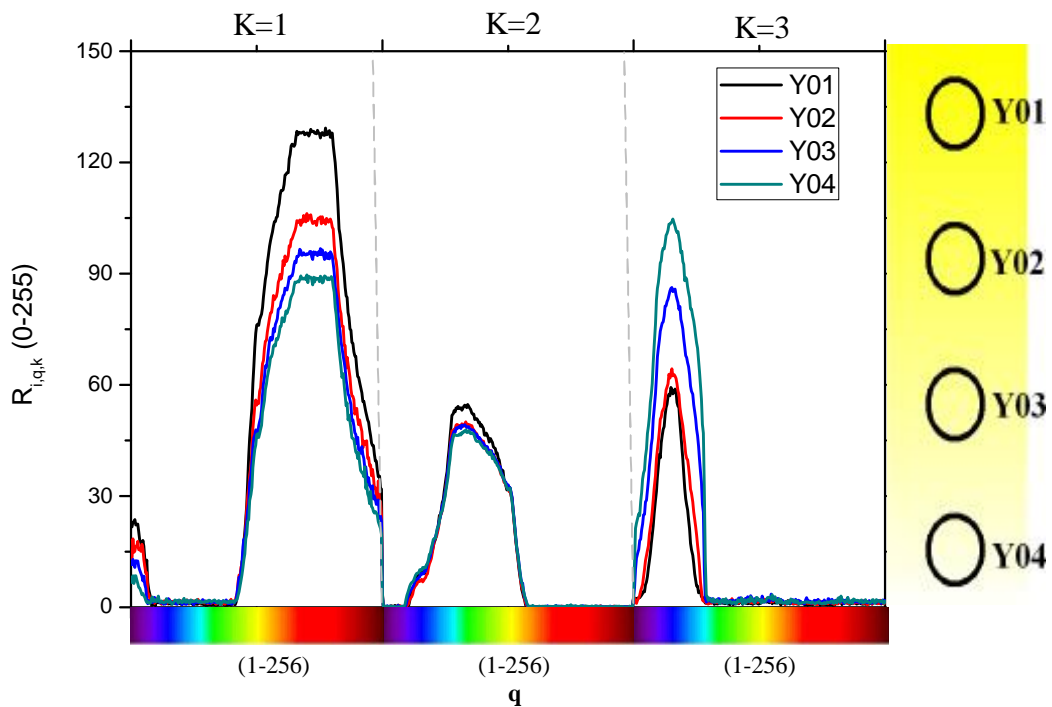


Figura 55. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método A.

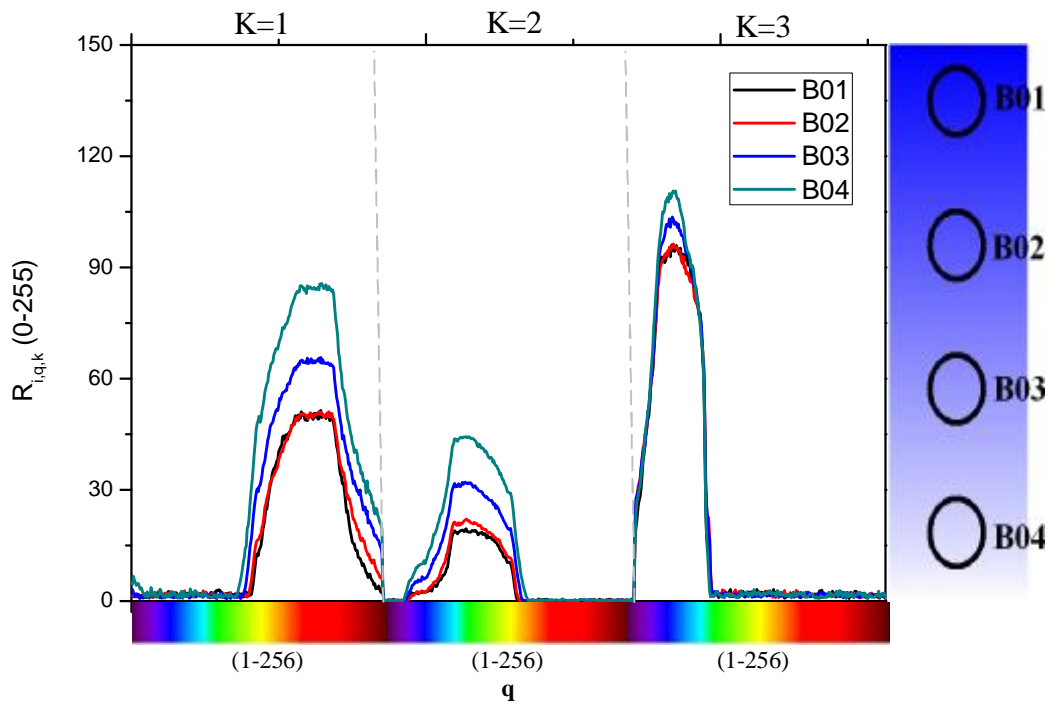


Figura 56. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método A.

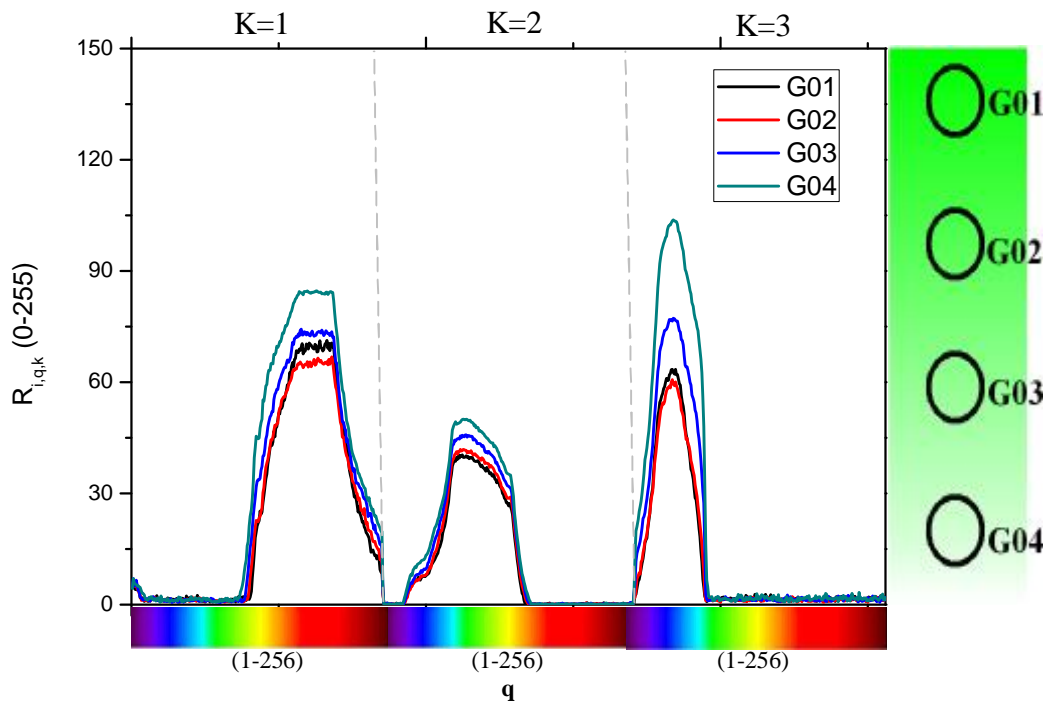


Figura 57. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método A.

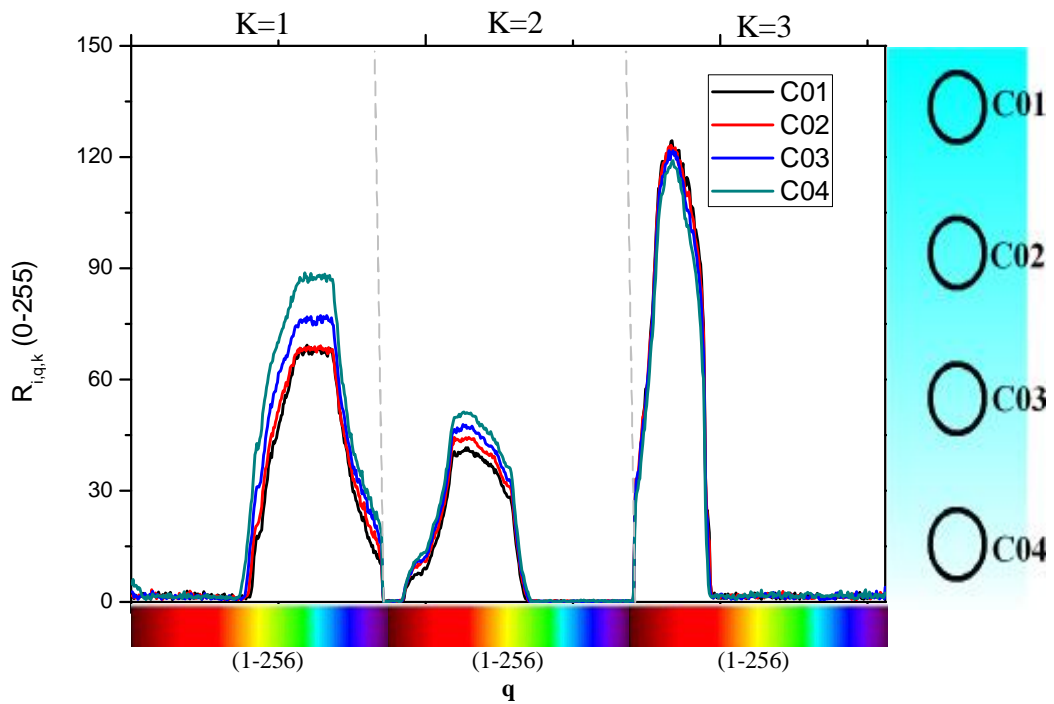


Figura 58. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método A.

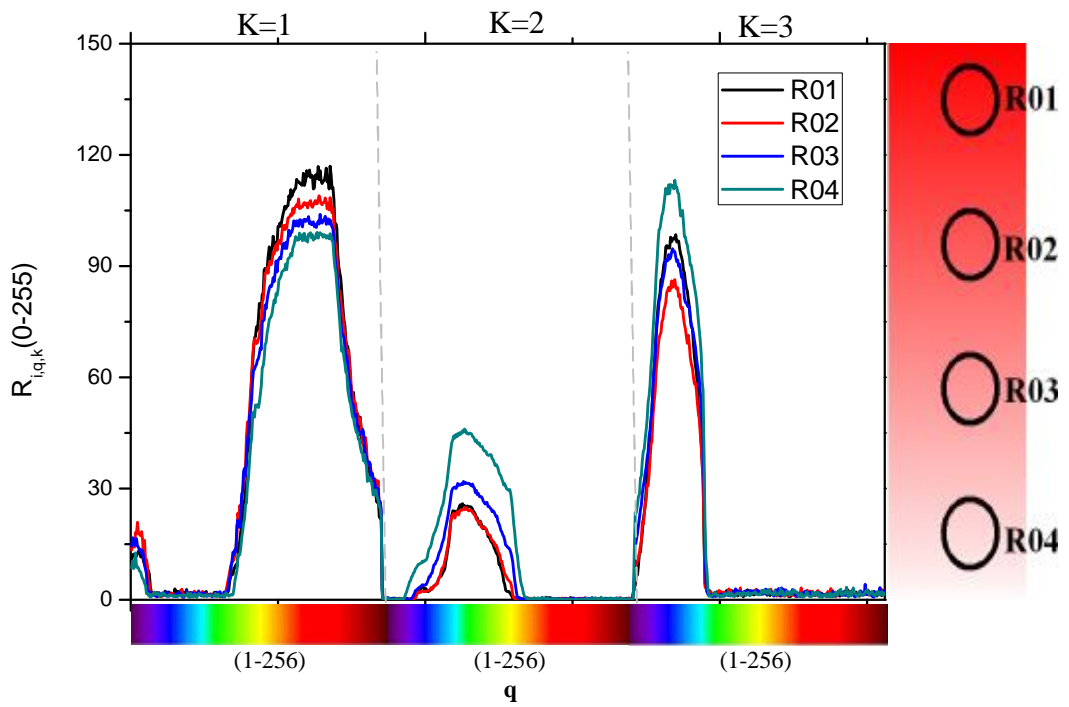


Figura 59. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método A.

El segundo método o método B, calcula la contribución de los tres canales de la cámara con un modelo parecido al de una absorbancia.

$$\rho_{i,q} = -\log \left(\frac{\sum_{k=1}^3 I_{i,q,k}}{\sum_{k=1}^3 I_{oi,q,k}} \right) \quad (34)$$

Este método permite calcular parámetros característicos y además compensar las variaciones del fondo, teniendo la ventaja de también poder interpretar directamente los resultados. En la Figuras 60, 61, 62, 63, 64, se muestran las gráficas correspondientes a las señales características calculadas con el método B para todas las muestras.

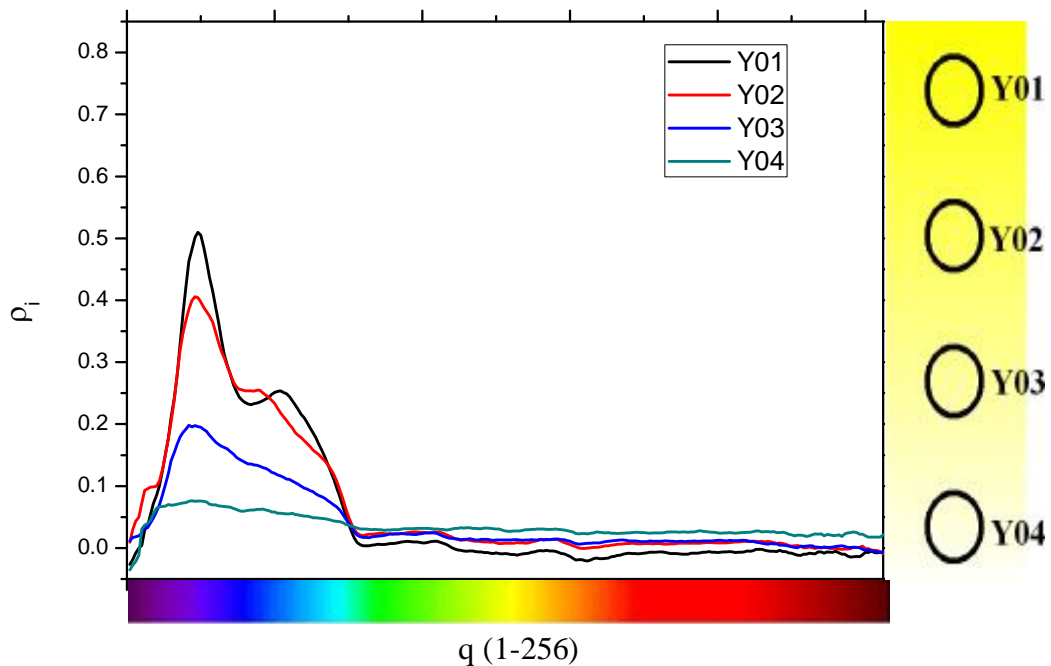


Figura 60. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método B.

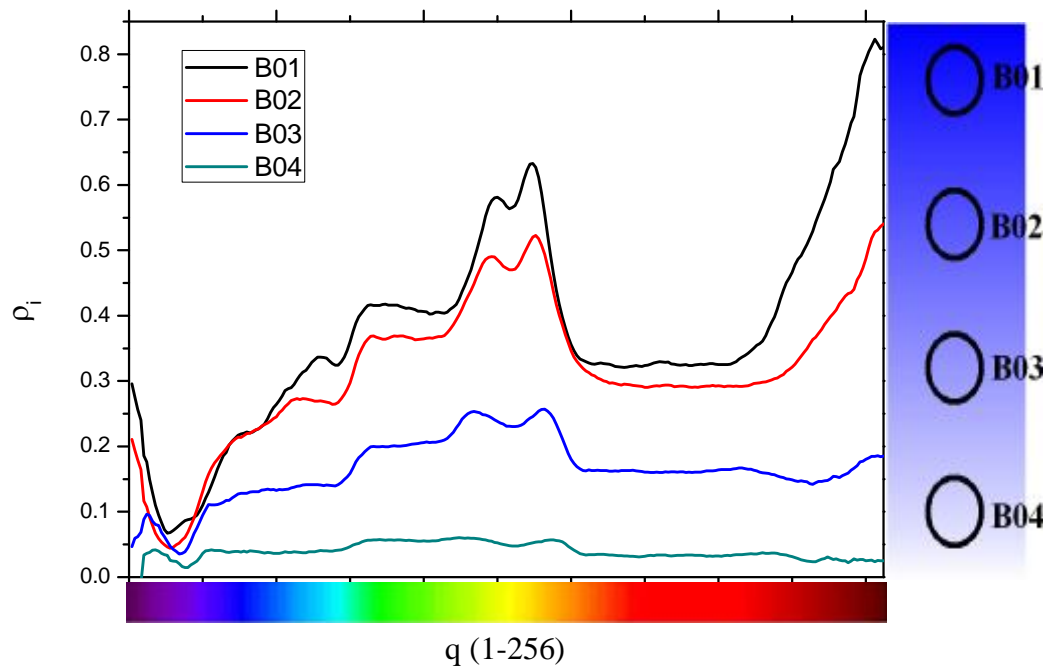


Figura 61. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método B.

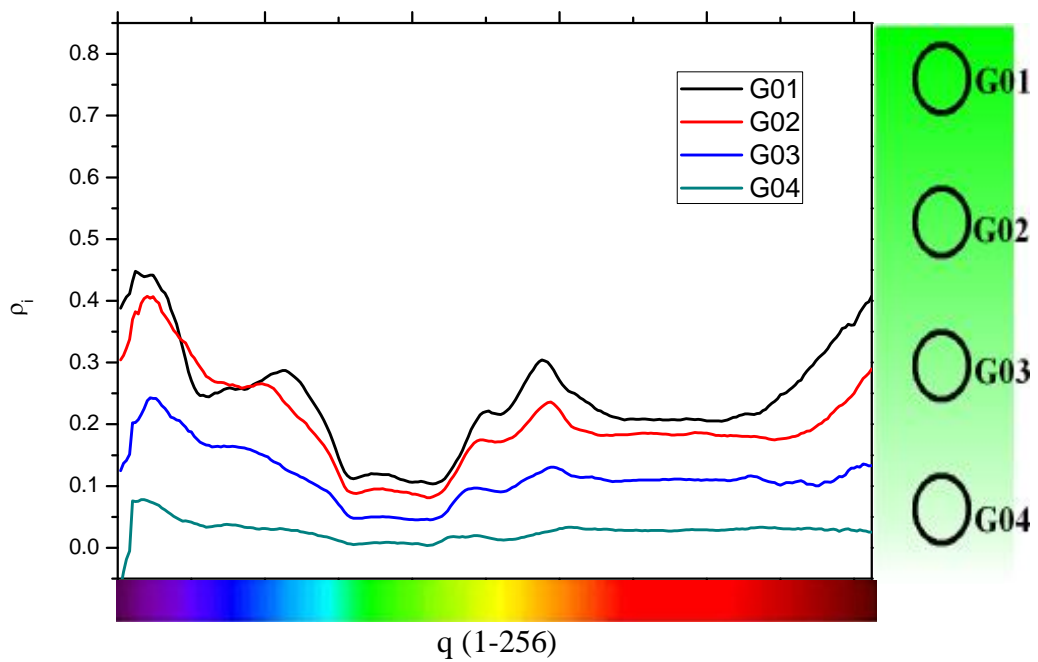


Figura 62. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método B.

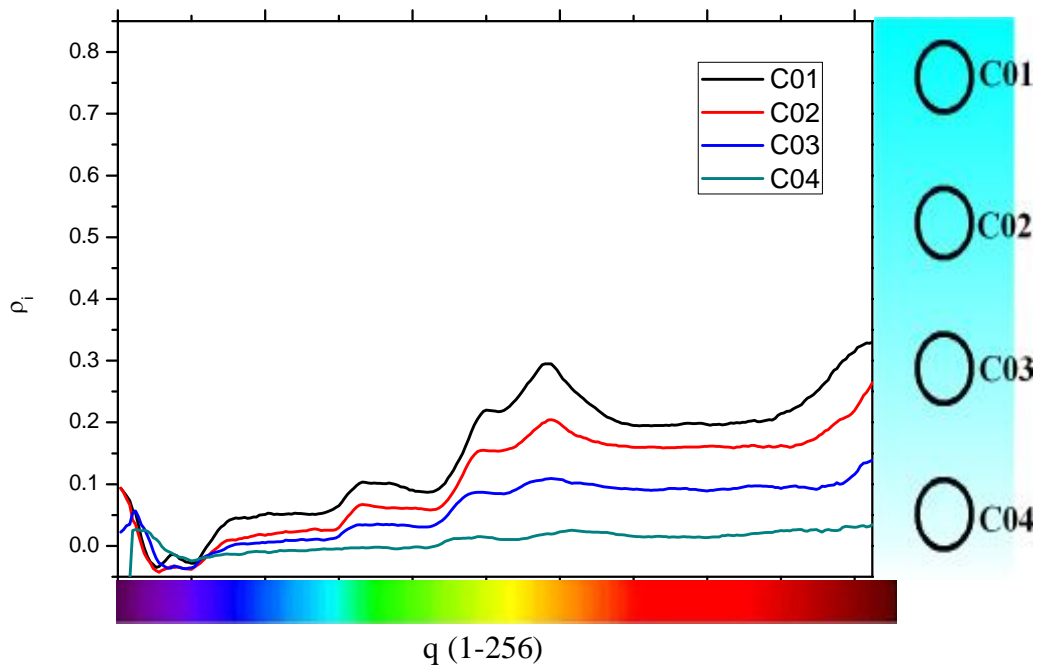


Figura 63. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método B.

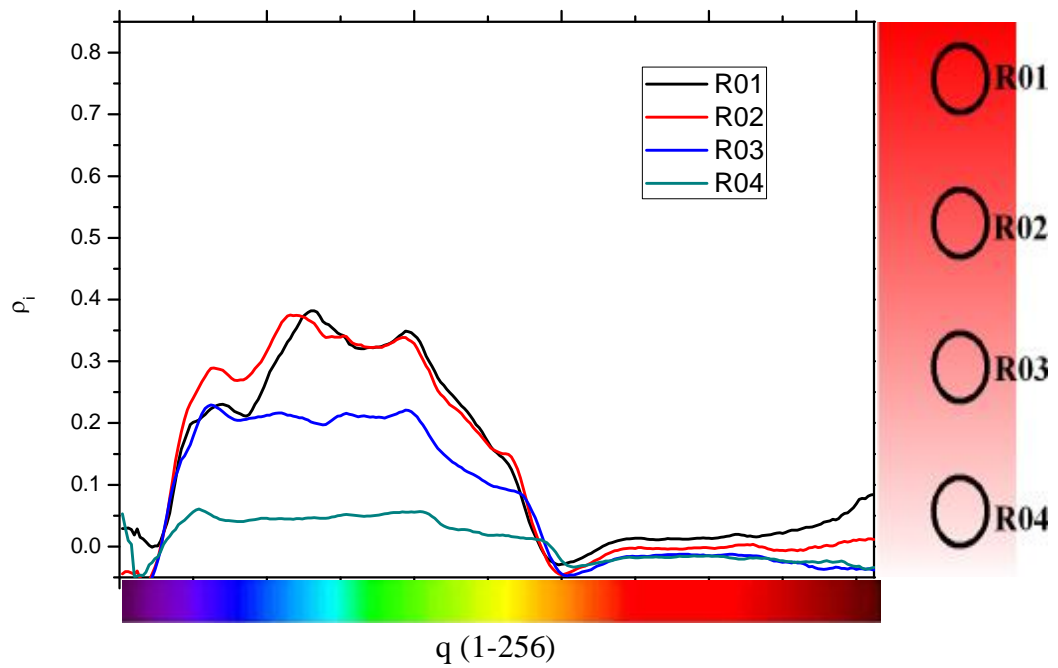


Figura 64. Señales características medidas por reflectancia CSPT usando el método B.

Como se observa, por ejemplo en las muestras amarillas se tiene una mayor absorbancia para iluminaciones azules, reflejando gran parte de la iluminación amarilla. Para las muestras azules se observa que absorbe la iluminación amarilla.

3.2.5 Medición de la reflectancia de las muestras opacas usando un espectrofómeto industrial.

Se utilizó el instrumento: Color Recognition Sensor CRS301 de Honeywell para obtener el espectro de reflexión de las muestras. Este "sensor" es un espectrofotómetro industrial con un rango espectral entre 400nm y 700nm. En la Figura 65 se da un esquema de éste espectrofotómetro.

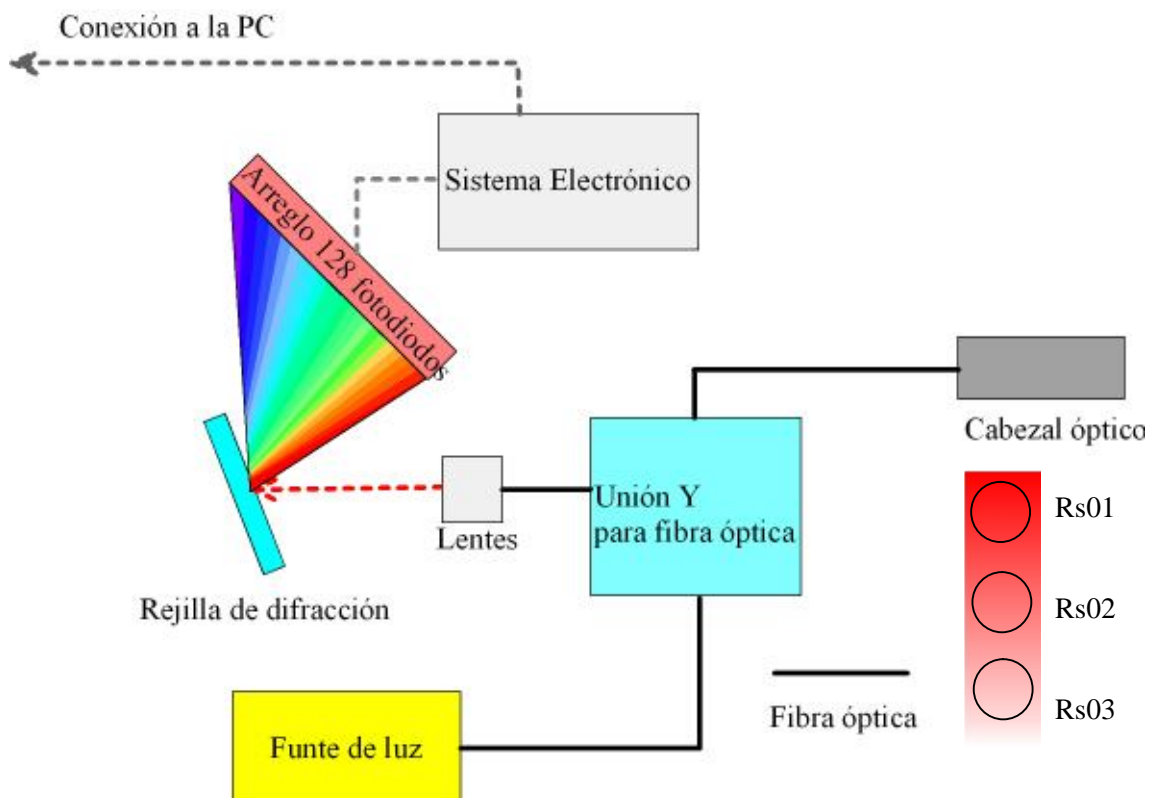


Figura 65. Esquema del "sensor de reconocimiento de color" CRS301 de Honeywell. Se muestra también una muestra roja indicando las tres posiciones de medida para el CRS301.

Se midieron tres posiciones sobre cada muestra, colocándose el cabezal óptico a 13mm sobre cada posición de la muestra y con una inclinación aproximada de 15° (recomendada por el fabricante). Se consideraron tres posiciones por muestras, como

se observa en la Figura 65. Esto se debió a las dimensiones del sensor respecto a la muestra.

El instrumento comercial (*CRS301*) entrega como respuesta una señal del tipo $r(\lambda)$ con valores entre 0 y 255. El espectro $r(\lambda)$ no está referenciado. Éste hecho no altera el objetivo principal del *CRS301* el cual es diferenciar muestras por colores, pues estas diferencias se basan en la forma del espectro $r(\lambda)$ y no tanto en sus valores absolutos. De manera similar a lo hecho en un trabajo anterior [45] se tomó una referencia r_0 , en éste caso correspondiente al espectro del papel blanco, para compensar el fondo blanco del papel que sirve de soporte a la muestra y el espectro característico de la fuente de luz del *CRS301*. Para el presente trabajo la compensación se realizó simplemente por la diferencias de las señales:

$$\text{Reflectancia (u.a)} = r(\lambda) - r_0(\lambda) \quad (35)$$

Las reflectancias así calculadas se presentan en las Figuras 66, 67, 68, 69 y 70 en unidades arbitrarias (unid.arb).

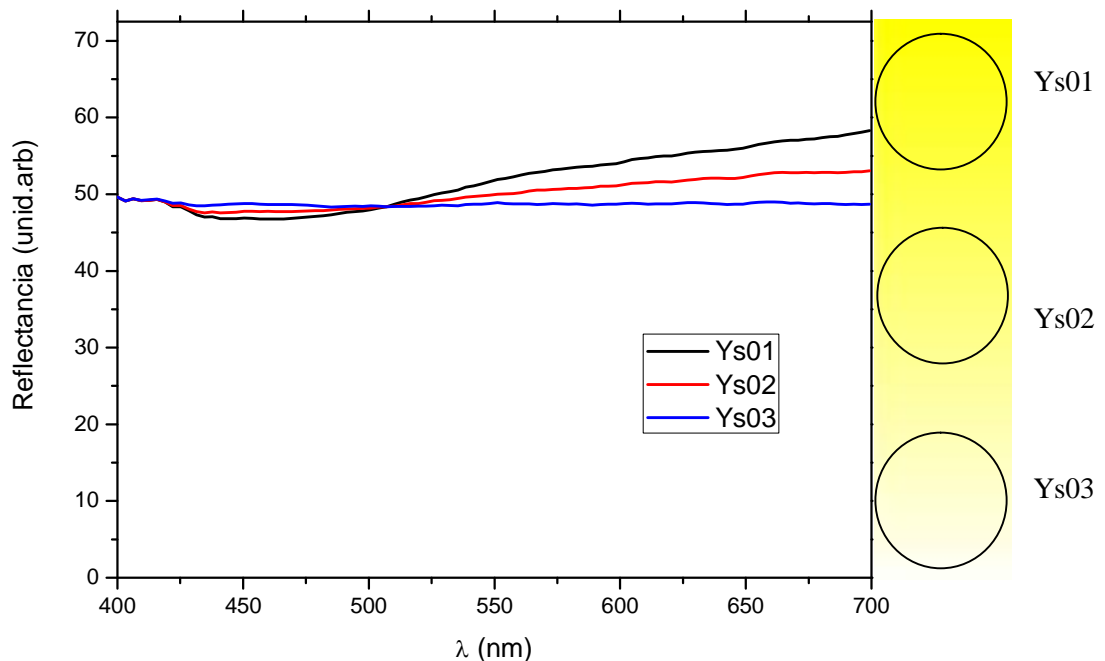


Figura 66. Señales características medidas con el espectrofotómetro comercial.

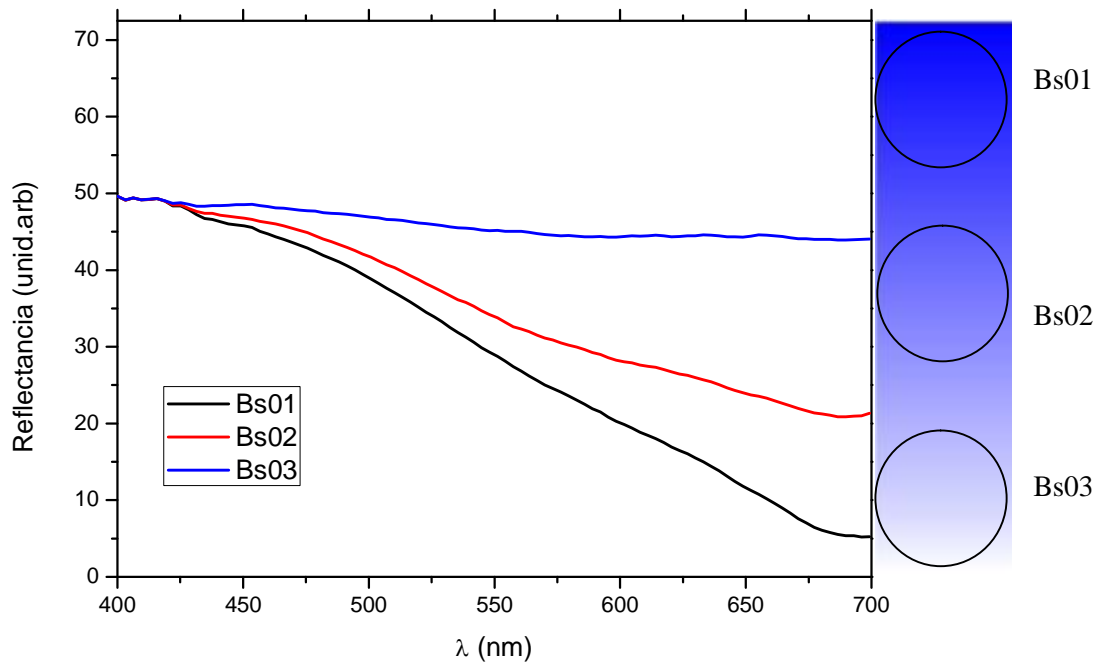


Figura 67. Señales características medidas con el espectrofotómetro comercial.

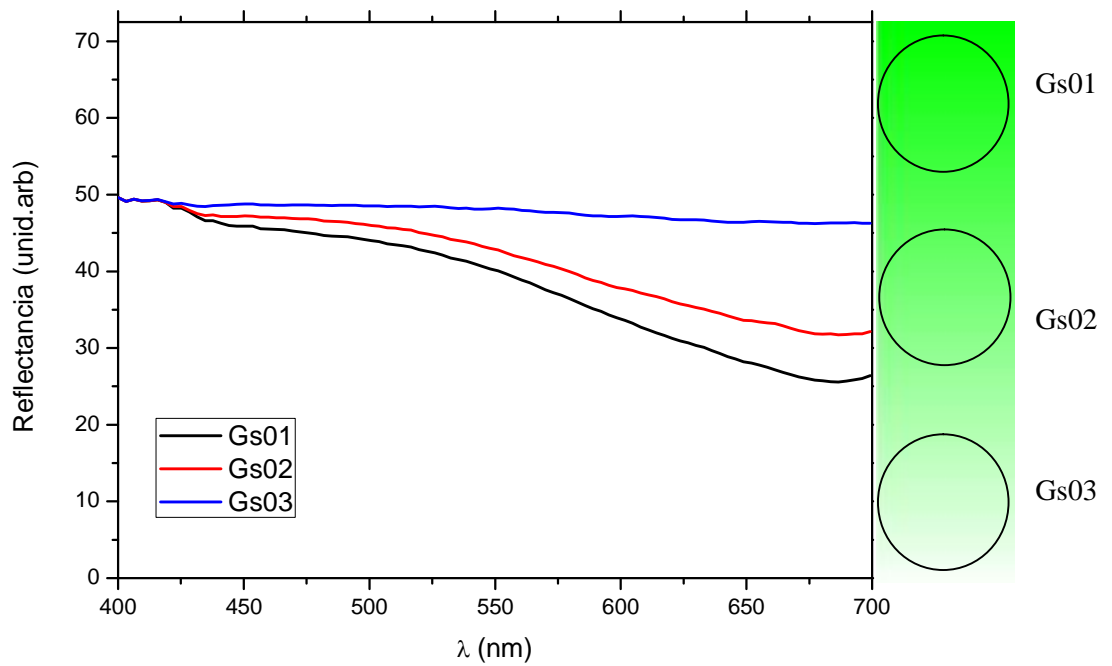


Figura 68. Señales características medidas con el espectrofotómetro comercial.

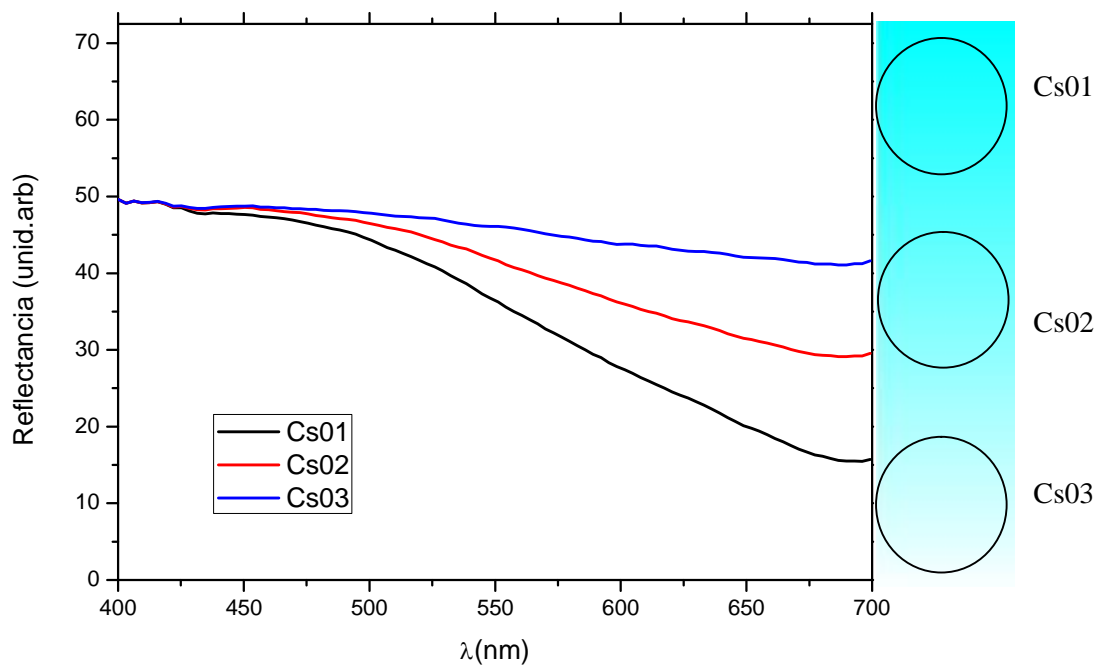


Figura 69. Señales características medidas con el espectrofotómetro comercial.

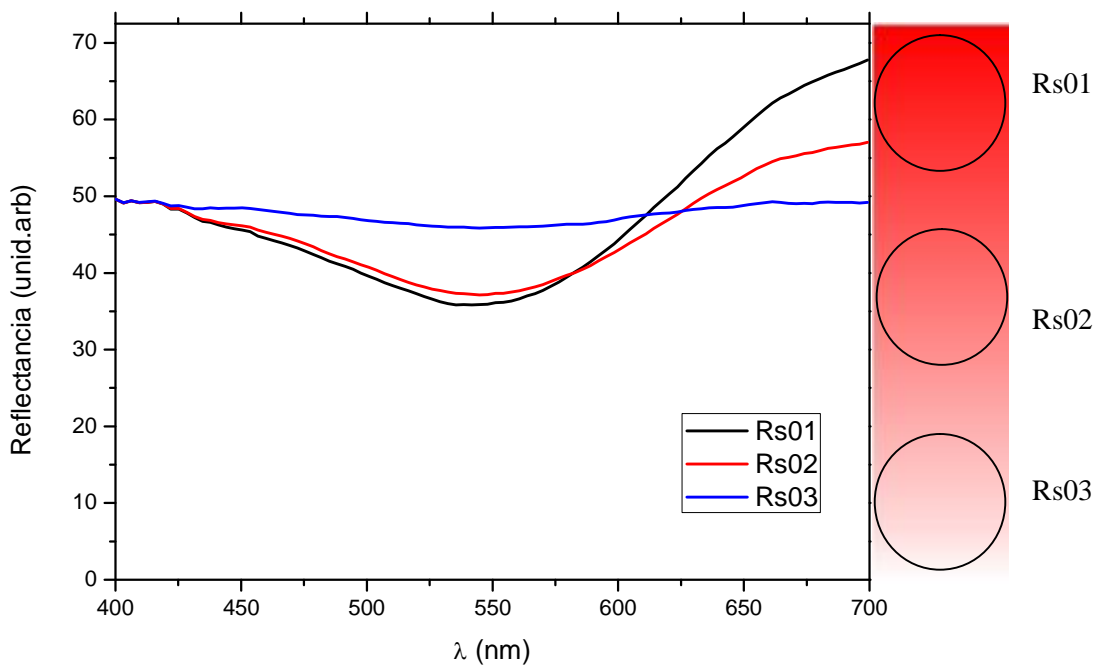


Figura 70. Señales características medidas con el espectrofotómetro comercial.

3.2.6. Clasificación de las muestras opacas.

Las señales características de las muestras calculadas usando el método B, tienen una correlación mayor con el espectro de obtenido con el instrumento comercial como se observa por ejemplo en la Figuras 64 y 70. Donde la muestra roja absorbe más el color rojo (Figura 64) y a la vez refleja más luz de longitudes de onda mayores a 625nm (Figura 70).

Es necesario mencionar que la medición del espectro con el instrumento comercial debe ser obtenida en forma separada para cada muestra de color, en cambio el CSPT evalúa a todas las muestras al mismo tiempo, el tiempo de toma de datos para el CSPT con las 256 iluminaciones, demoró 4 min.

La limitante en el número de muestras a ser evaluadas la da el número de píxeles que representa cada muestra en la imagen adquirida; por ejemplo con la resolución de la webcam usada en el presente trabajo (320x240 píxeles) y considerando que 50 píxeles representan a una muestra, se pueden analizar hasta 1536 muestras, sin embargo usando una cámara por ejemplo de 640x480 se pueden analizar 6144 muestras al mismo tiempo.

Se usó análisis por componentes principales (PCA) con las señales características calculadas con los métodos A y B y la espectroscopía de reflexión.

La Figura 71 se muestra el gráfico PC2 vs. PC1 para las señales características de todas las muestras amarillas (Y), azules (B), verdes (G), Cíanes (C) y rojas (R) obtenidas por el método A. Los puntos Ys01, Bs01, Gs01, Cs01y Rs01 se determinaron con los valores de la espectroscopía de reflexión.

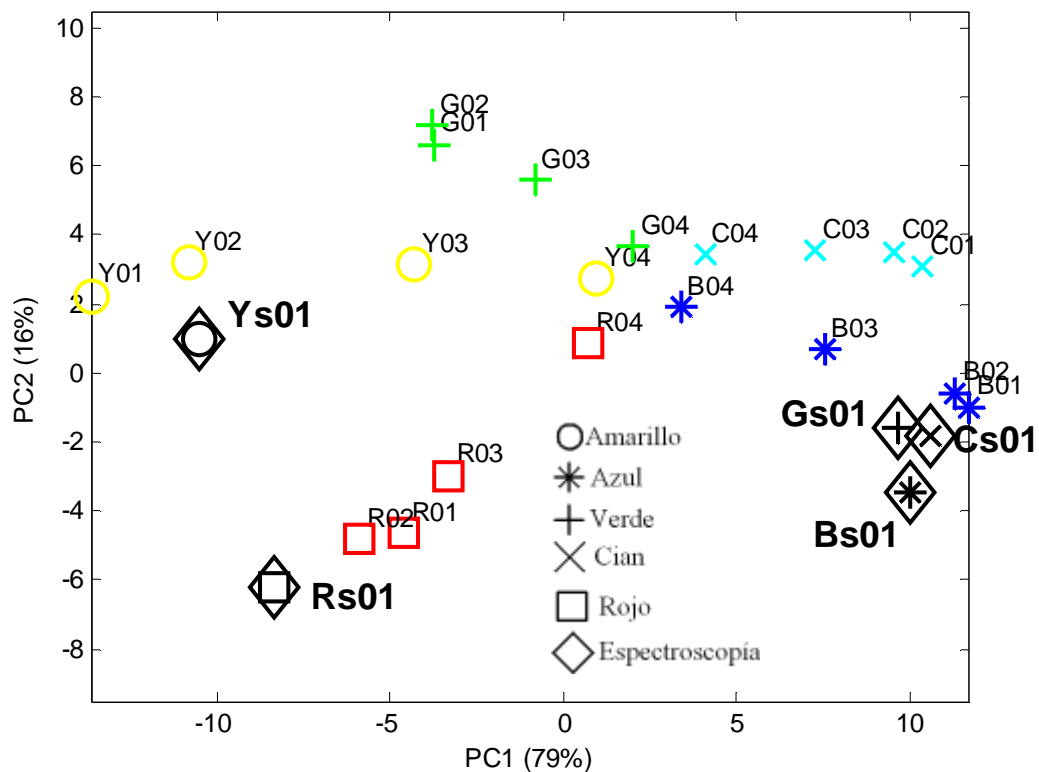


Figura 71. Gráfico de puntuaciones PCA para las señales características CSPT obtenidas por el método A. También se muestran las posiciones 01 medidas con el espectrofotómetro industrial.

Para las muestras amarillas, rojas y azules aparentemente el CSPT y el instrumento comercial poseen una eficiencia similar, sin embargo el CSPT separó mejor las muestras Cian y verdes.

Además el CSPT distingue entre muestras que tienen diferentes tonalidades de un mismo color, las cuales naturalmente convergen a un mismo punto cuando las muestras tienen menor tonalidad de color (Las muestras corresponde a las zonas inferiores de las impresiones en papel, ver Figura 47, las cuales tienen un color muy cercano al color blanco).

El método B, se observa que no separa claramente los las muestras de un mismo color con tonalidades diferentes sino que las agrupa, y separa a las muestras de diferente color (ver Figura 72).

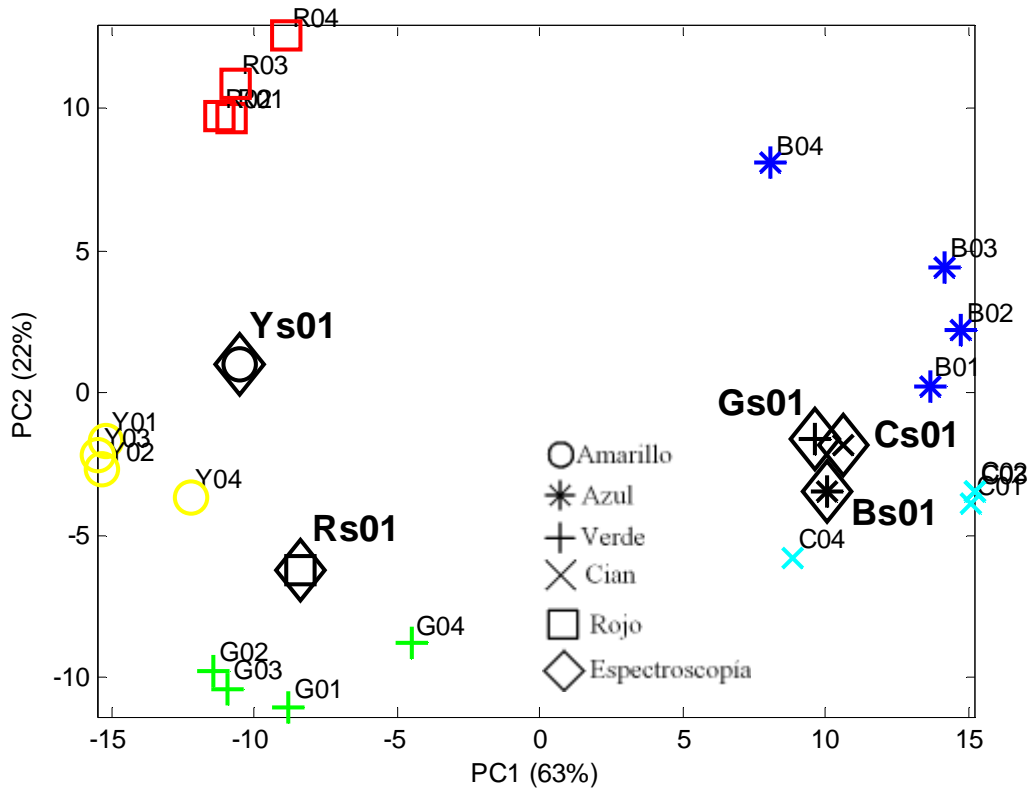


Figura 72. Gráfico de puntuaciones PCA para las señales características CSPT obtenidas por el método B. También se muestran las posiciones 01 medidas con el espectrofotómetro industrial.

Como se puede observar ambos métodos dan resultados complementarios, por ejemplo primero se pueden separar a las muestras de acuerdo al método B, pero de requerirse mayor fineza en la separación de las muestras se puede usar el método A.

Es importante mencionar que ambos métodos usan los mismos datos y el tiempo de procesamiento es despreciable respecto a los cuatro minutos que requiere el CSPT para la adquisición de las señales características.

En los gráficos de la Figuras 71 y 72 se demuestra que la técnica CSPT basada en reflectancia puede diferenciar muestras opacas.

En la Figura 73 se muestra el gráfico de anotaciones PCA para las señales obtenidas con el espectrofotómetro comercial. Se observa que la separación de las muestras verde y cian es muy pequeña respecto al CSPT. También se observa que CSPT con el método A tiene una mejor performance en separación de muestras del mismo color.

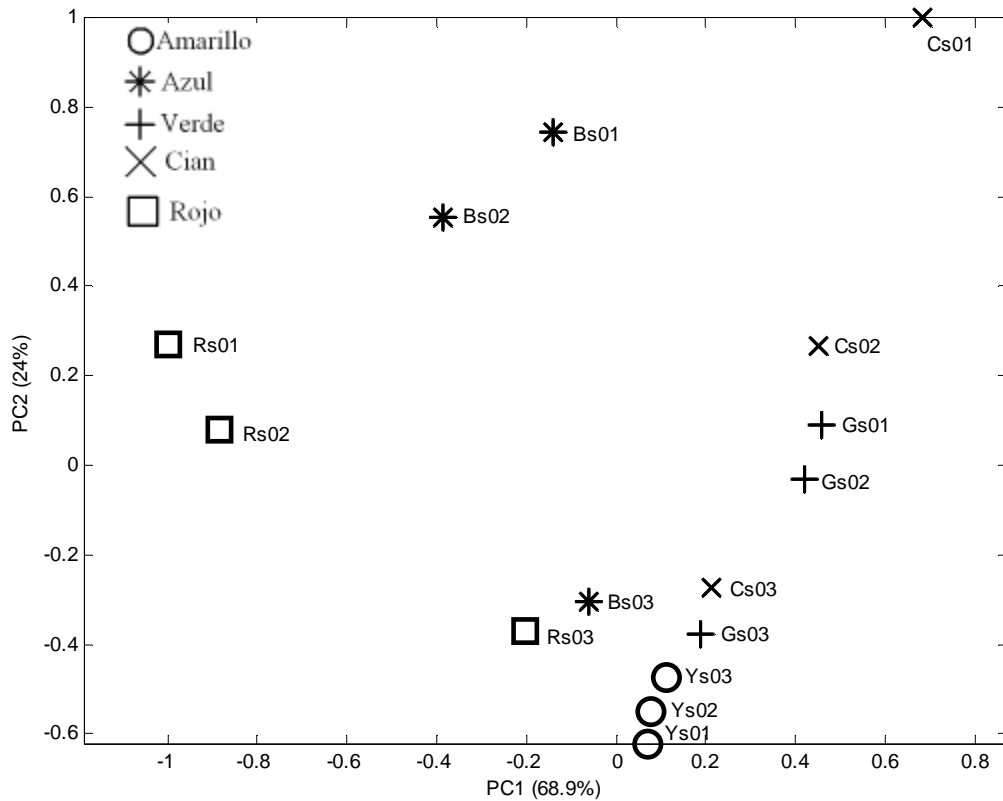


Figura 73. Gráfico de puntuaciones PCA para las señales características obtenidas con el espectrofotómetro industrial.

La técnica de CSPT no pretende reemplazar a los métodos convencionales de análisis, sin embargo el CSPT posee características que le permiten obtener resultados equivalentes a los obtenidos por espectrometría, como por ejemplo señales espectrales características o señales características de fluorescencia. Ello posibilita al CSPT a clasificar muestras. De ésta manera una plataforma CSPT puede realizar análisis rutinarios una vez validado con el método de referencia, relevando a instrumentos de mucho mayor costo en pruebas de rutina. Ésta es una gran ventaja especialmente en postas de salud en el Perú o inclusive en consultorios donde el costo de los equipos especializados hace imposible que puedan hacerse análisis clínicos en la primera línea

de atención al paciente. En éste escenario el CSPT puede servir como una plataforma para múltiples pruebas médicas que hasta el momento en muchas postas y consultorios deben ser realizadas en un laboratorio central. Un ejemplo de esto son los exámenes basados en pruebas colorimétricas [4, 7, 13], los cuales son evaluados con equipos sofisticados en hospitales o requieren un examen visual el cual puede ser tedioso e inexacto. Como resultado de éste trabajo se demuestra que el CSPT se convierte en una alternativa viable para distinguir una gran variedad de muestras opacas usando la luz reflejada por las mismas.

Ésta misma visión se puede utilizar en otros contextos como por ejemplo en la industria donde el CSPT diferenciando muestras opacas puede ser usado como técnica ó instrumento para control de calidad.

Finalmente, es necesario remarcar que la plataforma con webcam no es la única alternativa para CSPT, el uso de CSPT en PDAs y celulares le daría la ventaja de tener un instrumento portátil y de campo que se pueda comunicar con un servicio WEB.

4. Conclusiones

4. Conclusiones.

En la presente tesis se ha desarrollado el concepto de Sistema de Medición Multiparamétrico. Se han visto las potencialidades de éste tipo de sistemas en la clasificación de muestras a través del uso de una Lengua Electrónica para clasificar agua contaminada con diferentes niveles de E.Coli, y de un sistema CSPT usado por primera vez para la clasificación de muestras opacas.

Se desarrolló una Lengua Electrónica Voltamperométrica logrando clasificar muestras de agua contaminada con diferentes concentraciones *E.coli*, tanto para muestras preparadas en el laboratorio, como para muestras reales tomadas de un río.

Se demostró que para lograr este objetivo fue necesario utilizar solo un electrodo de trabajo en el sistema sensor. Éste resultado es muy interesante puesto que posibilita el desarrollo de instrumentos simples basados en un solo sensor multiparamétrico para clasificación de agua con diferentes niveles de E.coli.

Se mostró a través de una simulación, que para la geometría del sensor desarrollado, las zonas de interés sobre las cuales ocurren las interacciones del sensor con los elementos de la muestra son muy próximas a las superficies de los electrodos del sensor. Específicamente sobre las superficies del electrodo de trabajo activo y del electrodo auxiliar.

Se encontró que para optimizar la onda de excitación, es recomendable analizar previamente algunas muestras con el mismo sistema sensor de la lengua electrónica, pero usando voltametría cíclica.

Si bien es cierto los resultados obtenidos con la lengua electrónica son muy alentadores pues fue posible clasificar muestras de agua que poseen diferentes concentraciones de E.coli, éste hecho se pudo lograr a través de un procedimiento cualitativo.

Sería necesario hacer un estudio más profundo, especialmente en la componente de análisis microbiológico, para poder detectar E.coli en agua y no solamente clasificar muestras de agua contaminada con E.coli. Además éste estudio permitiría determinar el nivel de detección, de manera de medir cuantitativamente la concentración de E.coli.

Para ello sería necesario también incorporar al software PCA, la técnica PLS (regresión por cuadrados mínimos) que es la herramienta del análisis multivariado para obtener resultados cuantitativos de mediciones multiparamétricas.

Las muestras se clasificaron a través del análisis por componentes principales (PCA) usando dos componentes. Esto implica que solo dos variables de salida definen a la muestra e indican si el agua está muy contaminada, contaminada o no contaminada.

Éstas variables de salida podrían usarse como entradas en sistemas con inteligencia artificial, por ejemplo basados en redes neuronales, con el objetivo de crear sistemas que intervengan a través de técnicas de descontaminación grandes volúmenes de agua. Esto con el objetivo de crear descontaminadores inteligentes de agua.

El sistema multiparamétrico Lengua Electrónica Voltamétrica desarrollado posee una estructura configurable pudiendo ser usado para la clasificación de otro tipo de muestras líquidas, simplemente cambiando el software de adquisición y/o el algoritmo de análisis.

Se usó un sistema CSPT modificado para medir la luz reflejada en muestras opacas similares a las usadas en pruebas médicas bio-colorimétricas. Las señales características CSPT se obtuvieron por dos métodos, encontrándose que son complementarios.

El primero, basado en la creación de un vector característico cuyas componentes son las intensidades capturadas en los tres canales de la webcam, permitió una muy buena diferenciación entre muestras, inclusive si tienen el mismo color pero con diferentes

tonalidades. El segundo método, basado en un modelo parecido a la absorbancia, permitió diferenciar a las muestras en base a sus colores y no a las tonalidades.

También se usó un espectrofotómetro industrial encontrándose que los espectros característicos tenían una buena correspondencia con las señales obtenidas con el segundo método usando CSPT.

Se utilizó el CSPT para clasificar muestras opacas, mostrando superioridad respecto al sensor de color (Honeywell CRS301).

El CSPT no pretende reemplazar a los métodos convencionales de análisis, sin embargo el CSPT posee características que le permiten obtener resultados equivalentes a los obtenidos por espectrometría, como por ejemplo señales espectrales características o señales características de fluorescencia, ello posibilita al CSPT a clasificar muestras.

De ésta manera una plataforma CSPT puede realizar análisis rutinarios una vez validado con el método de referencia, relevando a instrumentos de mucho mayor costo en pruebas de rutina.

La demostración de que el CSPT permite diferenciar muestras opacas ha servido como base para trabajos posteriores donde se usa CSPT para medir pruebas médicas bio-colorimétricas, determinar parámetros ambientales, etc. como se puede observar en las citas que tiene el artículo publicado [4].

Debido a su simplicidad y funcionalidad CSPT en base a reflectancia se convierte en una técnica que, podría en un futuro y con un estudio que tenga una amplia componente biomédica, ser usada como un instrumento ubicuo para la realización de exámenes médicos económicos, por ejemplo en postas de salud a nivel nacional pudiendo convertirse en un elemento que permita levantar mapas de salud para la implementación o mejoramiento de políticas públicas en el Perú.

Tanto la Lengua Electrónica como el CSPT son Sistemas de Medición Multiparamétricos, económicos, fáciles de implementar, muy versátiles y que, como se ha demostrado en la presente tesis, tienen aplicaciones en sectores fundamentales para el desarrollo sostenido del Perú.



5. Bibliografía

5. Bibliografía

- [1] F.Winqvist, I.Lundström, P.Wide , The Combination of an electronic tongue and an electronic nose, *Sensors and Actuators B* 56 (1999) 512-517.
- [2] F.Winqvist, I.Lundström, P.Wide, An electronic tongue based on voltammetry, *Analytica Chimica Acta* 357 (1997) 21-31.
- [3] F.Röck, N.Barsan and U.Weimar, Electronic Nose: Current Status and Future Trends. *Chem. Rev.* 108, 2008, 705-725.
- [4] D.Filippini, G.Comina, I.Lundström, Computer screen photo-assisted reflectance fingerprinting, *Sensors and Actuators B*, 107 (2005) 580-586.
- [5] G.Comina, J.Venero, H.Alarcon, J.L. Solís, Desarrollo de un sistema portátil de análisis de calidad de agua, *Revista de investigación de Física*, 12(1) (2009) 13 – 19.
- [6] C.Krantz-Rülcker, M.Stenberg, F.Winqvist, I.Lundström, Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review, *Analytica Chimica Acta*, 426 (2001) 217-226.
- [7] D. Filippini, C. Di Natale, R. Paolesse, A. D'Amico, I. Lundström, Computer screen photo-assisted techniques for global monitoring of environmental and sanitary parameters, *Sensors and Actuators B* 121 (2007) 93-102.
- [8] D. Filippini, K. Tejle, I. Lundström, ELISA test for anti-neutrophil cytoplasm antibodies detection evaluated by a computer screen photo-assisted technique *Biosensors and Bioelectronics*, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2005) 266–272.
- [9] M.Gutiérrez, S.Alegret, M.del Valle, Bioelectronic tongue for the simultaneous determination of urea, creatinine and alkaline ions in clinical samples, *Biosensors and Bioelectronics* 23 (2008) 795–802.
- [10] S.Dragonieri, R.Schot, B.J.A. Mertens, S.Le Cessie, S.A. Gauw, A. Spanevello, O.Resta, N.P. Willard, T. J. Vink, K.F. Rabe, E.H. Bel and P.J. Sterk, An electronic nose in the discrimination of patients with asthma and controls, *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 120(4), 2007.
- [11] A.Alimelli, G.Pennazza, M.Santonico, R.Paolesse, D.Filippini, A. D'Amico, I.Lundström, C.Di Natale, Fish freshness detection by a computer screen photoassisted based gas sensor array. *Analytica Chimica Acta*, 582 (2007) 320–328.
- [12] L.Escuder-Gilaberta, M.Peris, Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis, *Analytica Chimica Acta* 665 (2010) 15–25.

- [13] W.Li, J.Friel, T.Beta, An evaluation of the antioxidant properties and aroma quality of infant cereals, *Food Chemistry* 121 (2010) 1095–1102.
- [14] C.Wongchoosuk, A.Wisitsoraat, A.Tuantranont, T. Kerdcharoena, Portable electronic nose based on carbon nanotube-SnO₂ gas sensors and its application for detection of methanol contamination in whiskeys, *Sensors and Actuators B* 147 (2010) 392–399.
- [15] Instituto Nacional de Estadística e Informática, PERÚ: CENSOS NACIONALES 2007, XI DE POBLACION Y VI DE VIVIENDA, <http://censos.inei.gob.pe/Censos2007/IndDem/>
- [16] L.M.L. Nollet (Ed.), *Handbook of Water Analysis (Food Science and Technology)*, CRC, Nueva York, (2000).
- [17] D.Wang, W.Fiessel, Evaluation of media for simultaneous enumeration of total coliform and *Escherichia coli* in drinking water supplies by membrane filtration techniques, *Journal of Environmental Sciences*, 20(3), 273-277, (2008).
- [18] D.Francy, R.Darner, Comparison of methods for determining *Escherichia coli* concentrations in recreational waters, *Water Research*, 34(10),2770-2778, 2000.
- [19] P. Farnia, M. Reza Masjedi, F. Mohammadi, P. Tabarsei, P. Farnia, A. Reza Mohammadzadeh, P. Baghei, M. Varahram, S. Hoffner, and A. Akbar Velayati, Colorimetric Detection of Multidrug-Resistant or Extensively Drug-Resistant Tuberculosis by Use of Malachite Green Indicator Dye, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 796-799, 2008.
- [20] A.H. Moody, P.L. Chiodini, Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection, *British Journal of Biomedical Sciences* , 59(4), 228-231, (2002).
- [21] S. H. Lim, L. Feng, J.W. Kemling, C. J. Musto and K. S. Suslick, An optoelectronic nose for the detection of toxic gases, *Nature Chemistry*, 1, 562-567, (2007).
- [22] J. Janata, Chapter 10: Multivariate Sensing, en *Principles of chemical sensors*, Second edition, Springer (2009), Germany.
- [23] S. Holmin, P. Spångeus, C. Krantz-Rülcker and F. Winqvist, Compression of electronic tongue data based on voltammetry — a comparative study, *Sensors and Actuators B*, 76, (2001), 455-464.

[24] L.B. Kish, R. Vajtai, C.G. Granqvist, Extracting information from noise spectra of chemical sensors: single sensor electronic noses and tongues, *Sensors and Actuators B*, 71, (2000), 55-59.

[25] R.Bjorklund, D. Filippini, I. Lundström, Automatic optimization of experimental conditions for fast evaluation of diagnostic tests using ubiquitous instrumentation, *Sensors and Actuators B*, 134, (2008), 199-205.

[26] F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, and I. Lundstrom, Monitoring of freshness of milk by an electronic tongue on basis of voltammetry, *Measurement Science and Technology*, 9 (1998) 1937-1946.

[27] G. Comina, S. Holmin, P. Ivarsson, F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, COD monitoring of waste water using an electronic tongue, 2nd SENSPOL Workshop Response To New Pollution Challenges, King's College, London, UK. 4-7 June (2002).

[28] Lecture Notes in Computer Science, Multimedia Content Representation, Classification and Security, Capitulo: PCA and LDA Based Face Recognition Using Feedforward Neural Network Classifier, B. Günsel et al. (Eds.): MRCS 2006, LNCS 4105, pp. 199 – 206 Springer Berlin / Heidelberg (2006).

[29] G.Comina, Supervisión In-Situ y en tiempo real de una muestra líquida usando PCA-3D, *REVCUNI* 10 (1) (2006) 18-22.

[30] Multivariate data analysis –in practice, An introduction to multivariate data analysis and experimental design 5th edition , Kim H.Esbensen, CAMO ASA / CAMO Process AS (2001).

[31] Y. Vlasov, A. Legin, Non-selective chemical sensors in analytical chemistry: from “electronic nose” to “electronic tongue”, *J Anal Chem*, 361, (1998) 255–260.

[32] K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Toko and K. Yamafuji, Multichannel taste sensor using lipid membranes. *Sens. Actuators B*, 2 (1990), 205–213.

[33] K.Toko, Taste sensor, *Sensors and Actuators B*, 64, (2000), 205–215.

[34] Y. Vlasov, A. Legin and A. Rudnitskaya, Cross-sensitivity evaluation of chemical sensors for electronic tongue: determination of heavy metal ions, *Sensors and Actuators B*, 44(1-3), (1997), 532-537.

[35] F.Winqvist, P. Wide, I. Lundström, An electronic tongue based on voltammetry, *Analytica Chimica Acta*, 357, (1997), 21-31.

[36] F. Winqvist, Review- Voltammetric electronic tongues- basic principles and applications, *Microchim Acta* (2008), 163, 3-10.

- [37] 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.
- [38] P.Ivarsson, M.Johansson, N. Höjer, C.Krantz-Rülcker, F. Winqvist and I. Lundström, Supervision of rinses in a washing machine by a voltammetric electronic tongue, *Sensors and Actuators B*, 108(1-2), (2005), 851-857.
- [39] D. Filippini, S. P. S. Svensson, and I. Lundström, Computer screen as a programmable light source for visible absorption characterization of (bio)chemical assays, *Chem. Commun*, 2, (2003), 240-241.
- [40] D. Filippini, T.P.M. Andersson, S.P.S. Svensson, I. Lundstrom, Microplate based biosensing with a computer screen aided technique, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 2003, 35-41.
- [41] D. Filippini, I. Lundström, Preferential color substances and optimized illuminations for computer screen photo-assisted classification, *Analytica Chimica Acta*, 557 (1-2), (2006), 393-398.
- [42] M.Litter, M.L.Gagliano, Proc. of the II Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados, Campinas-SP, August 25-27, pp.49, 2003
- [43] M.Litter, Proc. of the II Encontro sobre Aplicações Ambientais de Processos Oxidativos Avançados, Campinas-SP, August 25-27, pp.42-45, 2003.
- [44] D. Filippini, J. Bakker, I. Lundström, Fingerprinting of fluorescent substances for diagnostic purposes using computer screen illumination, *Sens. Actuators B*. 106 (2005), 302–310.
- [45] G.Comina, J.Rodríguez, J.L.Solis and W.Estrada, In situ laser reflectometry measurements of pyrolytic ZnO film growth, *Meas. Sci. Technol.* 16 (2005), 685–690.